

**Inter- und intramolekulare Assoziationsreaktionen  
als zentrale Prozesse im Verlauf der Faltung und  
Stabilisierung von Proteinen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades  
- Doktor der Naturwissenschaften -  
der Fakultät für Biologie, Chemie  
und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von  
Diplom-Biochemikerin

**Stephanie Hoffmann-Thoms**

Bayreuth 2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2007 bis Februar 2012 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Anleitung von Prof. Dr. Franz X. Schmid angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Beate Lohnert
Promotionsgesuch eingereicht am:	29. Februar 2012
Zulassung durch die Prüfungskommission:	14. März 2012
Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums:	15. Juni 2012

**Prüfungsausschuss:**

Prof. Dr. Franz-Xaver Schmid	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Andreas Fery	(Vorsitzender)
Prof. Dr. Benedikt Westermann	

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Aufbau und Vermehrung der Ff-Phagen.....	1
1.2	<i>Phage display</i> zur Selektion auf erhöhte Bindungsaffinität.....	2
1.3	Selektion auf erhöhte Stabilität – das <i>Proside</i> -Verfahren.....	3
1.4	Die Rolle des G3P des fd Phagen bei der Infektion von <i>E. coli</i> Zellen .....	5
1.5	Prolylisomerisierung als limitierender Schritt der Phageninfektion.....	9
1.6	Die Faltung des G3P* korreliert mit dem Infektionsmechanismus des fd Phagen.....	10
1.7	Problemstellung .....	12
2	Material und Methoden .....	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide .....	15
2.1.2	Nährmedien.....	15
2.1.3	Enzyme, Proteine und Peptide .....	15
2.1.4	Oligodesoxyribonukleotide.....	16
2.1.5	Chemikalien .....	16
2.1.6	Verbrauchsmaterialien .....	16
2.1.7	Geräte.....	17
2.1.8	Computerprogramme .....	17
2.2	Gelelektrophoretische Methoden.....	18
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	18
2.2.2	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	18
2.3	Isolierung und Reinigung von DNA.....	19
2.3.1	Präparation doppelsträngiger DNA.....	19
2.3.2	Präparation einzelsträngiger DNA .....	19
2.3.3	Elution von DNA aus Agarose-Gelen.....	19
2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	20
2.4.1	Kolonie-PCR.....	20
2.4.2	Einführung von Mutationen mittels <i>blunt-end</i> Mutagenese.....	20
2.4.3	Amplifikation von DNA-Fragmenten .....	21
2.4.4	Erzeugung von Genfragmenten anhand von <i>overlap extension</i> PCR .....	21
2.5	Klonierung verschiedener Proteinvarianten.....	21
2.5.1	Restriktion der DNA-Fragmente und des Vektors pET11a .....	21
2.5.2	Ligation .....	22
2.6	Herstellung und Transformation von <i>E. coli</i> Zellen .....	22
2.6.1	Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> XL1 Blue Zellen.....	22
2.6.2	Herstellung und Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> BL21 (DE3)-Zellen.....	22
2.7	Arbeiten mit Phagen .....	23
2.7.1	Propagation und Isolierung von fd Phagen .....	23
2.7.2	Infektion pilushaltiger <i>E. coli</i> XL1 Blue bzw. <i>E. coli</i> TG1 Zellen .....	23
2.7.3	Infektion des pilusfreien <i>E. coli</i> HB2156 Stammes .....	23
2.7.4	Vergleich der Infektiositäten verschiedener fd Phagen.....	24
2.7.5	Kompetitionsexperimente .....	24
2.8	Expression der Protein-Varianten.....	25
2.8.1	Test auf die Überexpression eines Proteins.....	25
2.8.2	Fermentation und Zellaufschluss .....	25

2.9	Reinigung der Proteine.....	25
2.9.1	Reinigung der G $\beta$ 1-Varianten.....	25
2.9.2	Isolierung der G3P*-Varianten und der isolierten N1-Domäne aus <i>inclusion bodies</i> ....	26
2.9.3	Reinigung der isolierten N1-Domäne des G3P des IF1 Phagen als SUMO-Fusion.....	27
2.9.4	Reinigung der C-terminalen Domäne des TolA-Proteins.....	28
2.9.5	Markierung des Rezeptorproteins TolAC mit IAEDANS.....	29
2.10	Probenvorbereitung und Konzentrationsbestimmung.....	30
2.11	Untersuchung der konformationellen Stabilität der Proteine.....	30
2.11.1	Thermisch-induzierte Denaturierung.....	30
2.11.2	Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge.....	35
2.12	Analyse des Faltungsmechanismus der Proteine.....	37
2.12.1	Kinetische Messungen zur Faltung der G3P*-Varianten bzw. isolierten Domänen.....	37
2.12.3	Auswertung der kinetischen Messungen.....	40
2.12.2	Analyse der Faltung der G $\beta$ 1-Varianten.....	41
2.13	Charakterisierung der Interaktion der N1-Domäne des G3P* mit TolAC-AEDANS.....	44
2.13.1	Messung von Fluoreszenzspektren.....	44
2.13.2	Kinetik der Bindung der N1-Domäne des G3P* an TolAC-AEDANS.....	44
2.13.3	Rückfaltung des G3P* in Gegenwart von TolAC-AEDANS.....	46
3	Ergebnisse und Diskussion.....	47
3.1	Die Faltung des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen fd.....	47
3.1.1	Die Faltung des globulären Teils der N2-Domäne erfolgt in der Totzeit der manuellen Mischung.....	49
3.1.2	Die <i>trans</i> $\rightarrow$ <i>cis</i> -Isomerisierung von Pro213 ist der konformationellen Entfaltung von N2 aus dem gedockten Zustand nachgelagert.....	52
3.1.3	Anhand von Doppelmischexperimenten kann die Rückfaltung des G3P* direkt in die native Form verfolgt werden.....	55
3.1.4	Die Substitution des Pro161 gegen Alanin hat keine Auswirkung auf den gedockten Zustand.....	59
3.1.5	Durch den Austausch des Pro213 gegen Glycin liegt das WT fd G3P* teilweise in nicht assoziierter Form vor.....	65
3.1.6	Die Geschwindigkeit der Assoziation der Domänen im fd G3P* P213G ist gegenüber der <i>trans</i> $\rightarrow$ <i>cis</i> -Isomerisierung von Pro213 deutlich beschleunigt.....	67
3.1.7	Die Assemblierung des fd G3P* P213G kann durch den Faltungshelfer hFKBP12+IF beschleunigt werden.....	69
3.1.8	Die Rückfaltung der N2-Domäne in der stabilisierten Variante fd G3P* IIHY erfolgt unmittelbar in den lose-assoziierten Zustand.....	74
3.2	Aktivierung des fd Phagen G3P* durch Prolin-gekoppelte Entfaltung.....	82
3.2.1	Die Population des aktiven Intermediates erhöht die Affinität der N1-Domäne des G3P* für TolAC.....	82
3.2.2	Im aktiven Intermediat des WT fd G3P* liegen die beiden Domänen N1 und N2 unabhängig voneinander vor.....	86
3.2.3	Sequenzvariationen um den Prolinschalter führen zur Dissoziation der N-terminalen Domänen.....	90
3.2.4	Die Substitution der Schaltersequenz hat gravierende Auswirkungen auf die Interaktion mit TolAC-AEDANS.....	94
3.2.5	Durch den Austausch der zu Pro213 benachbarten Reste liegt der entsprechende Phage permanent in der geöffneten Form vor.....	97
3.3	Der Einfluss der ersten Schleife von N1 auf die Assemblierung der N-terminalen Domänen des fd G3P*.....	100

3.3.1	Der Austausch der ersten Schleife in N1 stabilisiert diese Domäne, führt aber gleichzeitig auch zur starken Destabilisierung der N2-Domäne .....	102
3.3.2	Im fd G3P* EGDS sind die Wechselwirkungen zwischen den N-terminalen Domänen drastisch vermindert .....	107
3.3.3	Durch die Substitution der Schleifenregion wird das aktive Intermediat populiert .....	111
3.3.4	Der fd Phage geht durch den Austausch der Schleifenregion und den damit verbundenen Verlust der Domäneninteraktionen in den aktiven Zustand über .....	114
3.3.5	Der Austausch der ersten Schleife von N1 kompensiert die Verbesserung der Domäneninteraktion durch die zusätzlichen Substitutionen des fd G3P* IIHY .....	116
3.4	Austausch der TolAC-Bindedomäne im fd G3P* durch die homologe N1-Domäne des filamentösen Phagen IF1 .....	121
3.4.1	Durch den Einbau von IF1-N1 in die stabilisierte Variante fd G3P* IIHY werden beide Domänen destabilisiert .....	122
3.4.2	In der Chimäre fd G3P* IF1-N1 <sub>DDKTLTD</sub> IIHY liegen die Domänen IF1-N1 <sub>DDKTLTD</sub> und N2 in nicht assoziierter Form vor.....	125
3.4.3	Durch die Gegenwart der N2-Domäne wird die Affinität der IF1-N1-Domäne in der Chimäre für TolAC-AEDANS nicht beeinflusst .....	128
3.5	Die Bedeutung des distalen Serin-Glycin-reichen Linkers für die Stabilität und Funktionalität des fd G3P .....	134
3.5.1	Die Verkürzung des distalen Linkerbereiches hat keinen Einfluss auf die Stabilität und Faltung der N-terminalen Domänen des WT fd G3P* .....	135
3.5.2	Die Affinität der N1-Domäne für TolAC ist unabhängig von der Länge des distalen Linkers des G3P* .....	139
3.5.3	fd Phagen mit verkürztem distalem Linker haben bei der Propagation gegenüber dem Wildtyp-Phagen keinen Nachteil .....	142
3.6	Strukturelle und energetische Grundlagen der Dimerisierung des Gβ1-Proteins.....	145
3.6.1	Die hohe Stabilität der Variante Gβ1-M2 wird zum Teil bedingt durch die Ausbildung von Dimeren .....	146
3.6.2	Leucinreste an den Positionen 16 und 37 führen zur Dimerisierung des Gβ1-Proteins .....	149
3.6.3	Die Assoziation der Monomere des Gβ1-M2 wird vermittelt über hydrophobe Wechselwirkungen und die Ausbildung eines intermolekularen β-Faltblattes.....	152
3.6.4	Die Natur des Restes an Position 33 hat keinen Einfluss auf die Tendenz des Gβ1-M2 zur Dimerisierung.....	156
3.6.5	Analyse des Faltungsmechanismus der hyperstabilen Variante Gβ1-M2.....	157
3.6.6	Über Doppelmischexperimente kann die Entfaltungsreaktion der monomeren Form des Gβ1-M2 sichtbar gemacht werden.....	161
3.6.7	Die Dissoziationskonstante des Gβ1-M2-Dimers liegt im nanomolaren Bereich .....	165
4.	Zusammenfassende Diskussion.....	169
4.1	Die Stabilität der Gelenkregion beeinflusst die Funktionalität des G3P .....	170
4.1.1	Die aktive Form des WT fd G3P* liegt nicht im lose-assoziierten Zustand vor.....	170
4.1.2	Im langlebigen Intermediat ist die Affinität der N1-Domäne des G3P* gegenüber TolAC deutlich erhöht .....	171
4.2	Die Sequenz um Pro213 reguliert den Übergang in den gedockten Zustand des G3P .....	172
4.2.1	Durch die Substitution des Pro213 gegen Glycin liegt das Wildtyp-G3P zum Teil in geöffneter Form vor .....	172
4.2.2	Die Auswirkung der Austausche Q212A und P214A ist abhängig von der Natur des Restes an Position 213 .....	173
4.3	Die Interaktion der ersten Schleife von N1 mit dem globulären Teil von N2 stabilisiert den assoziierten Zustand .....	175

---

4.4	Die N1-Domäne des IF1 Phagen kann trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu fd-N1 diese funktionell nicht vollständig ersetzen.....	177
4.5	Der distale Linker zwischen den N-terminalen Domänen hat keinen Einfluss auf die Infektion und Vermehrung des fd Phagen.....	178
4.6	Gβ1 kann durch zwei Austausche in ein Dimer umgewandelt werden .....	179
4.6.1	Die hyperstabile Variante Gβ1-M2 wird durch die Ausbildung von Dimeren zusätzlich stark stabilisiert.....	179
4.6.2	Stabilisierung von Gβ1 mittels <i>Proside</i> – Selektion auf dimere Varianten?.....	180
4.6.3	Über die Analyse des Faltungsmechanismus kann sowohl die Stabilität der monomeren Spezies als auch die des Komplexes ermittelt werden .....	180
5.	Publikationsliste.....	183
6.	Zusammenfassung .....	185
7.	Summary.....	189
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	193
9.	Literaturverzeichnis .....	197
10.	Anhang.....	205

# 1 Einleitung

Die Diskussion um umweltschonende Energiegewinnung und deren effizientere Nutzung sind aktueller denn je, vor allem vor dem Hintergrund, dass fossile Brennstoffe wie Kohle oder Erdöl die Umwelt belasten und zudem nur begrenzt verfügbar sind. Der Gebrauch der Kernenergie steht ebenfalls in der Kritik, nicht zuletzt angesichts der bislang ungeklärten Frage der Endlagerung der radioaktiven Kernbrennstäbe. Aus diesem Grund wird mittlerweile verstärkt die Nutzung von Wind-, Wasser- und Sonnenenergie gefördert.

Gerade die Entwicklung von Photovoltaikanlagen mit hohem Wirkungsgrad hat sich jedoch als schwierig erwiesen, weshalb mittlerweile auch ungewöhnliche Ansätze verfolgt werden. So konnte die Arbeitsgruppe um Angela Belcher durch die Verwendung von genetisch veränderten M13 Bakteriophagen zum einen als Gerüstmaterial für kohlenstoffhaltige Nanoröhren, zum anderen als Oberfläche zur Anlagerung von  $\text{TiO}_2$ , einem wichtigen Bestandteil ihrer farbstoffsensibilisierten Solarzellen, deren Effizienz um fast ein Drittel von 8 auf 10,6 % steigern.<sup>1</sup>

Neben der Größe dieser für den Menschen ungefährlichen Phagen werden ihre einheitliche dreidimensionale Struktur und die über genetische Manipulation steuerbaren Eigenschaften ihrer Oberflächenproteine genutzt, um unter anderem effiziente Lithium-Batterien, Katalysatoren und halbleitende Nanodrähte zu entwickeln.<sup>2-5</sup> Ein weiterer Vorteil des filamentösen M13 Phagen liegt in der verhältnismäßig einfachen Herstellung großer Mengen durch die Anzucht entsprechend infizierter Bakterienstämme.<sup>6; 7</sup> Die Kenntnis der strukturellen und thermodynamischen Eigenschaften der Virusproteine sowie deren Funktion bei der Vermehrung dieser filamentösen Bakteriophagen ist daher eine wichtige Grundlage für die Entwicklung und Herstellung virus-basierter Nanotechnologieprodukte.

## 1.1 Aufbau und Vermehrung der Ff-Phagen

Der filamentöse Phage M13 gehört innerhalb der Familie der *Inoviridae* zur Gattung der *Inoviren*.<sup>8</sup> Die *Inoviren*, deren 6-7 kb große, zirkuläre Einzelstrang-DNA (ssDNA) von einem zylindrischen, jedoch flexiblen Filament umgeben ist, sind zwischen 1 und 2  $\mu\text{m}$  lang.<sup>6; 9</sup> Die meisten der bekannten *Inoviren* nutzen Gram-negative Bakterien verschiedener Gattungen wie z.B. *Escherichia*, *Pseudomonas* oder *Salmonella* als Wirtsorganismen, wobei sie zur Infektion die auf der Oberfläche der Zellen befindlichen, einziehbaren Pili als primäre Rezeptoren verwenden.<sup>6</sup> Im Gegensatz zu den nicht filamentösen T4 oder  $\lambda$ -Phagen vermehren sie sich jedoch ohne die Bakterienzellen zu lysieren.<sup>8; 9</sup> Die Phagenpartikel werden vielmehr über eine in der Membran der Wirtszelle gebildete Pore freigesetzt.<sup>6</sup> Vom filamentösen Phagen Pf4 aus *Pseudomonas aeruginosa* ist sogar bekannt, dass er eine wichtige Rolle für die Dynamik des Biofilms der Wirtszelle und deren Virulenz spielt.<sup>10</sup>

Innerhalb der Gattung der *Inoviren* bildet der Bakteriophage M13 gemeinsam mit dem fl Phagen und dem in dieser Arbeit näher untersuchten fd Phagen die Gruppe der Ff Phagen (F-Pili, filamentös), welche *E. coli* Zellen über deren F-Pilus infizieren.<sup>8; 11</sup> Die drei Phagen-

spezies f1, fd und M13 weisen eine Identität ihrer ssDNA von 98,5 % auf, wobei die neun enthaltenen Gene für elf Proteine codieren.<sup>6</sup>

Im Anschluss an die Infektion durch einen der Ff-Phagen, nachdem dessen ssDNA im Cytosol durch die DNA Polymerase III der *E. coli* Zelle zu einem Doppelstrang vervollständigt wurde, kommt es unter Einsatz des Gen-2-Proteins (G2P) des Phagen zur Replikation der DNA nach dem *rolling circle* Prinzip.<sup>6; 8</sup> Die neu synthetisierte ssDNA wird zunächst durch das G10P stabilisiert und damit akkumuliert, bevor sie bis auf eine spezifische Packungssequenz vollständig von G5P-Molekülen bedeckt wird. Die Zusammensetzung des Phagen wird initiiert durch die Wechselwirkung des stabförmigen ssDNA-G5P-Komplexes mit dem aus G1P, G4P und G11P bestehenden Exportkomplex sowie den membranständigen G7P und G9P.<sup>6; 9; 12</sup> Nachdem sich drei bis fünf Kopien dieser beiden Hüllproteine an die Spitze der Phagen-DNA gelagert haben, kommt es zur Elongation des Phagenpartikels. Gemäß dem gegenwärtigen Modell bilden das G1P und G11P einen ATP-abhängigen Kanal durch die Cytoplasmamembran, über den mit Hilfe des wirtseigenen Thioredoxin die ssDNA in das Periplasma transportiert wird.<sup>9; 13; 14</sup> Das G5P wird dabei durch das in der Cytoplasmamembran lokalisierte G8P ersetzt, welches mit ca. 2700 Kopien den Großteil der Phagenhülle ausmacht. Sobald die Phagen-DNA vollständig von G8P umgeben ist, lagern sich drei bis fünf Kopien des G6P bzw. G3P an das untere Ende, wodurch der Phage gleichzeitig von der inneren Membran gelöst wird.<sup>15-17</sup> Die abschließende Freisetzung in das Medium erfolgt über die aus 14 Molekülen des G4P formierte, fassförmige Pore in der äußeren Membran.<sup>18</sup>

Anzahl und Position der fünf Oberflächenproteine sind zwar bekannt, allerdings besitzt jedes Protein in Abhängigkeit seiner exponierten Seitengruppen definierte Bindungseigenschaften. Damit filamentöse Phagen als Gerüst z.B. zur spezifischen Anlagerung von TiO<sub>2</sub> verwendet werden können, muss folglich zunächst die Affinität mindestens eines ihrer Hüllproteine gegenüber dem gewünschten Material erhöht werden. Bei den entsprechend modifizierten Viren erfolgt die Wechselwirkung mit dem Interaktionspartner nicht direkt über die Reste des Hüllproteins, sondern wird durch kurze Peptide vermittelt, die an einem Ende des Phagenproteins angefügt werden.<sup>2; 19; 20</sup> Zur Identifizierung der am besten geeigneten Peptidsequenzen werden Selektionsverfahren auf Grundlage des sogenannten *phage display* angewandt.<sup>2; 7; 19; 20</sup>

## 1.2 *Phage display* zur Selektion auf erhöhte Bindungsaffinität

Die Methode des *phage display*, welche 1985 von George P. Smith unter Verwendung des filamentösen Phagen M13 entworfen wurde<sup>21</sup>, ist mittlerweile ein sehr weit verbreitetes biotechnologisches Verfahren zur Entwicklung therapeutischer rekombinanter Antikörper, die an definierte Zielmoleküle binden.<sup>22-24</sup> Darüber hinaus bietet das Verfahren die Möglichkeit zur Identifizierung spezifischer Inhibitoren der aktiven bzw. allosterischen Zentren von Enzymen.<sup>25; 26</sup>

Das Prinzip des *phage display* basiert auf dem Screening von Phagenbibliotheken nach Varianten mit erhöhter Affinität gegenüber einem spezifischen Bindungspartner.<sup>21</sup> Dazu werden randomisierte Gensequenzen kurzer Peptide oder auch Proteine so in das Gen eines der Oberflächenproteine des Phagen integriert, dass das resultierende Fusionsprodukt nach der Assemblierung an der Oberfläche des Phagen präsentiert wird. Damit ist die Verknüpfung von Geno- und Phänotyp gewährleistet. Solche Bibliotheken enthalten bis zu  $10^{11}$  verschiedene Phagenvarianten und werden anhand des sogenannten *panning* (engl. „Schwenken“) nach hochaffinen Varianten durchsucht, indem nach der Inkubation mit dem an einer festen Phase immobilisierten Zielprotein durch einen oder mehrere Waschschrte ungebundene bzw. schwach bindende Phagen entfernt werden.<sup>25</sup> Die anschließend eluierten Phagen mit hoher Affinität gegenüber dem Bindungspartner werden teilweise durch die Infektion von Wirtszellen vervielfältigt und gegebenenfalls einer weiteren Selektionsrunde unterworfen.<sup>21; 25</sup> Die Sequenz des selektierten Polypeptids ergibt sich durch Sequenzierung des entsprechenden Bereiches der ssDNA des Phagen.

Die Methode des *phage display* wird hauptsächlich zur Charakterisierung bzw. Verbesserung von Protein–Protein–Interaktionen verwendet.<sup>26-28</sup> Für industrielle Anwendungen spielen jedoch neben den Bindungs- vor allem auch die enzymatischen Eigenschaften von Proteinen eine wichtige Rolle, da sie in der Regel eine hohe Selektivität besitzen.<sup>29; 30</sup> Die natürliche Evolution der Proteine ist allerdings auf ein ausgewogenes Verhältnis zwischen konformationeller Stabilität und der für die Funktion wichtigen Flexibilität ausgerichtet, weshalb in vielen Industriezweigen zur biotechnologischen Herstellung von Produkten Enzyme thermophiler bzw. hyperthermophiler Organismen verwendet werden.<sup>31-33</sup> Dies hat den Vorteil, dass technische Verfahren bei höheren Temperaturen durchgeführt werden können, wodurch die Löslichkeit der Reaktanten sowie die Reaktionsraten gesteigert und gleichzeitig mikrobiologische Kontaminationen reduziert werden.<sup>34; 35</sup> Zudem beschäftigt sich der Forschungsbereich des sogenannten *protein engineering* mit der Entwicklung maßgeschneiderter Proteine mit optimierten oder vollkommen neuen Eigenschaften. Neben der rationalen Mutagenese<sup>36-38</sup> und dem computergestützten Design<sup>39-41</sup> werden dabei auch (Phagen-)Displayverfahren zur gerichteten Evolution verwendet, um nicht nur Enzyme mit gesteigerter Aktivität sondern auch hoher thermischer Stabilität zu erhalten.<sup>42-46</sup>

### 1.3 Selektion auf erhöhte Stabilität – das *Proside*-Verfahren

Das *phage display* auf erhöhte Stabilität basiert auf der selektiven Bindung stabilisierter Varianten eines Proteins an immobilisierte Liganden und ist daher abhängig von dessen Bindungseigenschaften.<sup>44; 47</sup> Eine Alternative dazu stellt das Selektionssystem *Proside* (*Protein stability increased by directed evolution*) dar.<sup>48; 49</sup> Es verknüpft die Infektiosität des filamentösen Phagen fd mit der proteolytischen Stabilität des in das phageneigene G3P eingebauten Gastproteins (Abbildung 1.1a). Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass Proteine im nativen, gefalteten Zustand üblicherweise weniger empfindlich gegenüber

Proteasen sind als entfaltete Proteine.<sup>50</sup> Thermische und proteolytische Stabilität von Proteinen sind demnach eng aneinander gekoppelt, weshalb mit der *Proside*-Methode die Selektion auf konformationelle Stabilität möglich ist.

Das Prinzip des Systems basiert auf der Insertion randomisierter Genvarianten des zu stabilisierenden Proteins in das Gen-3 des Phagen. Nach der Assemblierung werden die Gastproteinvarianten auf der Phagenoberfläche zwischen den beiden N-terminalen Domänen N1 und N2 und der C-terminalen (CT-) Domäne des G3P präsentiert (Abbildung 1.1a). Die N1- bzw. N2-Domäne spielen eine wichtige Rolle während der ersten Schritte der Infektion der *E. coli* Zellen, während die CT-Domäne für die Verankerung des Proteins in der Phagenhülle verantwortlich ist.<sup>51; 52</sup> Die *in vitro* Selektion der Phagenbibliotheken (Abbildung 1.1b) erfolgt unter definierten Bedingungen durch die Inkubation mit einer Protease wie z.B. Chymotrypsin, die bevorzugt in der Umgebung von aromatischen Aminosäuren (AS) schneidet.<sup>53</sup> Jede der auf der Oberfläche der Phagen präsentierten Gastproteinvarianten liegt dabei in Abhängigkeit der enthaltenen Substitutionen mehr oder weniger in gefalteter Form vor. Je höher die konformationelle Stabilität des Proteins, desto schlechter sind die in seinem Inneren lokalisierten aromatischen AS für die Protease zugänglich.

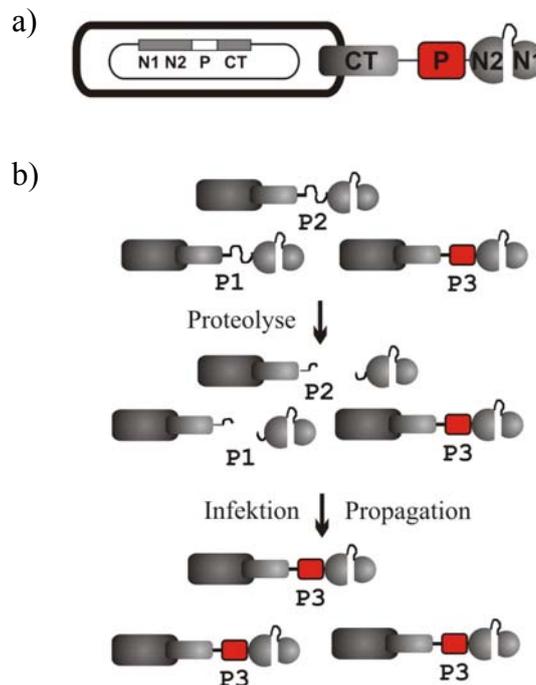


Abbildung 1.1: Das *Proside*-Verfahren zur Selektion auf stabilisierte Proteinvarianten.

a) Schematische Darstellung des filamentösen Phagen fd, in dessen G3P das Gastprotein P eingebaut wurde. Das Protein ist dabei zwischen den N-terminalen (N1, N2) und der C-terminalen (CT) Domäne inseriert. b) Schema der Selektion mittels der *Proside*-Methode. Eine Phagenbibliothek mit unterschiedlichen Gastproteinvarianten (P1-P3) wird *in vitro* einer Proteolyse unterzogen. Phagen mit instabilen und daher entfaltenen Gastproteinen werden geschnitten und verlieren die für die Infektiosität essentiellen N-terminalen Domänen. Phagen mit stabilem Insert bleiben dagegen infektiös und werden durch die Vermehrung in *E. coli* Zellen angereichert. Die Abbildung wurde nach Referenz<sup>48</sup> modifiziert.

Sobald ein Gastprotein gespalten wird, verliert der entsprechende Phage die beiden N-terminalen Domänen des G3P und damit die Fähigkeit *E. coli* Zellen zu infizieren. Im Verlauf

der anschließenden Propagationsphase geht der Phage folglich verloren (Abbildung 1.1b). Durch Wiederholung des Selektionsschrittes bestehend aus *in vitro* Proteolyse und Infektion von Wirtszellen können so Phagen angereichert werden, die über stabilere Gastproteine verfügen.<sup>48; 49</sup>

Das *Proside*-Selektionsverfahren wurde mit großem Erfolg unter anderen zur Stabilisierung des G3P des fd Phagen selbst, der TEM-1  $\beta$ -Lactamase aus *E. coli* sowie der Immunoglobulinbindungsdomäne 1 des G-Proteins aus Streptokokken der Lancefield-Gruppe G (G $\beta$ 1) angewendet. Wie die Kombination aus thermodynamischer Charakterisierung und Kristallstrukturanalyse einiger stark stabilisierter Varianten der Proteine verdeutlicht hat, ist vor allem die Entfernung von Packungsdefekten für die Erhöhung der Stabilität verantwortlich.<sup>54; 55</sup>

Am Beispiel des 56 AS kleinen G $\beta$ 1-Proteins konnte zudem gezeigt werden, dass die *in vitro* Evolutionsmethode *Proside* im Vergleich zum rechengestützten Proteindesign bei der Identifikation geeigneter Substitutionen an definierten Positionen deutlich zuverlässiger ist.<sup>56</sup> So waren die besten 16 über das *Proside*-Verfahren erhaltenen Proteine stabiler als sieben der zehn mit Hilfe von Stabilitätsberechnungen ermittelten G $\beta$ 1-Varianten, wobei in den entsprechenden Phagenbibliotheken das G $\beta$ 1-Protein lediglich an vier vorgegebenen Positionen randomisiert worden war.

Im Rahmen eines weiteren Selektionsansatzes mit G $\beta$ 1 als Gastprotein wurden zunächst mittels fehlerbehafteter PCR und *Proside*-Selektionen fünf Positionen mit hohem Stabilisierungspotenzial identifiziert. Phagenbibliotheken mit entsprechend an diesen Stellen randomisierten G $\beta$ 1-Proteinen wurden wiederum der gerichteten Evolution unterzogen und die besten Substitutionen in der Variante G $\beta$ 1-M2 kombiniert.<sup>57</sup> Der um 35 °C gegenüber dem natürlichen G $\beta$ 1-Protein erhöhte Schmelzpunkt dieser hyperstabilen Variante ist ein weiterer Hinweis darauf, dass das *Proside*-Verfahren sehr gut geeignet ist, um zumindest kleine Proteine stark zu stabilisieren.

#### 1.4 Die Rolle des G3P des fd Phagen bei der Infektion von *E. coli* Zellen

Wie beim ursprünglichen *phage display* werden auch bei der *Proside*-Methode die *in vitro* selektierten Phagenvarianten durch die Infektion von *E. coli* Zellen angereichert. Hierbei übernimmt, wie bereits erwähnt, das G3P, das zur Präsentation der Gastproteine verwendet wird, eine wichtige Funktion.<sup>51; 52</sup> Kenntnisse über die Struktur und Funktion der einzelnen Domänen des G3P während des Infektionsprozesses sind daher von großer Bedeutung.

Die drei Domänen des mit 406 AS größten der fünf Hüllproteine des fd Phagen sind über zwei Serin-Glycin-reiche Linker miteinander verknüpft. Der distale Linker zwischen der 67 AS umfassenden N1-Domäne und der N2-Domäne (131 AS) besteht aus 19 Resten. Auf die N2-Domäne, die in einen globulären Teil und eine Gelenksubdomäne unterteilt wird, folgen die zweite Linkerregion (39 AS) und die CT-Domäne (150 AS).<sup>58; 59</sup> Die Struktur der CT-terminalen Domäne konnte aufgrund ihrer Hydrophobizität bisher nicht gelöst werden.

Nach einem anhand des I-TASSER-Algorithmus erstellten Modell wird für die Domäne jedoch eine  $\alpha$ -helikale Struktur vorhergesagt.<sup>16</sup>

Das Fragment bestehend aus den beiden N-terminalen Domänen N1 und N2 (im Folgenden als G3P\* bezeichnet) nimmt eine hufeisenförmige Struktur an (Abbildung 1.2a), wobei zwischen den beiden  $\beta$ -Faltblatt-dominierten Domänen eine hydrophobe Furche gebildet wird.<sup>60; 61</sup> Anhand von NMR-Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass im nativen Zustand zwischen den Resten der Gelenkregion und der N1-Domäne ein Wasserstoffbrücken-netzwerk erzeugt wird, das zu einer festen Assemblierung der N1- und N2-Domäne führt.<sup>62</sup>

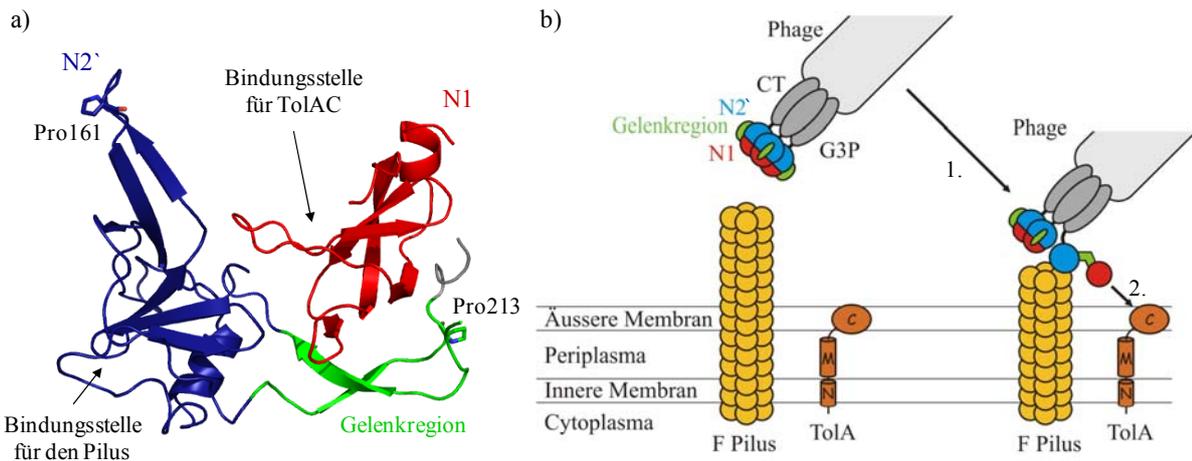


Abbildung 1.2: Die Rolle des G3P des fd Phagen bei der Infektion von *E. coli* Zellen.

a) Tertiärstruktur des N1N2-Fragments von WT fd G3P\*. Die beiden *cis*-Prolinreste 161 und 213 sind als Stäbchen-Modelle gezeigt. Die N1-Domäne ist in rot, der globuläre Teil von N2 (N2') in blau und die Gelenkregion in grün dargestellt. Die Abbildung wurde anhand der PDB-Struktur 2G3P<sup>60</sup> mit dem Programm Pymol<sup>63</sup> erstellt. b) Schematisch dargestellt sind die ersten Schritte der Infektion. Zunächst interagiert die N2'-Domäne mit der Spitze des Pilus, was zur Dissoziation der N-terminalen Domänen führt (1.). Daraufhin kann die N1-Domäne mit dem sekundären Rezeptor TolAC interagieren (2.). Die Abbildung wurde nach Referenz<sup>64</sup> modifiziert.

Wie die anderen Ff-Phagen verwendet der fd Phage F-Pili als primäre Rezeptoren.<sup>11; 59; 65</sup> Diese auf der Oberfläche F-konjugativer (F<sup>+</sup>) *E. coli* Zellen präsentierten dünnen, flexiblen Filamente dienen der Kontaktaufnahme mit einer Rezipienten-Zelle, die nicht wie die F<sup>+</sup>-Zellen über ein F-Plasmid und damit F-Pili verfügt. Durch Retraktion des F-Pilus wird die F<sup>-</sup>-Zelle in unmittelbare Nähe zur Donor-Zelle gebracht, woraufhin der horizontale Gentransfer des F-Plasmids ermöglicht wird.<sup>66; 67</sup>

Analog zur Interaktion mit der Rezipienten-Zelle bindet der fd-Phage während des ersten Schrittes der Infektion über die N2-Domäne seines G3P an die Spitze des F-Pilus (Abbildung 1.2b).<sup>59; 68</sup> Dabei wurde zunächst angenommen, dass der Pilus über einen unbekanntem Mechanismus zurückgezogen und der Phage dadurch zur Zelloberfläche transportiert wird.<sup>11; 69</sup> Neuere Untersuchungen zeigen, dass F-Pili eine hohe Eigendynamik besitzen und daher unabhängig vom Kontakt zu Phagen oder anderen Zellen permanent Zyklen aus Verlängerung und Rückzug durchlaufen.<sup>70</sup> Die ATP-abhängige Assemblierung des Filaments durch die helikale Anordnung der 70 AS kleinen F-Pilinmoleküle erfolgt dabei ausgehend von einem Reservoir an Untereinheiten in der inneren Membran.<sup>71</sup>

Die Wechselwirkung der N2-Domäne mit dem Pilus führt gleichzeitig zur Dissoziation der beiden N-terminalen Domänen, wodurch die Interaktionsfläche auf N1 für den sekundären Rezeptor, die C-terminale Domäne des Membranproteins TolA (TolAC) exponiert wird (Abbildung 1.2b).<sup>60; 72; 73</sup> Neben der C-terminalen Domäne, die die letzten 120 AS umfasst, besitzt TolA eine N-terminale Domäne aus 47 AS, die für die Verankerung des Proteins in der Cytoplasmamembran verantwortlich ist. Verbunden sind NT- und CT-Domäne über eine zentrale Domäne aus 254 AS, die als helikale Struktur den periplasmatischen Raum durchspannt.<sup>74</sup> Die biologische Funktion des TolA-Proteins ist nicht geklärt. Der über die Wechselwirkung seiner N-terminalen Domäne mit den Membranproteinen TolQ und TolR gebildete TolQRA-Komplex weist jedoch Sequenzhomologien zum TonB-ExbB-ExbD-Komplex auf, der für die Aufnahme von Vitamin B<sub>12</sub> und Eisen-Siderophoren in die Zelle verantwortlich ist.<sup>75; 76</sup> Es wird daher vermutet, dass TolA ebenfalls an der Aufnahme von Nährstoffen beteiligt ist. Der TolQRA-Komplex spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Membranintegrität. Die Deletion eines der Gene verursacht im entsprechenden Deletionsstamm ein Ausströmen periplasmatischer Proteine sowie eine erhöhte Sensibilität gegenüber Detergenzien.<sup>74; 77</sup>

Der genaue Abstand von TolAC zur äußeren Membran ist nicht bekannt. Aussagen darüber, wie es zur Interaktion zwischen dieser Domäne und der N1-Domäne des Phagen-G3P kommt, können daher nicht getroffen werden. Es wird jedoch vermutet, dass durch die Bindung die Wechselwirkung einer kurzen Sequenz von 28 AS der CT-Domäne des gleichen G3P-Moleküls mit dem für die Infektion essentiellen TolQRA-Komplex ermöglicht wird.<sup>16</sup> Die daraufhin verursachte Konformationsänderung in der CT-Domäne führt zur Insertion ihres hydrophoben Ankers in die innere Membran<sup>15; 16</sup> und damit zur Öffnung der Phagenhülle, wodurch die ssDNA in das Cytosol gelangt.<sup>16; 78</sup>

Für eine Infektion der Wirtszelle sind demnach nicht nur Interaktionen der drei Domänen des G3P des fd Phagen notwendig, zusätzlich müssen die N2- und N1-Domäne dissoziieren, damit letztere mit dem sekundären Rezeptor TolAC interagieren kann. Wie genau die Wechselwirkung von N2 mit dem Pilus zur Öffnung der Domänen führt, ist nicht geklärt. Lediglich die Bindungsstelle konnte bisher ermittelt werden. Sie befindet sich an der Außenseite des globulären Teils der N2-Domäne (Abbildung 1.2).<sup>68</sup>

Die Bindung der N1-Domäne an TolAC ist dagegen gut charakterisiert. Die Kristall- bzw. NMR-Struktur des sehr stabilen Komplexes (Dissoziationskonstante  $K_D \approx 0,2 \mu\text{M}$ )<sup>79; 80</sup> zeigen, dass die Interaktionen zwischen den Domänen unter anderem über die Ausbildung eines achtsträngigen, intermolekularen  $\beta$ -Faltblattes vermittelt wird.<sup>81</sup> Eine zusätzliche Analyse der Strukturen mit dem Programm PISA (*Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*)<sup>82</sup> hat ergeben, dass der Komplex durch drei Salzbrücken zwischen den Proteinen stabilisiert wird.<sup>83</sup> Der Vergleich mit der Struktur des G3P\* bestätigt zudem, dass die Bindungsstellen von TolAC und der N2-Domäne auf der N1-Domäne sehr stark überlappen.<sup>81; 84</sup>

Neben den drei Ff Phagen f1, fd und M13 sind mit dem IF1 und IKE Phagen zwei weitere filamentöse Phagen bekannt, die *E. coli* Zellen zur Propagation verwenden.<sup>85-88</sup> Sie besitzen jedoch eine andere Wirtsspezifität, da sie im Gegensatz zu den Ff Phagen während der Infektion I- bzw. N-Pili als primäre Rezeptoren nutzen.<sup>86; 89</sup> Für die Infektion ist wiederum ihr G3P essentiell, welches ebenfalls modular aus zwei N-terminalen und einer CT-Domäne aufgebaut ist. Genau wie im fd G3P sind dabei die N1- und N2-Domäne für Interaktion mit dem Pilus bzw. dem sekundären Rezeptor TolAC und die CT-Domäne für die Verankerung in der Phagenhülle verantwortlich.<sup>90; 91</sup>

Die TolAC-Bindedomänen des IF1 und IKE Phagen weisen gegenüber der N1-Domäne des fd Phagen Sequenzidentitäten von 31 % bzw. 43 % auf.<sup>91; 92</sup> Die Sequenzen der funktionell homologen Pilusbindedomänen sind dagegen sehr verschieden, was nicht nur Auswirkung auf die Wirtsspezifität sondern auch den Infektionsmechanismus der Phagen hat.<sup>91; 93; 94</sup> Im IKE bzw. IF1 G3P liegen die N-terminalen Domänen nicht in assoziierter Form vor. Die Interaktionsfläche für den sekundären Rezeptor auf der TolAC-Bindedomäne wird demnach nicht durch die andere N-terminale Domäne blockiert, sondern ist permanent zugänglich. Während der Infektion ist also keine Dissoziationsreaktion der beiden N-terminalen Domänen erforderlich.<sup>91; 94; 95</sup>

Der vereinfachte Infektionsmechanismus der Phagen IF1 und IKE korreliert mit der intrinsisch hohen Stabilität ihrer jeweiligen Pilusbindedomäne, die eine Entkopplung von der anderen N-terminalen Domäne ermöglicht.<sup>91; 95</sup> Die mit dem Pilus wechselwirkende N2-Domäne des Phagen fd ist dagegen in isolierter Form sehr instabil. Ihr Übergangsmittelpunkt ( $T_M$ -Wert) wird erst über die Interaktion mit der stabileren N1-Domäne deutlich von 35 °C auf 48 °C erhöht, wodurch jedoch die Bindungsstelle auf der N1-Domäne für TolAC verborgen wird.<sup>79</sup> Aus diesem Grund kommt der fd Phage in zwei Zuständen vor. In der geschlossenen Form ist durch die Domänenassemblierung die Stabilität soweit erhöht, dass das G3P vor Proteolyse geschützt ist. Während der Infektion führt dagegen die Wechselwirkung von N2 mit dem Pilus zur Dissoziation der Domänen, wodurch die aktive Konformation gebildet wird, in der N1 für TolAC zugänglich ist.<sup>96; 97</sup>

Barbara Eckert konnte zeigen, dass die Aktivierung der Phagen für die Infektion von *E. coli* Zellen auch *in vitro* möglich ist. Dazu inkubierte sie fd Phagen bei 65 °C für 10 min um das G3P zu entfalten und dadurch die Interaktionen zwischen den Domänen aufzulösen. Nach anschließender Überführung der Phagen in Rückfaltungsbedingungen waren diese in der Lage auch F-Zellen zu infizieren, denen der Pilus zur Aktivierung des G3P fehlt.<sup>96</sup> Der durch die Rückfaltung des G3P gebildete infektiöse Zustand bleibt jedoch nicht permanent populiert, sondern der Phage geht in Abhängigkeit der Rückfaltungsdauer wieder in die stabilere, jedoch passive Form über. Die Zeitkonstante dieser Inaktivierung ist jedoch mit 5700 s sehr hoch. Das Zeitfenster reicht daher aus, damit die anderen Domänen des G3P mit dem TolQRA-Komplex in der Membran der *E. coli* Zelle interagieren können und damit die Infektion abgeschlossen wird.<sup>96</sup>

## 1.5 Prolylisomerisierung als limitierender Schritt der Phageninfektion

Der Stabilitätsunterschied zwischen isolierter N2-Domäne und N2 im G3P\* sowie die Regenerierung der inaktiven Form des Phagen lassen den Schluss zu, dass unter physiologischen Bedingungen die für den Wechsel zwischen den Zuständen notwendige Konformationsänderung des G3P mit der reversiblen Ent- und Rückfaltung zumindest eines Teils der N2-Domäne einhergeht. Mit einer Zeitkonstante von 5700 s ist diese Faltungsreaktion allerdings sehr langsam.

Die Faltung von Eindomänenproteinen erfolgt häufig innerhalb weniger Millisekunden bis Sekunden nach einem einfachen Zweizustandsmodell.<sup>98-101</sup> Der Faltungsmechanismus von Mehrdomänenproteinen ist dagegen deutlich komplizierter, da er sowohl von den Stabilitäten der einzelnen Domänen als auch der Stärke der eventuell vorhandenen Interaktionen zwischen diesen beeinflusst wird.<sup>102; 103</sup> Desweiteren kann die Faltung eines Proteins z.B. aufgrund der Bildung von Disulfidbrücken<sup>104</sup>, der Bindung von Cofaktoren<sup>105</sup> oder aber auch der Isomerisierung von Peptidylprolylbindungen stark verlangsamt sein.<sup>106</sup>

In einer Polypeptidkette sind aufeinanderfolgende AS über Peptidbindungen verknüpft, die aufgrund der  $sp^2$ -Hybridisierung des an der Bindung beteiligten Stickstoff- bzw. Kohlenstoffatoms partiellen Doppelbindungscharakter besitzen (Abbildung 1.3). Dieser schränkt die Rotationsfähigkeit der Bindung ein und ist daher indirekt für deren Planarität verantwortlich. Für die flankierenden  $C_\alpha$ -Atome ergeben sich durch diese Anordnung die zwei möglichen Konformationen *cis* und *trans*. Bedingt durch das Auftreten sterischer Hinderungen in der *cis*-Form liegen in Peptiden und Proteinen die meisten Peptidbindungen in der energetisch günstigeren *trans*-Konfiguration vor.<sup>107</sup>

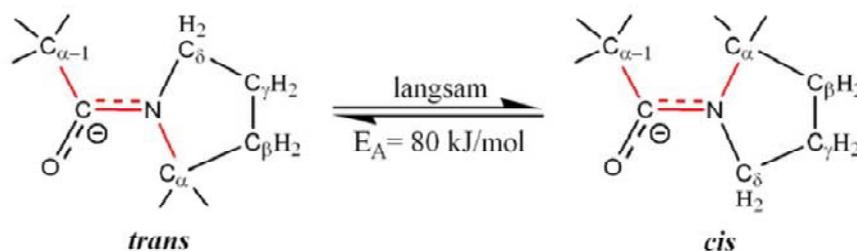


Abbildung 1.3: Isomerisierung zwischen der *cis*- und *trans*-Konformation einer Peptidylprolylbindung. In beiden Konformationen steht ein Kohlenstoffatom des Pyrrolidinrings ( $C_\alpha$  oder  $C_\delta$ ) dem  $C_\alpha$ -Atom der Aminosäure vor dem Prolinrest gegenüber.<sup>106</sup> Die Abbildung wurde Referenz<sup>79</sup> entnommen.

Eine Ausnahme stellt die Peptidbindung vor Prolin dar, deren *trans*-Konformer aufgrund der Orientierung des Pyrrolidinrings nur geringfügig gegenüber dem *cis*-Isomer bevorzugt wird (Abbildung 1.3). In gefalteten Proteinen befinden sich etwa 5-7 % aller Peptidylprolylbindungen in *cis*, wobei die Konformation zum großen Teil eindeutig definiert ist.<sup>108</sup> Mit Hilfe von hochauflösender NMR-Spektroskopie konnten jedoch unter anderem für humanes Interleukin-3<sup>109</sup>, Insulin<sup>110</sup> und die TB6-Domäne des humanen Fibrilin-1<sup>111; 112</sup> gezeigt werden, dass im nativen Zustand dieser Proteine Prolinreste im Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Form vorliegen. In den meisten Fällen wird die Heterogenität bedingt durch die

lokal entfaltete Umgebung des Prolinrestes, wodurch aufgrund der höheren Flexibilität der isomere Zustand nicht fixiert werden kann.<sup>111; 112</sup> Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass die Isomerisierung zwischen den beiden Konformationen als molekularer Schalter eingesetzt wird. So zeigt die SH2-Domäne der Tyrosinkinase Itk in Abhängigkeit von der Konformation des Prolinrestes 287 eine unterschiedlich starke Affinität zu seinen alternativen Substraten, der Itk-SH3-Domäne und einem phosphotyrosinhaltigen Peptid.<sup>113; 114</sup>

Entgegen früherer Vermutungen ist in der Regel der Übergang vom entfalteten Zustand in ein teilweise gefaltetes Intermediat auch dann möglich, wenn einige der Prolinreste noch in ihrer nicht-nativen Konfiguration vorliegen. Die anschließende Einnahme der nativen Konformation wird limitiert durch die Isomerisierung der unkorrekten Peptidylprolylbindung. Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Bindung ist die Energiebarriere zwischen den Isomeren allerdings sehr hoch (etwa  $80 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) und daher läuft die Reaktion mit Zeitkonstanten zwischen 10 und 100 s (bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) langsam ab.<sup>106; 115</sup> Sie ist jedoch durch sogenannte Prolylisomerasen wie Cyclophilin, den Triggerfaktor oder SlyD katalysierbar.<sup>116-119</sup>

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass auch die Zeitkonstante der Inaktivierung des fd Phagen, dessen N2-Domäne des G3P mit Pro161 im globulären Teil und Pro213 in der Gelenkregion gleich zwei *cis*-Prolinreste enthält (Abbildung 1.2), durch Cyclophilin18 deutlich beschleunigt wird.<sup>96; 120</sup> Da zudem der fd Phage, in dessen G3P Pro213 gegen Glycin ausgetauscht wurde, deutlich schneller in die assoziierte Form übergeht als der Wildtyp-Phage, konnte dieser in der Gelenkregion gelegene Prolinrest eindeutig als Zeitgeber der Lebensdauer des aktiven, geöffneten Zustandes identifiziert werden.<sup>96</sup> Die auch im Vergleich zu bekannten Prolylisomerisierungen in Peptiden und Proteinen verhältnismäßig langsame Rate von 5700 s wird dabei verursacht durch die lokale Sequenz um Pro213. Der Austausch eines der beiden flankierenden Reste Gln212 bzw. Pro214 (Abbildung 1.2) führt ebenfalls zu einer beschleunigten Einnahme der inaktiven Form des Phagen. Die lokale Sequenz um Pro213 des G3P fungiert demnach als Schalter der Infektion von *E. coli* Zellen durch den fd Phagen.<sup>96</sup>

### 1.6 Die Faltung des G3P\* korreliert mit dem Infektionsmechanismus des fd Phagen

Die Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes an Pro213 ist nicht nur der Zeitgeber für den Infektionsprozess sondern auch der ratenlimitierende Schritt während der Einnahme des nativen Zustandes des G3P. Dies konnte unter anderem anhand des Faltungsmechanismus des N1N2-Fragmentes der über die *Proside*-Methode stabilisierten Variante fd G3P\* IIHY gezeigt werden, in der teilgefaltete Intermediate besser charakterisiert werden konnten, da sie stabiler sind.<sup>121; 122</sup> Dieses Protein, in dem vor allem die N2-Domäne stark stabilisiert ist, beinhaltet mit T101I und Q129H zwei Substitutionen in der Gelenkregion. Die anderen beiden Austausche T13I und D209Y sind in der N1-Domäne bzw. dem globulären Teil der N2-Domäne lokalisiert (Abbildung 1.4a).

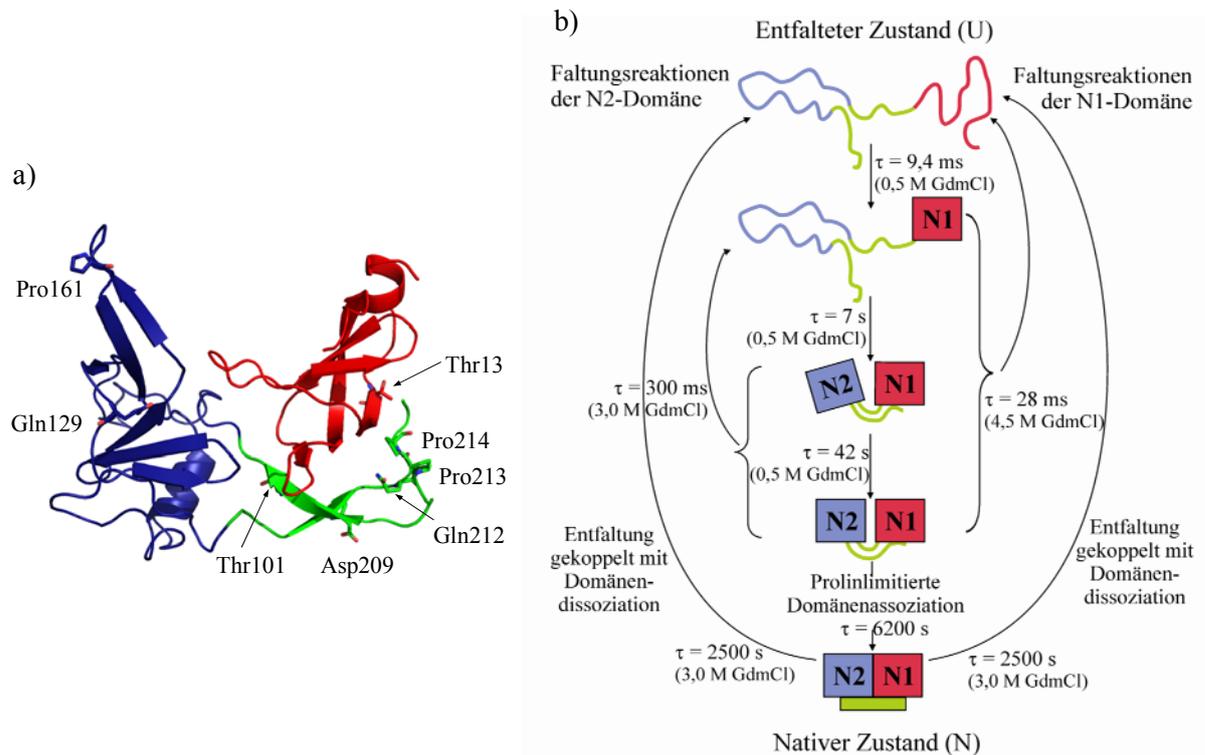


Abbildung 1.4: Der Faltungsmechanismus der stabilisierten Variante fd G3P\* IIHY.

a) Tertiärstruktur des N1N2-Fragments von WT fd G3P\*. Die Reste Pro161, Gln129, Pro213 und Pro214 sowie die Positionen der stabilisierenden Substitutionen im fd G3P\* IIHY sind als Stäbchen-Modelle gezeigt. Die N1-Domäne ist in rot, der globuläre Teil von N2 in blau und die Gelenkregion in grün dargestellt. Die Abbildung wurde anhand der PDB-Struktur 2G3P<sup>60</sup> mit dem Programm Pymol<sup>123</sup> erstellt. b) Modell des Faltungsmechanismus von fd G3P\* IIHY. Angegeben sind die Zeitkonstanten  $\tau$  der Entfaltungsreaktionen der beiden N-terminalen Domänen bei 3,0 bzw. 4,5 M GdmCl sowie die Rückfaltungsreaktionen in 0,5 M GdmCl. Zu Beginn der Rückfaltung geht zunächst die N1-Domäne in den nativen Zustand über (rotes Quadrat). Die Faltung der N2-Domäne (blaues Quadrat) erfolgt in zwei sequenziellen Schritten. Nach der konformationellen Faltung des globulären Teils kommt es nach dem Modell zur losen Assoziation der Domänen. Die Einnahme der nativen Konformation wird durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro213 verursacht, wodurch die Gelenkregion (grünes Rechteck) gefaltet wird. Aufgrund der Assoziation der Domänen ist ihre Entfaltung nicht nur deutlich verlangsamt, sondern auch gekoppelt. Die Abbildung wurde nach Referenz<sup>122</sup> modifiziert.

Nach dem gegenwärtigen Modell umfasst die Faltung des G3P\* einen Zeitbereich von wenigen Millisekunden bis zu mehreren Stunden, wobei der letzte Schritt durch die Isomerisierung von Pro213 in die *cis*-Konformation limitiert wird (Abbildung 1.4b).<sup>122</sup> Während der frühen Phase der Rückfaltung ausgehend von vollständig denaturiertem Protein (U) faltet zunächst die stabilere N1-Domäne ( $\tau = 9,4 \text{ ms}$  in 0,5 M GdmCl). Die Zeitkonstante entspricht dabei der der isolierten N1-Domäne, was zeigt, dass die Strukturierung von N1 im G3P\* unabhängig von der noch immer entfalteten N2-Domäne erfolgt. Diese faltet mit deutlicher Verzögerung in zwei sequenziellen Schritten. Die schnellere der beiden Phasen mit einer Zeitkonstante von 7 s spiegelt dabei die konformationelle Faltung ihres globulären Teils wider. Der zweite Schritt ( $\tau = 42 \text{ s}$  in 0,5 M GdmCl) wird der losen Assoziation der beiden gefalteten Domänen zugeschrieben.<sup>122</sup> Anhand von NMR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass in diesem Zustand ein großer Teil der Reste der Gelenkregion noch nicht in der nativen Konformation vorliegt.<sup>62</sup> Die

Bindungsstelle für den Membranrezeptor TolA auf der N1-Domäne ist in dieser Form folglich zugänglich. Da das Intermediat zudem langlebig ist, wird davon ausgegangen, dass es der aktiven Form des G3P des fd Phagen entspricht. Die abschließende Einnahme des nativen Zustandes (N) erfolgt durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung des Pro213, wodurch die Gelenkregion in den nativen Zustand übergeht. Mit einer Zeitkonstante von 6200 s liegt die Geschwindigkeit der Reaktion im Zeitbereich der Inaktivierung des fd Phagen ( $\tau = 5700$  s).<sup>96</sup>

Auch die Entfaltung des fd G3P\* IIHY wird durch die Konformation seines Pro213 beeinflusst. Ausgehend von nativem Protein mit *cis*-Pro213 entfalten die assemblierten Domänen in einphasigen Prozessen mit der gleichen langsamen Geschwindigkeit ( $\tau = 2500$  s in 3 M GdmCl, Abbildung 1.4).<sup>122</sup> Die Isomerisierung des Prolinrestes in der Gelenkregion ist unter diesen Bedingungen demnach der ratenlimitierende Schritt der Entfaltung beider Domänen. Während der Infektion werden dagegen durch die Interaktion der N2-Domäne mit dem Pilus die *cis*→*trans*-Isomerisierung des Pro213 und damit Dissoziation der Domänen initiiert. Aus dem entsprechenden Intermediatzustand des G3P\* mit *trans*-Pro213 ist die Entfaltung der beiden Domänen nicht nur deutlich beschleunigt sondern auch voneinander entkoppelt.<sup>122</sup>

## 1.7 Problemstellung

Der Faltungsmechanismus des fd G3P\* IIHY bestätigt, dass das G3P des Phagen für die Infektion der *E. coli* Zellen zunächst aktiviert werden muss. Die dafür notwendige Dissoziation von N1 und N2 wird hervorgerufen durch die *cis*→*trans*-Isomerisierung des Pro213, in Folge der es zur partiellen Entfaltung der Gelenkregion und damit der Destabilisierung der N2-Domäne kommt. Bei der Untersuchung der Auswirkungen zusätzlicher destabilisierender Austausche in der N2-Domäne auf die Stabilität und den Faltungsmechanismus des G3P\* hat sich jedoch gezeigt, dass diese sehr stark vom jeweiligen Substitutionshintergrund abhängen. Während einige Austausche im Wildtyp-G3P\* (WT fd G3P\*) zu einer drastischen Abnahme der Stabilität der N2-Domäne und der Entkopplung der Entfaltung der Domänen führte, wurde ihr Effekt durch die in der stabilisierten Variante enthaltenen Substitutionen fast vollständig kompensiert. Aus diesem Grund sollte in Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst die von Roman Jakob begonnene Untersuchung der Faltung des natürlichen G3P\* abgeschlossen werden.

Anhand der Analyse wurde deutlich, dass das natürliche G3P\* im Gegensatz zur stabilisierten Variante während der Rückfaltung keine lose-assoziierte Konformation einnimmt. Die N2-Domäne in WT fd G3P\* wird analog zu ihrer isolierten Form lediglich durch die Isomerisierung des Prolinrestes 161 in seine native *cis*-Konformation stabilisiert. Es stellte sich daher die Frage, inwieweit die Ent- und Rückfaltungsreaktionen des WT fd G3P\* nicht nur durch die Isomerisierung des Pro213 sondern auch des Pro161 beeinflusst werden. Um dies zu klären, wurden zusätzlich die Faltung der G3P\*-Varianten mit den Substitutionen P161A bzw. P213G untersucht.

Von der Wechselwirkung zwischen den beiden N-terminalen Domänen hängt nicht nur die Stabilität der N2-Domäne, sondern auch die Zugänglichkeit der Bindungsfläche für TolAC auf der N1-Domäne ab. Daher war zu erwarten, dass die geöffnete Form des WT fd G3P\* deutlich besser mit TolAC interagieren kann als die des fd G3P\* IIHY. Die Schaltersequenz Gln212-Pro213-Pro214 beeinflusst ebenfalls die Population des aktiven Zustandes, da sie über die Geschwindigkeit der Prolylisomerisierung die Öffnungs- und Schließrate der Domänen vorgibt. Durch die Kombination von *in vivo* und *in vitro* Experimenten sollte daher analysiert werden, wie sich der Faltungszustand des G3P\* und die Variation der lokalen Sequenz um Pro213 auf die Affinität des G3P für TolAC auswirkt.

Während der Infektion werden die notwendige Isomerisierung von Pro213 und die daran gekoppelte Dissoziation der Domänen durch die Bindung der N2-Domäne an die Spitze des Pilus ausgelöst. Welche strukturellen Veränderungen durch diese Interaktion hervorgerufen werden und welche Bereiche des G3P an der Weiterleitung des Signals zur Gelenkregion beteiligt sind, ist jedoch nicht bekannt. Anhand der Substitution einer Schleifensequenz in der Interaktionsfläche der beiden Domänen, die Deletion des distalen Glycin-Serin-reichen Linkers sowie den Austausch der N1-Domäne durch die homologe N1-Domäne des Phagen IF1 sollte der Einfluss dieser Strukturelemente auf die Assoziationsfähigkeit der N-terminalen Domänen analysiert werden. Diese Information ermöglicht Rückschlüsse auf weitere, für die Stabilisierung des gedockten Zustandes essentielle, Interaktionen im G3P, die folglich während der Dissoziation der Domänen aufgehoben werden müssen.

Mit Hilfe des Selektionssystems *Proside*, das die Infektiosität des fd Phagen an die proteolytische Stabilität des eingebauten Gastproteins koppelt, konnten für das G $\beta$ 1-Protein mehrere stabilisierende Substitutionen identifiziert werden. Die Kombination der besten Austausche ergab die Variante G $\beta$ 1-M2, die im Vergleich zum Wildtyp-Protein einen deutlich höheren Schmelzpunkt besitzt. Im zweiten Teil der Arbeit sollten die energetischen und strukturellen Grundlagen dieser Stabilisierung analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass diese unter anderem durch die Ausbildung von Dimeren verursacht wird, die auch durch die Variation der Lösungsmittelbedingungen nicht unterbunden werden konnte. Da die Stabilität der monomeren Form über Gleichgewichtsentfaltung nicht zugänglich war, sollte anhand der Faltungskinetiken der Variante versucht werden, die konformationelle Faltung des Monomers von der Assoziations- bzw. Dissoziationsreaktion der Moleküle zu trennen. Aus dem Verlauf der Ent- und Rückfaltungsraten könnte dann unter anderem die freie Enthalpie der Entfaltung des Monomers bestimmt und damit eine Aussage über den stabilisierenden Effekt der vier enthaltenen Substitutionen getroffen werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> ( $r_K^- m_K^+$ ) <i>supE44 relA1 lac</i> [ <i>F'</i> <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )]	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	B <i>F'</i> <i>dcm ompT hsdS</i> ( $r_B^- m_B^-$ ) gal $\lambda$ (DE3)	
<i>E. coli</i> TG1	<i>F'</i> <i>traD36 lacIq Δ(lacZ)M15 proA+B+/supE Δ(hsdM-mcrB)</i> 5 ( $r_K^-, m_K^+$ <i>McrB</i> -), <i>thiΔ</i> ( <i>lac-proAB</i> )	
<i>E. coli</i> HB 2156	<i>supE thi-1 Δ(lac-pro-AB) Δ(mcrB-hsdSM)5</i> ( $r_K^-, m_K^+$ )	Referenz <sup>124</sup>

Der *E. coli* Stamm XL1 Blue wurde zur Produktion von Plasmid-DNA und zur Propagation des fd Phagen verwendet. Der Stamm wurde genauso wie die *E. coli* TG1 Zellen und der pilusfreie *E. coli* HB2156 Stamm für Infektionsexperimente benutzt. Der in dieser Arbeit näher untersuchte fd Phage basiert auf dem Phagemid fCKCBS.<sup>48; 125</sup>

Die Expression von Proteinen erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen. Als Vektor für die Klonierung und Expression der Protein-Varianten wurde das Plasmid pET11a (Amp<sup>R</sup>, NOVAGEN, Madison, USA) verwendet. Das in diesen Vektor klonierte Gen wurde dabei unter Kontrolle eines T7-Promotors gebracht.

#### 2.1.2 Nährmedien

dYT-Medium:	5 g l <sup>-1</sup> NaCl; 10 g l <sup>-1</sup> Hefeextrakt; 16 g l <sup>-1</sup> Pepton aus Casein
Nährböden:	dYT-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar

Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren (120 °C; 20 min; 2 bar) sterilisiert. Antibiotika zur Selektion auf Resistenzen wurden nach dem Autoklavieren als steril filtrierte Stammlösungen zu den Nährmedien gegeben (Amp: 300 μg ml<sup>-1</sup>, Cm: 25 μg ml<sup>-1</sup>).

#### 2.1.3 Enzyme, Proteine und Peptide

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (6 U/μl)	S. Hoffmann-Thoms (Bayreuth)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/μl)	MBI Fermentas (Vilnius, LT)
T4-DNA-Ligase (1 Weiss U/μl)	
T4-Polynukleotidkinase (10 U/μl)	
Restriktionsenzyme:	
<i>Bam</i> HI, <i>Nde</i> I (20 U/μl)	
BenchMark <sup>TM</sup> Proteinstandard	
bovines Serumalbumin (BSA 100x, 100 mg/ml)	NEB (Frankfurt a. Main)
Abz-Ala-Ala-Pro-Ala-Ala-pNa	Dr. G. Jahreis (MPI, Halle)

Die im Rahmen der Arbeit für Messungen verwendeten Proteine fd G3P\* G153D, fd G3P\* Q212A, fd G3P\* P212A, fd G3P\* P213G, sowie fd G3P\* IIHY P213G und fd G3P\* IIHY P161A wurden von

Barbara Eckert zur Verfügung gestellt.<sup>79</sup> Vor der Verwendung wurden diese Varianten, wie unter 2.9.2.3 beschrieben, einer Gelfiltrationschromatographie unterzogen. Die Varianten fd G3P\* AGA und isolierte N2-Domäne bzw. fd G3P\* APA wurden von Roman Jakob bzw. Johanna Koch hergestellt. Die Proteine fd G3P\* IIHY Δβ6 und fd G3P\* IIHY APA wurden von Stefan Lorenz bzw. Christian Wunschel erhalten.<sup>80; 126</sup> Von Anna Schneider wurde im Rahmen eines von mir betreuten Praktikums die Variante fd G3P\* EGDS gereinigt. Die Prolylisomerase hFKBP12+IF<sup>127</sup> wurde von Anne-Juliane Geitner zur Verfügung gestellt. Einige der Gβ1-Proteine wurden von Michael Wunderlich erhalten.<sup>128</sup>

#### 2.1.4 Oligodesoxyribonukleotide

Die zur Klonierung der jeweiligen Protein-Varianten bzw. zur Herstellung von Phagenvarianten verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma INVITROGEN (Karlsruhe, D) bezogen und sind in Tabelle 10.5 im Anhang aufgeführt.

DNA-Längenstandards:

λ-DNA/*Eco* 130 I: 421-19329 bp  
bp-Leiter: 100-1500 bp

MBI Fermentas (Vilnius; LT)  
Johanna Koch (Bayreuth)

#### 2.1.5 Chemikalien

Imidazol, Chloroform/Isoamylalkohol, PEG-8000  
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG), Harnstoff  
1,5-IAEDANS (> 90%)  
Guanidiniumchlorid (ultra pure)  
Adenosin-5'-Triphosphat, Ampicillin, Acrylamid/ N,N'-  
Methylenbisacrylamidlösung (37,5:1 "Rotiphorese 30"),  
Desoxyribonukleotide, EDTA, Ethidiumbromid,  
Glutathion ox. (GSSG), Glutathion red. (GSH),  
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED),  
N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin),  
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris),  
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid (TCEP)  
Agarose, APS, SDS  
Coomassie Brillinat Blue G-250, Silica (S-5631),  
Bromphenolblau

Fluka (Neu-Ulm)  
Gerbu (Gaiberg)  
MP (Biomedicals, Irvine, USA)  
Roth (Karlsruhe)  
Serva (Heidelberg)  
Sigma Aldrich (Deisenhofen)

Alle weiteren Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. von der Firma VWR (Darmstadt) bezogen. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde mit einer Seralpur-Reinstwasseranlage deionisiert (ddH<sub>2</sub>O, Leitfähigkeit < 0,1 μS cm<sup>-1</sup>). Puffer für spektroskopische Messungen wurden durch 0,45 μm-Nylonfilter filtriert und vor Gebrauch mindestens 30 min lang entgast.

#### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Ni-NTA-Superflow-Agarose-Säule  
NAP-5 und -10 Säulen (Sephadex G-25 DNA-grade),

Qiagen (Hilden)  
GE Healthcare (Freiburg, D)

Gelfiltrationssäule HiLoad Superdex 75

(16/60 und 26/60 prep grade)

Fractogel EMI TMAE-650 Anionenaustauschersäule

Konzentratoren Amicon Ultra-15(3,5 kDa Ausschluss),

Millipore Filter Typ VS 0,025 µm

Spectropor Dialyseschläuch (>3,5 kDa)

Rotilabor Spritzenfilter (0,45; 0,2 µm)

Membranfilter (0,2 µm)

Millipore (Billerica, USA)

Spectrum (Los Angeles, USA)

Sarstedt (Nümbrecht)

Schleicher & Schuell (Dassel)

### 2.1.7 Geräte

DX.17MV *sequential*

*stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer

Transilluminator 302 nm

Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B*plus*

Rotoren GS-3 und SS-34

Zentrifuge 5415 R, Mastercycler Gradient,

Thermomixer 5436

FPLC-Anlage, ÄKTA-FPLC (academic edition),

Vertikalelektrophoresekammer 2050 MIDGET

und Netzgerät 2301 Macro

Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil

Laborfuge 400 R

Zentrifuge Z 216 MK

Zentrifuge 5415 R

Refraktometer

*Bio-Print Darkroom* CN-UV/Vis

Microfluidizer M-110L

Thermocycler PTC 100

*environmental incubator* shaker G24,

Innova 3000, *incubator* shaker C24

*Easyject* Prima Elektroporationsapparatur

Laborwaage L610D, Analysenwaage R200D

Wasseraufbereitung: Seralpur pro 90 CN

UV/VIS-Dioden-Array Spectrometer 8452A

Hitachi-Fluoreszenzspektrophotometer F-4010

Spektropolarimeter Jasco J-600, Peltierelement PTC-348

Jasco-Fluoreszenzspektrophotometer FP-6500

VP-DSC Mikrokolorimeter

UV/Vis-Spektrophotometer: Cary 100 Bio

Membran-Vakuumpumpe

Mikroprozessor pH-Meter: WTW pH 537

Applied Photophysics,

(Leatherhead, GB)

Bachhofer (Reutlingen)

Du Pont (Bad Homburg)

Eppendorf (Hamburg)

GE Healthcare (Freiburg)

Hellma (Mühlheim)

Heraeus (Hanau)

Hermle (Wehingen)

Eppendorf (Hamburg)

Krüß (Hamburg)

LTF-Labortechnik (Wasserburg)

Microfluidics (Newton, USA)

MJ Research (Watertown, USA)

New Brunswick Scientific

(Edison, USA)

Peqlab (Erlangen)

Sartorius (Göttingen)

Seral (Ransbach)

Hewlett-Packard (Waldbronn)

Hitachi (Tokio, J)

Jasco (Groß-Umstadt)

MicroCal (Northampton, USA)

Varian (Darmstadt)

Vakuubrand (Wertheim)

WTW (Weilheim)

### 2.1.8 Computerprogramme

Biocapt

BioEdit

LTF-Labortechnik (Wasserburg)

Hall, T. (Ibis Therapeutics, USA)

Chromas 1.4.5	Technelysium (Helensvale, AUS)
Grafit 3.0 / 5.0	Erithacus (Middlesex, UK)
ImageJ 1.30v	Rasband, W. (NIH, Bethesda, USA)
Origin 5.0	OriginLab Corporation (USA)
Pymol	DeLanoScientific (San Francisco, USA)
Scientist 2.01	Micromath (St. Louis, USA)
Swiss-Pdb Viewer Version 3.7	GlaxoSmithKline (München, D) <sup>129</sup>
DynaFit	Referenz <sup>130; 131</sup>

## 2.2 Gelelektrophoretische Methoden

### 2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (1x):	40 mM Tris/HCl, pH <sup>RT</sup> 8,0; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA
Probenpuffer (6x):	4 M Harnstoff; 10 mM EDTA; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 50 % (v/v) Glycerin

Zur präparativen Reinigung von DNA-Fragmenten und Plasmide sowie der Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Methode der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Je nach Größe der zu analysierenden Fragmente wurde die Konzentration an Agarose zwischen 0,6 und 3,0 % (w/v) variiert. Die Proben wurden mit  $\frac{1}{6}$  Volumen an Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte 30 min lang in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit 0,5x TAE-Puffer und einer angelegten Spannung von 6 V pro cm Elektrodenabstand. Zur Färbung der DNA-Banden wurde das Gel in Ethidiumbromid-Färbelösung (ca.  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) 5 min lang gelegt. Nach kurzer Entfärbung in 0,5x TAE-Puffer wurden die DNA-Banden unter UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) identifiziert.

### 2.2.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgel:	4,2 % (w/v) Acrylamid (Stammlösung mit 37,5:1 Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid); 0,75 M Tris/HCl, pH <sup>RT</sup> 8,45; 0,07 % (w/v) SDS
Trenngel:	2,5 % (w/v) Acrylamid (Stammlösung s.o.); 1 M Tris/HCl, pH <sup>RT</sup> 8,45; 0,1 % (w/v) SDS
Probenpuffer (4x):	0,2 M Tris/HCl pH <sup>RT</sup> 7,0; 0,12 M DTE; 40 mM EDTA; 48 % (v/v) Glycerin; 15 % (w/v) SDS; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
Anoden-Puffer:	0,2 M Tris/HCl pH <sup>RT</sup> 8,9
Kathoden-Puffer:	0,1 M Tris/HCl pH <sup>RT</sup> 8,2; 0,1 M Tricin; 0,1 % (w/v) SDS
Färbelösung:	25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blue G
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure

Die Methode der Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow<sup>132</sup> wird verwendet, um denaturierte Proteine nach ihrer relativen Größe zwischen fünf und 100 kDa aufzutrennen, wobei Tricin als Folgeion eingesetzt wird. Zur Vorbereitung der Proben wurden die Proteinlösungen (etwa 2,5  $\mu\text{g}$ ) jeweils mit  $\frac{1}{4}$  Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung für 10 min in einem Wasserbad erhitzt. Die Gelelektrophorese wurde in einer gekühlten MIDGET-Vertikalelektrophoresekammer bei 7 °C durchgeführt. Für den Lauf der Proben durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 20 mA angelegt, welche zum Auftrennen der Proteine im Trenngel auf 45 mA erhöht wurde. Nach

Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden im Gel durch kurzes Erhitzen und 10-minütige Inkubation mit Färbelösung angefärbt. Die Entfärbung in Entfärbelösung erfolgte durch Erhitzen und anschließende Inkubation des Gels für mehrere Stunden bei RT.

## 2.3 Isolierung und Reinigung von DNA

### 2.3.1 Präparation doppelsträngiger DNA

Um doppelsträngige Plasmid- bzw. Phagen-DNA zu präparieren wurden Kulturen der jeweiligen *E. coli* Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 1,5 ml entnommen, abzentrifugiert und aus dem resultierenden Zellpellet mit Hilfe des *Pharmacia-FlexiPrep-Kit* (GE Healthcare, Freiburg, D) gemäß den Herstellerangaben die DNA präpariert. Die Elution der DNA von der Anionenaustauschermatrix erfolgte mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

### 2.3.2 Präparation einzelsträngiger DNA

**TE-Puffer:** 10 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,0; 1 mM EDTA

Zur Isolierung einzelsträngiger Phagen-DNA wurde das nach 2.7.1 erhaltene Phagenpellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Um die Proteinhülle des Phagen zu entfernen, wurden 50 µl Phenol/Tris zugegeben, der Ansatz 30 s lang geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 1 min). Die ssDNA-haltige Oberphase wurde abgenommen und unter den gleichen Bedingungen eine Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung (Verhältnis 24:1) durchgeführt. Der Überstand wurde mit 300 µl Ethanol/ 3 M Na-Acetat (25:1), pH 5,2 versetzt und 15 min lang bei RT zur Präzipitation der ssDNA inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C) wurde das ssDNA-Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, 10 min bei RT getrocknet und in 30 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.3.3 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Waschpuffer: 50 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 7,5; 2,5 mM EDTA; 50 % (v/v) Ethanol

Silica-Suspension: 1 g Silica in 10 ml 3 M NaI

Zur Reinigung und Abtrennung von DNA-Fragmenten von solchen anderer Länge nach einem Restriktionsschnitt oder einer PCR wurde die DNA im Agarosegel aufgetrennt (2.2.1), das gewünschte Fragment ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Fragment wurden zwei Volumina 6 M NaI zugegeben und der Ansatz bei 55 °C 5 min lang geschüttelt, um das Gelstück vollständig zu lösen. Anschließend wurde ein geeignetes Volumen Silica-Suspension (10 µl enthalten 1 mg Silica, an das bei genügend hoher Ionenstärke ca. 3 µg DNA binden) hinzugefügt und der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurde das resultierende Pellet dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des Puffers wurde das in 30 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommene Pellet zur Elution der DNA bei 45 °C 5 min lang unter Schütteln eluiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Das gleiche Verfahren wurde in leicht abgewandelter Form auch zur Entsalzung von DNA z.B. nach

einer PCR verwendet. In diesem Fällen entfiel die Inkubation bei 55 °C zum Schmelzen des Gelstückes.

## 2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.4.1 Kolonie-PCR

MgCl<sub>2</sub>-freier *Taq*-Polymerase-Puffer (10x): 20 mM Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 9,0; 50 mM KCl; 0,1 % (w/v) TritonX-100

Die Kolonie-PCR wurde benutzt, um bestimmte DNA-Fragmente nachzuweisen bzw. auf ihre Länge hin zu überprüfen. Als Matrize wurde die in den Bakterienkolonien enthaltene DNA verwendet. Diese PCR-Methode diente ausschließlich analytischen Zwecken, weshalb die robustere, jedoch aufgrund des Fehlens der 3'-Exonucleaseaktivität fehleranfällige *Taq*-DNA-Polymerase zu Vervielfältigung der DNA eingesetzt wurde.

100 µl eines PCR-Ansatzes enthielten 10 µl *Taq*-Polymerase-Puffer, 10 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, je 2 µl 10 µM Primer, 2 µl 10 mM dNTPs, und 74 µl ddH<sub>2</sub>O, zu denen 2 µl *Taq*-DNA-Polymerase (6 U/µl) gegeben wurde. Zu je 10 µl des Ansatzes wurde anschließend Zellmaterial einer Kolonie gemischt. Bei dem Test auf erfolgreiche Klonierung wurden mit dem restlichen Zellmaterial der gepickten Kolonie 30 µl dYT-Medium als Vorkultur für eine ÜNK angeimpft. Der PCR-Ansatz wurde im Thermocycler auf 95 °C erhitzt und danach 39 Zyklen durchlaufen, welche zusammengesetzt waren aus 30 s Denaturierung der Stränge bei 95 °C, Anlagerung der Primer für 30 s bei 50 °C und Polymerisation (72 °C, Dauer abhängig von der Fragmentlänge). Zur Vervollständigung kürzerer Fragmente wurde der Ansatz abschließend einmal für 10 min bei 72 °C inkubiert. Zur Überprüfung des Produktes wurde der Ansatz wie unter 2.2.1 beschrieben mit Probenpuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 2.4.2 Einführung von Mutationen mittels *blunt-end* Mutagenese

*Pfu*-Polymerase-Puffer (10x): 0,2 M Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 8,8; 0,1 M KCl; 0,1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 % Triton X-100; 1 mg ml<sup>-1</sup> BSA

T4-DNA-Ligase Puffer (10x): 0,4 M Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M MgCl<sub>2</sub>; 0,1 M DTT; 5 mM ATP

Mit Hilfe der *blunt-end* Mutagenese können gezielt einzelne Mutationen eingefügt oder zusätzliche DNA-Fragmente in zyklische DNA-Moleküle eingebaut bzw. daraus entfernt werden. Die hier verwendeten Primer, von denen lediglich einer die Mutation trägt, grenzen mit ihren 5'-Enden aneinander. Bei Verlängerung der Primer während der PCR hat dies zur Folge, dass die gesamte dsDNA als lineares Fragment vervielfältigt wird. Die PCR erfolgte in einem 50 µl Ansatz unter den in 2.4.1 angegebenen Bedingungen. Zur DNA-Synthese wurde allerdings die genauere *Pfu*-Polymerase verwendet, wobei auf eine ausreichende Polymerisationszeit (2 min pro kb DNA-Länge) geachtet wurde.

Nach der Überprüfung des Erfolges der *blunt-end* PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese 2.2.1 wurde der Ansatz nach 2.3.3 gereinigt und die 5'-Enden der linearen Fragmente für eine effizientere Zyklisierung phosphoryliert. Dafür wurden zu 24 µl linearer DNA 3 µl 10 mM ATP, 3 µl T4-DNA-Ligase Puffer und 1 µl T4-PNK (10 U µl<sup>-1</sup>) gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 2 h lang bei 22 °C durch die Zugabe von 1,5 µl 10 mM ATP und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) die

Fragmente zirkularisiert. Nach der Inaktivierung der Ligase durch Inkubation bei 70 °C (15 min) wurde die DNA mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* (1 µl; 20 U µl<sup>-1</sup>) bei 37 °C über Nacht inkubiert, um methylierte bzw. hemimethylierte Templat-DNA abzubauen. Im Anschluss daran wurde die DNA, wie unter 2.6.1 beschrieben, in die *E. coli* Zelle eingebracht.

### 2.4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten

*Pfu*-Polymerase-Puffer (10x): 0,2 M Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 8,8; 0,1 M KCl; 0,1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 % Triton X-100; 1 mg ml<sup>-1</sup> BSA

Für die Herstellung von Proben zur Sequenzierung bzw. DNA-Fragmenten zur Klonierung in den Vektor pET11a wurden diese mittels PCR zunächst amplifiziert. Die PCR erfolgte unter den in 2.2.3.1 beschriebenen Bedingungen, wobei 50 µl Ansätze verwendet wurden. Diese bestanden aus 5 µl *Pfu*-Polymerase-Puffer, je 2 µl 10 µM Primer, 2 µl 10 mM dNTPs, und 39 µl ddH<sub>2</sub>O. Nach dem Aufheizen auf 95 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 U *Pfu*-Polymerase gestartet. Der Erfolg der PCR wurde wiederum mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.2.1) und die Fragmente wie unter 2.3.3 beschrieben, gereinigt.

### 2.4.4 Erzeugung von Genfragmenten anhand von *overlap extension PCR*

Zur Herstellung der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDK<sub>TL</sub>D</sub> IHY wurden die beiden Genfragmente der IF1-N1-Domäne und der fd-N2-Domäne mittels *overlap extension PCR* fusioniert. Im ersten Schritt wurden die zwei Genfragmente nach 2.4.3 anhand von Primern amplifiziert, die komplementäre Überhänge besitzen. Diese beiden Fragmente wurden in einem zweiten PCR-Ansatz unter Verwendung der flankierenden Primer als Templat-DNA verwendet, um so aufgrund ihrer komplementären Enden vereinigt und vervielfältigt zu werden. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1) überprüft und, wie in 2.3.3 beschrieben, gereinigt.

## 2.5 Klonierung verschiedener Proteinvarianten

### 2.5.1 Restriktion der DNA-Fragmente und des Vektors pET11a

Um geeignete Expressionskonstrukte der zu produzierenden Proteine zu erhalten, wurden die mittels PCR amplifizierten, gereinigten Fragmente (2.3.3) bzw. das nach 2.3.1 isolierte Plasmid pET11a einem Restriktionsschritt unterzogen. Dafür wurden Restriktionsendonukleasen verwendet, die doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen versetzt schneiden, wodurch Fragmente mit überstehenden Enden entstehen.

Zur Restriktion der DNA-Fragmente bzw. des Vektors wurden diese mit einem 1/10 Volumen des entsprechenden Puffers (10x), gegebenenfalls mit 1/100 Volumen an BSA und 10 U des Restriktionsenzym 2 h lang bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur (meist 37 °C) inkubiert. Nach der Reinigung der DNA (2.3.3) wurde diese mit dem zweiten Restriktionsenzym geschnitten. Die Ansätze wurden danach mittels eines präparativen Agarose-Gels elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1) und die DNA aus dem Gel eluiert (2.3.3).

## 2.5.2 Ligation

T4-DNA-Ligase Puffer (10x): 0,4 M Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M MgCl<sub>2</sub>; 0,1 M DTT; 5 mM ATP

Die Verknüpfung von geschnittenem Vektor und DNA-Fragment wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert, welche unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden realisiert. In einem 20 µl Ansatz wurden dazu 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer mit 9 µl geschnittenem, mutiertem DNA-Fragment, 5 µl geschnittenem pET11a Vektor, 4 µl ddH<sub>2</sub>O und 2U T4-DNA-Ligase gemischt und 4 h bei 22 °C inkubiert. Nach der Mikrodialyse von 8 µl des Ligationsansatzes wurden damit elektrokompente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert (2.6.1). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR überprüft und positive Klone durch Anlegen einer ÜNK in dYT-Medium kultiviert. Aus dieser wurde die Plasmid-DNA isoliert (2.3.1), das entsprechende Gen amplifiziert und durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen, D) auf den Genotyp überprüft. Von Klonen mit der gewünschten Sequenz wurde eine Glycerinkultur (300 µl 87% Glycerin + 600 µl der Kultur) angelegt und mit dem Plasmid *E. coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert (2.6.2).

## 2.6 Herstellung und Transformation von *E. coli* Zellen

### 2.6.1 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli* XL1 Blue Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* XL1 Blue Zellen wurden 500 ml dYT-Medium mit 1 ml einer ÜNK dieses *E. coli* Stammes angeimpft und bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> ≈ 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden 15 min lang auf Eis gestellt und anschließend 10 min lang bei 5000 rpm und 4 °C in einem GS-3-Rotor zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet zunächst mit 500 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O und dann mit 250 ml kaltem 10 % (v/v) Glycerin gewaschen (Zentrifugation jeweils 10 min, 5000 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 10 ml 10 % (v/v) Glycerin gelöst und erneut für 10 min im SS34-Rotor bei 6000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Die in 1,5 ml 10 % Glycerin resuspendierten Zellen wurden bis zum Gebrauch in 40 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren.

Von den Ligationsansätzen aus 2.4.2 bzw. 2.5.2 wurden 8 µl für 10 min gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert, bevor die dsDNA zu auf Eis aufgetauten elektrokompenten *E. coli* XL1 Blue Zellen gegeben wurde. Der gesamte Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Zellen durch einen elektrischen Puls (2500 V, 5 ms) transformiert. Sofort danach wurden die *E. coli* XL1 Blue Zellen mit 700 µl dYT-Medium versetzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension kurz zentrifugiert (30 s, 4000 rpm, 4 °C) und 500 µl des Überstandes entfernt. Die im restlichen Medium resuspendierten Zellen wurden auf dYT-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum (25 µg ml<sup>-1</sup> Cm bzw. 300 µg ml<sup>-1</sup> Amp) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 2.6.2 Herstellung und Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen

Mit einer ÜNK von *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurden 500 ml dYT-Medium angeimpft und bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,7 inkubiert. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und 15 min lang bei 4 °C zentrifugiert (7000 - 8000 rpm). Der Überstand wurde abdekantiert und das Zellpellet in 200 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (15 min, 4 °C, 5000 rpm) und das resultierende Pellet in 4 ml kalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-

Lösung resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurde 1 ml steriles Glycerin (Gesamtanteil 20 %) gegeben und diese zur Aufbewahrung in 200 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren.

Zu den auf Eis aufgetauten Zellen wurden 5 µl der in ddH<sub>2</sub>O gelösten Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz 15 min lang auf Eis inkubiert. Die Transformation selbst erfolgte durch einen Hitzeschritt bei 42 °C (45 s). Danach wurden die Zellen in 700 µl dYT-Medium aufgenommen und 5 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (30 s, 4000 rpm) und 500 µl des Überstandes entfernt. Nach Resuspendierung des Zellpellets in der Restflüssigkeit wurde die Zellen auf dYT-Agarplatten mit 300 µg ml<sup>-1</sup> Amp ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

## 2.7 Arbeiten mit Phagen

### 2.7.1 Propagation und Isolierung von fd Phagen

PEG-Lösung: 30 % PEG-8000; 1,5 M NaCl

PBS-Puffer: 80 g NaCl (1,37 M); 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

Zur Vermehrung von fd Phagen wurden 5 ml einer *E. coli* XL1 Blue Kultur (OD<sub>600</sub> ≈ 1) mit 50 µl der entsprechenden Phagensuspension (ca. 10<sup>10</sup>-10<sup>11</sup> cfu) versetzt. Die verwendeten Phagen enthalten in ihrem Genom das Gen der Chloramphenicolacetyltransferase, die den Translationshemmer Chloramphenicol (Cm) inaktiviert. Da diese erst nach 30 min voll aktiv ist, wurden erst nach dieser Zeitdauer 25 µg ml<sup>-1</sup> Cm zugegeben und die Kultur mindestens 8 h lang bei 37 °C inkubiert.

Zur Abtrennung der Phagen von den *E. coli* Zellen wurden 5 ml der ÜNK 5 min lang bei 4 °C zentrifugiert (12000 rpm) und durch einen Membranfilter (Porengröße 0,22 µm) steril filtriert. Durch Zugabe von 250 µl PEG-Lösung und Inkubation für 15 min bei RT wurden die Phagenpartikel gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4 °C, 12000 rpm) wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das Zellpellet in 50 µl PBS-Puffer bzw. ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.7.2 Infektion pilushaltiger *E. coli* XL1 Blue bzw. *E. coli* TG1 Zellen

Um die Infektiosität der unterschiedlichen Phagenvarianten gegenüber pilushaltigen (F<sup>+</sup>) *E. coli* Zellen zu bestimmen, wurden zu 495 µl einer *E. coli* XL1 Blue bzw. TG1 Kultur (OD<sub>600</sub> ≈ 0,7) 5 µl der entsprechenden Phagensuspension gegeben und der Ansatz 5 min lang bei 25 °C inkubiert. Phagen, die während dieser Zeit noch nicht infiziert hatten, wurden durch Zentrifugation der Zellsuspension (13000 rpm, 4 °C, 2 min) und Waschen des Zellpellets mit 500 µl dYT-Medium entfernt. Die in 500 µl resuspendierten Zellen wurden weitere 30 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl dieses Ansatzes verwendet, um in dYT-Medium auf Eis eine Verdünnungsreihe in 1:10-Schritten zu erstellen. 2 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf Cm-haltigen Nährböden aufgetragen und bei 37 °C inkubiert. Aus der Zahl der gewachsenen Kolonien ergibt sich unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors der Phagentiter (c.f.u. ml<sup>-1</sup>).

### 2.7.3 Infektion des pilusfreien *E. coli* HB2156 Stammes

Der fd Phage infiziert *E. coli* Zellen, indem er zunächst über die N2-Domäne seines G3P mit der Spitze des F-Pilus interagiert. Die Infektiosität des fd Phagen gegenüber pilusfreien (F-) Zellen wie den Bakterienstamm *E. coli* HB2156 ist daher nicht nur deutlich herabgesetzt, sondern außerdem nur

in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  möglich. Zum Test der Infektiosität der Phagenvarianten gegenüber diesen *E. coli* Zellen wurden zu 180  $\mu\text{l}$  einer entsprechenden Zellsuspension ( $\text{OD}_{600} \approx 1$ ) 10  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und 10  $\mu\text{l}$  Phagensuspension gegeben und der Ansatz analog zu 2.7.2 für 5 min bei 25 °C inkubiert. Nach dem Waschen des Zellpellets und Inkubation der in dYT-Medium resuspendierten Zellen (30 min, 25 °C) wurde anhand von Verdünnungsreihen der Phagentiter ( $\text{cfu ml}^{-1}$ ) ermittelt.

### 2.7.4 Vergleich der Infektiositäten verschiedener fd Phagen

Zum Vergleich der Infektiositäten von Phagen mit unterschiedlichen G3P-Varianten wurden jeweils in parallelen Ansätzen sowohl pilushaltige als auch pilusfreie *E. coli* Zellen der gleichen ÜNK infiziert (2.7.2 bzw. 2.7.3) und daraus die einzelnen Phagentiter relativ zu dem des jeweiligen Referenzphagen ermittelt. Dazu wurden die Phagenvarianten, wie unter 2.7.1 beschrieben, mittels Polyethylenglycol-Präzipitation isoliert. Um die relative Phagenkonzentration zu bestimmen, wurde aus 10  $\mu\text{l}$  der Phagensuspensionen die ssDNA präpariert (2.3.2) und der jeweilige DNA-Gehalt durch Analyse der Bandenintensitäten im Agarose-Gel verglichen. Für die Infektionstests (2.7.2 bzw. 2.7.3) wurden entsprechend der relativen Phagenkonzentrationen Phagenlösungen gleicher Konzentration eingesetzt.

### 2.7.5 Konkurrenzexperimente

Um zu untersuchen, ob die beiden Phagenvarianten fd G3P GSEG und fd G3P GG, in deren G3P der Serin-Glycin-reiche Linker zwischen der N1- und N2-Domäne verkürzt worden war, im direkten Vergleich zum Wildtyp-Phagen einen Nachteil bei der Infektion haben, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Im gleichen Ansatz konkurrierte dabei jeweils eine der Phagenvarianten mit dem WT fd Phagen um die Infektion von *E. coli* TG1 Zellen. Während der ersten Infektionsrunde wurden steril filtrierte Suspensionen gleicher Phagenkonzentration im Verhältnis von 1:1 gemischt und mit 5  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Mischung 495  $\mu\text{l}$  einer *E. coli* TG1 Zellkultur (*m.o.i.* > 1) infiziert. Nach Inkubation bei 25 °C für 5 min wurden die Zellen gewaschen, um die Phagen zu entfernen und das resultierende Zellpellet in 500  $\mu\text{l}$  dYT-Medium aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 25 °C wurden 10  $\mu\text{l}$  des Ansatzes zur Bestimmung sowohl des Phagen- als auch Bakterientiters verwendet, indem 2  $\mu\text{l}$  jeder Verdünnungsstufe sowohl auf Cm-haltigen als auch auf Nährböden ohne Antibiotikum aufgetragen wurden. Darüber wurde überprüft, dass die Anzahl der Zellen nicht über der enthaltenen Phagen lag. Mit dem restlichen Ansatz wurden 5 ml Cm-haltiges dYT-Medium angeimpft. Nach 8 h Phagenpropagation wurden die Phagen aus dieser Kultur präpariert (2.7.1) und für eine weitere Infektion eingesetzt, wobei insgesamt vier Zyklen aus Infektion, Phagenpropagation und -präparation durchgeführt wurden.

Zur Identifikation der Phagenvarianten, die die *E. coli* Zellen infiziert hatten, wurde nach jeder Runde eine geeignete Verdünnung auf Cm-haltigem dYT-Nährboden ausplattiert und mittels KPCR (2.4.1) und Agarose-Gelelektrophorese die Länge der Gensequenz des distalen Linkers zwischen N1- und N2-Domäne des G3P analysiert. Der PCR-Ansatz enthielt dazu die Primer g3pN1ssNa und TestN2Fragm(-) (Tabelle 10.5 im Anhang). Pro Infektionszyklus wurden mindestens 48 Klone untersucht.

## 2.8 Expression der Protein-Varianten

### 2.8.1 Test auf die Überexpression eines Proteins

Probenpuffer (4x): 0,2 M Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 7,0; 0,12 M DTE; 40 mM EDTA; 48 % (v/v) Glycerin; 15 % (w/v) SDS; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau

Um zu prüfen, ob in den mit den Expressionsplasmiden transformierten *E. coli* BL21 (DE3) Zellen das jeweilige Protein exprimiert wird, wurde die Zellen in 5 ml dYT-Medium mit 300 µg ml<sup>-1</sup> Amp bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,7 inkubiert. Der Kultur wurde ein Volumen mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 entnommen und zentrifugiert. Die Überexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C wurde wiederum die optische Dichte der Zellsuspension bei 600 nm gemessen und ein Volumen mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 zentrifugiert. Die beiden Pellets wurden in 30 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst, mit 10 µl Probenpuffer versetzt und, wie unter 2.2.2 beschrieben, einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese unterzogen. Durch Vergleich der Intensitäten der Proteinbanden vor und nach der Induktion konnte auf eine Überexpression geschlossen werden.

### 2.8.2 Fermentation und Zellaufschluss

dYT-Medium: 5 g l<sup>-1</sup> NaCl; 10 g l<sup>-1</sup> Hefeextrakt; 16 g l<sup>-1</sup> Pepton aus Casein

Lyse-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 8,0; 50 mM NaCl; 10 mM EDTA; 20 mM DTT

Die Expression der verschiedenen Proteine erfolgte je nach Variante im 2,5 bzw. 5 l Ansatz bei 37 °C. Das entsprechende Volumen an autoklaviertem Kulturmedium (dYT) wurde mit 300 µg ml<sup>-1</sup> Amp versetzt und mit einer ÜNK des jeweiligen *E. coli* BL21 (DE3) Expressionsstammes angeimpft. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,7 wurde die Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 5 h wurden die Zellen zentrifugiert (7 000 rpm; 10 min; 4 °C; GS-3-Rotor), das Pellet in 20 ml Lyse-Puffer pro Liter eingesetztem Medium resuspendiert und gegebenenfalls bis zum Zellaufschluss bei -80 °C gelagert.

Die (aufgetaute) Zellsuspension wurde 20 min lang mit 100 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym inkubiert und anschließend entweder mit Hilfe eines Mikrofluidizers oder über Ultraschall im Desintegrator (2 x 5 min, Intensität 0,5, Pulsbetrieb) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Zellfragmente und (falls vorhanden) auch *inclusion bodies* wurden durch Zentrifugation (SS-34-Rotor, 15000 rpm, 20 min, 4 °C) pelletiert.

## 2.9 Reinigung der Proteine

### 2.9.1 Reinigung der Gβ1-Varianten

#### 2.9.1.1 DNA-Fällung und Hitzeschritt

Die Gβ1-Proteine wurden aus der cytosolischen Fraktion, d.h. dem Überstand nach dem Zellaufschluss, isoliert. Die Fällung der enthaltenen DNA erfolgte durch Zugabe von 320 µl Polyethylenimin (50 % (w/v) in ddH<sub>2</sub>O) und Inkubation für 30 min bei RT. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 12000 rpm, 4 °C, SS-34-Rotor) wurde zur Fällung der weniger temperaturstabilen Proteine aus *E. coli* ein Hitzeschritt durchgeführt. Dazu wurde der Überstand für 20 min bei 70 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (20 min, 12000 rpm, 4 °C, SS-34-Rotor).

### 2.9.1.2 Anionenaustauschchromatographie

Auftragspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,0  
Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,0; 1 M NaCl

Nach dem Hitzeschritt wurde der Zellextrakt zunächst in Auftragspuffer einfach verdünnt und dann mit Hilfe einer P1-Pumpe (GE Healthcare, Freiburg, D) mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml min<sup>-1</sup> auf eine mit Auftragspuffer äquilibrierte Fractogel EMI TMAE-650 Anionenaustauschersäule aufgetragen. Nach Waschen mit Auftragspuffer für 70 min wurde durch einen gleichmäßig ansteigenden Gradienten an Elutionspuffer mit der Elution begonnen, wobei das Eluat in 5 ml Fraktionen (Elutionsgeschwindigkeit: 5 ml min<sup>-1</sup>) gesammelt wurde. Das Vorhandensein von Protein in den einzelnen Fraktionen wurde detektiert durch die gleichzeitige Messung der Absorption bei 280 nm. Die Fraktionen, in denen das Gβ1-Protein enthalten war, wurden vereinigt und mit Hilfe von Konzentratoren mit einem Ausschlussgewicht von fünf kDa (Amicon Ultra, Millipore) konzentriert.

### 2.9.1.3 Gelfiltrationschromatographie

Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,0

Die auf ein Volumen von 5 ml konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine in Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Hiload-Superdex<sup>TM</sup> 75 26/60 prep grade-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, Freiburg, D) aufgespritzt und aufgetrennt. Dazu wurde die beladene Säule zunächst 70 min lang mit Gelfiltrationspuffer gewaschen (Flussrate 2,5 ml min<sup>-1</sup>) und danach mit der Sammlung von 80 2,5 ml Fraktionen begonnen. Die Detektion des Proteins erfolgte wiederum durch Messung der Absorption bei 280 nm. Für die anschließenden Messungen wurden die Fraktionen, in denen das Gβ1-Protein enthalten war, vereinigt, auf ein Volumen von 2 ml konzentriert und bei -20 °C gelagert.

## 2.9.2 Isolierung der G3P\*-Varianten und der isolierten N1-Domäne aus *inclusion bodies*

### 2.9.2.1 Reinigung der *inclusion bodies*

Waschpuffer 1: 1 mM EDTA; 1 mg ml<sup>-1</sup> Desoxycholat; 20 mM DTT; pH<sup>RT</sup> 8,0  
Lyse-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 8,0; 50 mM NaCl; 10 mM EDTA; 20 mM DTT  
Waschpuffer 2: 0,1 M Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,5; 1 mM EDTA; 50 mM GSH

Die G3P\*-Varianten und die isolierte N1-Domäne des fd Phagen wurden nach dem Zellaufschluss und der anschließenden Zentrifugation (2.8.2) aus dem resultierenden Pellet gereinigt. Dazu wurde dieses in 15 ml Waschpuffer mit zusätzlich 0,2 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym gründlich resuspendiert und erneut zentrifugiert (20 min, 12000 rpm, 4 °C, SS-34-Rotor). Um die Zelltrümmer vollständig zu entfernen, wurden dieser Waschschrift noch dreimal mit je 10 ml Waschpuffer ohne Lysozym und dreimal mit je 10 ml Lysepuffer wiederholt. Abschließend wurden die *inclusion bodies* mit Waschpuffer 2 gewaschen, um das DTT zu entfernen.

### 2.9.2.2 Reduktive Entfaltung und oxidative Rückfaltung

Entfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,0; 1 mM EDTA; 6 M GdmCl; 50 mM GSH

Rückfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,5; 1 mM EDTA; 0,5 mM GSSG

Die in 2.9.2.1 gereinigten *inclusion bodies* wurden in 15 ml Entfaltungspuffer resuspendiert und unter ständigem Rühren 2 h lang bei RT inkubiert, um sie unter reduktiven Bedingungen zu entfalten. Die oxidative Rückfaltung der Proteine wurde durch schrittweise Überführung des Entfaltungsansatzes in Rückfaltungspuffer initiiert, wodurch die Proteinlösung zehnfach verdünnt wurde. Im Fall der G3P\*-Varianten wurde der Ansatz mindestens 6 h lang bei RT inkubiert, um die Einnahme des nativen Zustandes zu ermöglichen. Die bei der Rückfaltung auftretenden Aggregate wurden durch Zentrifugation entfernt (SS34-Rotor, 15000 rpm, 20 min, 4 °C).

### 2.9.2.3 Affinitätschromatographie und Gelfiltration

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M KCl, 10 mM Imidazol

Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M KCl; 0,5 M Imidazol

Gelfiltrationspuffer: 0,1 M Kaliumphosphat (KP), pH 7,0

Der nach der Zentrifugation in 2.9.2.2 erhaltene Überstand wurde zur Komplexierung des EDTA mit 50 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt und mit Hilfe eines Membranfilters (Porengröße 0,45 µm) filtriert. Der Ansatz wurde anschließend in 10 mM Imidazol mit einer Flussrate von 4 ml min<sup>-1</sup> auf eine mit Puffer A äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Schwach bindende Proteine wurden durch Waschen mit Puffer A bei einer Flussrate von 4 ml min<sup>-1</sup> entfernt. Die Elution des Proteins erfolgte durch die Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM. Das Totvolumen der Säule (5 ml) wurde verworfen und anschließend 25 ml als Eluat gesammelt. Zur Reinigung der Säule wurde diese mit 30 ml Puffer B und abschließend mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

Das proteinhaltige Eluat wurde auf 5 ml konzentriert und auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad Superdex 75 (16/60) prep grade-Säule aufgetragen und das gewünschte Protein mit einer Flussrate von 1,7 ml min<sup>-1</sup> eluiert. Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden auf ein Volumen von 1,5 ml konzentriert und bei -20 °C gelagert.

## 2.9.3 Reinigung der isolierten N1-Domäne des G3P des IF1 Phagen als SUMO-Fusion

### 2.9.3.1 Affinitätschromatographie zur Reinigung der SUMO-Fusionsproteine

Entfaltungspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,0; 0,1 M KCl; 50 mM β-Mercaptoethanol; 6 M GdmCl

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,0; 0,1 M KCl; 6 M GdmCl

Rückfaltungspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,0; 0,1 M KCl; 6 M GdmCl; 5 mM GSH; 1 mM GSSG

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M KCl; 10 mM Imidazol

Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M KCl; 0,5 M Imidazol

Die N1-Domäne des G3P des Phagen IF1 wurde als SUMO-Fusionsprotein isoliert. In diesem Konstrukt befindet sich der zur Reinigung verwendete (His)<sub>6</sub>-tag am N-terminalen Ende des SUMO-Proteins wodurch nach der Reinigung und Proteolyse tag-freie IF1-N1-Domäne erhalten wurde.

Trotz des zusätzlichen SUMO-Proteins bildet auch die IF1-N1-Domäne bei Überexpression *inclusion bodies*. Diese wurden, wie unter 2.9.2.1 für das G3P beschrieben, gereinigt und in 50 ml Entfaltungspuffer gelöst. Nach 2 h wurden verbliebene Zellfragmente durch Zentrifugation entfernt (SS34-Rotor, 15000 rpm, 20 min, 4 °C) und der Überstand über einen Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert. Der Ansatz wurde mit einer Flussrate von 4 ml min<sup>-1</sup> auf eine in Entfaltungspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen und mit 30 ml Waschpuffer gewaschen, um nichtbindende Proteine zu entfernen. Die Rückfaltung wurde induziert durch das Spülen der Säule mit 50 ml Rückfaltungspuffer (Flussrate: 2,5 ml min<sup>-1</sup>). Nach einem weiteren Waschschrift (30 ml Puffer A) wurde das Fusionsprotein in 250 mM Imidazol von der Säule eluiert. Die Konzentration des Proteins wurde über die Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt.

### 2.9.3.2 Abspaltung des SUMO-Proteins und weitere Reinigung der IF1-N1-Domäne

Dialysepuffer:	50 mM Tris/HCl, pH <sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M KCl
Puffer A:	50 mM Tris/HCl, pH <sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M KCl; 10 mM Imidazol
Puffer B:	50 mM Tris/HCl, pH <sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M KCl; 0,5 M Imidazol
Gelfiltrationspuffer:	0,1 M Kaliumphosphat (KP), pH 7,0

Das in 2.9.3.1 eluierte Fusionsprotein wurde in einen Dialyseschlauch gegeben (Ausschlussgröße 3,5 kDa) und über Nacht bei 4 °C in Gegenwart einer ausreichenden Menge der SUMO-Protease SenP2 (1 g Protease spaltet 150 g Fusionsprotein) gegen 1,5 l Dialysepuffer dialysiert. Dadurch wurde zum einen die IF1-N1-Domäne hydrolytisch vom SUMO-Protein abgespalten und gleichzeitig die Imidazolkonzentration verringert.

Während der anschließenden Affinitätschromatographie der dialysierten Lösung blieben sowohl das SUMO-Protein als auch die mit einem (His)<sub>6</sub>-tag versehene SUMO-Protease an der Säule gebunden, das gewünschte Protein befand sich dagegen im Durchbruch. Dieser wurde auf ein Volumen von 5 ml konzentriert und, wie unter 2.9.2.3 beschrieben, einer Gelpermeationschromatographie unterzogen. Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden wiederum auf ein Volumen von 1,5 ml konzentriert und bei -20 °C gelagert.

## 2.9.4 Reinigung der C-terminalen Domäne des TolA-Proteins

### 2.9.4.1 Affinitätschromatographie

Puffer A:	50 mM Tris/HCl, pH <sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M KCl; 10 mM Imidazol
Puffer B:	50 mM Tris/HCl, pH <sup>RT</sup> 7,8; 0,1 M KCl; 0,5 M Imidazol

Das TolAC-Protein (TolA AS 295-421+Cys-(Ala)<sub>3</sub>-(His)<sub>6</sub>) besitzt neben dem für die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff IAEDANS zusätzlich eingefügten Cysteinrest am C-Terminus einen (His)<sub>6</sub>-tag, der verwendet wurde, um das Protein aus der nach 2.8.2 erhaltenen, cytosolischen Fraktion zu isolieren. Dazu wurde diese mit 50 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt und anschließend mit Hilfe eines Membranfilters (Porengröße 0,45 µm) filtriert. Nach dem Auftrag des Ansatzes auf eine mit Puffer A

äquiliibrierte Ni-NTA-Säule (Flussrate 4 ml min<sup>-1</sup>) wurde diese zunächst mit 40 ml Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgt analog zu 2.9.2.3 durch Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM in einem Volumen von 25 ml, das durch Konzentration auf 1 ml verringert wurde.

#### 2.9.4.2 Reduktive Entfaltung und oxidative Rückfaltung des TolAC-Proteins

Entfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,0; 1 mM EDTA; 6 M GdmCl; 50 mM GSH

Rückfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH<sup>RT</sup> 8,5; 1 mM EDTA; 0,5 mM GSSG

Gelfiltrationspuffer: 0,1 M Kaliumphosphat (KP), pH 7,0

Neben dem zusätzlichen C-terminalen Cystein enthält TolAC zwei weitere Cysteinreste. Um eventuell während der Herstellung ausgebildete Fehlverbrückungen in den TolAC-Molekülen zu beheben, wurde das Protein zunächst unter reduktiven Bedingungen in 15 ml Entfaltungspuffer für 2 h entfaltet. Die Rückfaltung wurde analog zum G3P\* (2.9.2.2) durch zehnfache Verdünnung in Rückfaltungspuffer initiiert. Nach einstündiger Inkubation und anschließender Zugabe von 50 mM MgCl<sub>2</sub> wurde der Ansatz zentrifugiert, um eventuell entstandene Aggregate zu entfernen. Die weitere Reinigung des TolAC-Proteins erfolgte, wie unter 2.9.2.3 für das G3P\* beschrieben, mittels Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie. Die Proteinfractionen der Gelfiltration wurden vereinigt und bis auf ein Volumen von 1,5 ml konzentriert. Das gereinigte TolAC-Protein wurde bei -20 °C gelagert.

#### 2.9.5 Markierung des Rezeptorproteins TolAC mit IAEDANS

Markierungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH<sup>15 °C</sup> 8,0; 10 mM EDTA

TolAC-Stammlösung: 500 µM TolAC in 0,1 M Kaliumphosphat (KP), pH 7,0

Gelfiltrationspuffer: 0,1 M Kaliumphosphat (KP), pH 7,0

Im Gegensatz zur fd-N1- bzw. IF1-N1-Domäne enthält der Bindungspartner TolAC keine Tryptophanreste, weshalb die Wechselwirkung der Proteine anhand von Förster-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Experimenten analysiert werden konnte. Dazu wurde das gereinigte TolAC mit dem Fluoreszenzfarbstoff IAEDANS (5-(((2-Iodacetyl)amino)ethyl)amino)-naphthalin-1-sulfonsäure) markiert, der kovalent mit dem am C-Terminus befindlichen, zusätzlichen Cysteinrest verknüpft wurde. Während der nukleophilen Substitutionsreaktion ersetzt dabei das Thiolatanion des Cysteins das Iodatom, wodurch ein stabiler Thioether entsteht.

Zur Modifikation wurde die TolAC-Stammlösung mit 450 µl Markierungspuffer verdünnt und zunächst zur Reduktion des eventuell oxidierten Cysteins am C-Terminus 0,2 M TCEP zugegeben. Nach 20 min wurden 50 µl IAEDANS-Lösung (2 mg gelöst in 50 µl N,N-Dimethylformamid) zugegeben und in einem abgedunkelten Reaktionsgefäß 3 h lang bei 15 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen und überschüssiges IAEDANS bzw. niedermolekulare Substanzen zu entfernen, wurden hintereinander zwei Gelfiltrationsschritte an einer mit Gelfiltrationspuffer äquiliibrierten NAP<sup>TM</sup>-10-Säule durchgeführt. Die Konzentration an TolAC-AEDANS sowie die Markierungseffizienz wurden über die Messung der Absorption des Proteins bei 280 und 336 nm bestimmt.

## 2.10 Probenvorbereitung und Konzentrationsbestimmung

Zur Vorbereitung der Proteine für die spektroskopischen Untersuchungen wurden diese, falls nötig, zunächst mittels Gelfiltrationschromatographie an einer im entsprechenden Messpuffer äquilibrierten NAP<sup>TM</sup>-10- bzw. NAP<sup>TM</sup>-5-Säule in die gewünschten Pufferbedingungen überführt. Um eventuell vorhandene Aggregate abzutrennen wurden alle Proteinproben 30 min lang bei 4 °C zentrifugiert (13000 rpm).

Zur Bestimmung der Konzentration wurde von einer geeigneten Verdünnung der Proteinlösungen mit einem Cary 100 Bio UV-VIS-Spektrophotometer ein UV-Absorptionsspektrum im Bereich von 240 bis 350 nm (TolAC-AEDANS: 240 - 450 nm) aufgenommen. Als Referenz diente der entsprechende Messpuffer. Für die Messungen wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die Aufnahmegeschwindigkeit der Absorptionsspektren betrug 100 nm min<sup>-1</sup> bei einer Bandbreite von 2 nm und einer Auflösung von 0,5 nm. Anhand der Absorption bei 280 nm konnte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Proteinkonzentration berechnet werden. Die dafür notwendigen Extinktionskoeffizienten wurden nach der Methode von Gill & v. Hippel<sup>133</sup> bestimmt bzw. mittels des Programms ProtParam<sup>134</sup> berechnet:

fd G3P*	$\epsilon_{280} = 41900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
G3P*-Varianten mit der Substitution D209Y	$\epsilon_{280} = 43400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
isolierte N1-Domäne des fd G3P	$\epsilon_{280} = 21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
isolierte N2-Domäne des fd G3P	$\epsilon_{280} = 19700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
AEDANS	$\epsilon_{336} = 5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
AEDANS	$\epsilon_{280} = 880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
TolAC	$\epsilon_{280} = 5480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Chimäre fd G3P* IF1-N1 <sub>DDKTLD</sub> IHY	$\epsilon_{280} = 43400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
isolierte N1-Domäne des IF1 G3P	$\epsilon_{280} = 21095 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Gβ1-Varianten	$\epsilon_{280} = 9970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Gβ1-Varianten mit Y33X Substitution	$\epsilon_{280} = 8480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

## 2.11 Untersuchung der konformationellen Stabilität der Proteine

### 2.11.1 Thermisch-induzierte Denaturierung

#### 2.11.1.1 Messung thermisch-induzierter Entfaltungsübergänge

Die thermisch-induzierte Entfaltung der G3P\*-Varianten, ihrer isolierten Domänen, von TolAC sowie der verschiedenen Gβ1-Varianten wurde mittels Circular dichroismus an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter mit PTC-348 WI Peltier-Element untersucht. Als Signal diente jeweils die Änderung der Elliptizität bei einer definierten Wellenlänge. Die Entfaltungsübergänge wurden bei einer Bandbreite von 1 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen.

Der Übergang der isolierten N2-Domäne bzw. N2 in den G3P\*-Varianten konnte selektiv anhand der Abnahme des CD-Signals von 1 μM Protein bei 210 nm gemessen werden. Die Entfaltung der isolierten N1-Domäne und N1 in den G3P\*-Varianten wurde über die Änderung der Elliptizität von 4 μM Protein bei 230 nm verfolgt. Im zweiten Fall ergaben sich bis auf den Übergang der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY biphasische Verläufe, die die Denaturierung beider Domänen widerspiegeln. Die Messungen erfolgten jeweils in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Heizrate von

60 °C h<sup>-1</sup> und einer Dämpfung von 8 s. Die thermischen Übergänge der isolierten N1-Domänen des G3P des IF1-Phagen sowie TolAC wurden unter den gleichen Bedingungen, jedoch bei einer Wellenlänge von 222 nm und mit einer Dämpfung von 1 s detektiert.

Um die Abhängigkeit der Stabilität verschiedener Gβ1-Varianten von der Proteinkonzentration zu bestimmen, wurden deren thermische Übergänge mit 1, 4 bzw. 10 μM Proteinlösungen anhand der Zunahme des CD-Signals bei 222,6 nm gemessen. Die Heizrate während der Messungen in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 und zusätzlich 1,5 M GdmCl betrug 90 °C h<sup>-1</sup>.

### 2.11.1.2 Auswertung der Entfaltungsübergänge nach einem Zweizustandsmodell

Die thermischen Übergänge der isolierten Domänen N1 und N2, TolAC sowie die selektiv bei 210 nm gemessene Entfaltung der N2-Domäne im G3P\* des fd Phagen zeigen einen einphasigen Verlauf. Unter der Annahme des Zweizustandsmodells in Gleichung 1 steht dabei der native Zustand der Proteine im Gleichgewicht mit dem denaturierten Zustand. Der Quotient aus der Konzentration des entfalteten bzw. nativen Proteins ergibt dabei die Gleichgewichtskonstante  $K_U$  der Entfaltung (Gleichung 2), aus der sich die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G$  berechnen lässt (Gleichung 3).  $K_U$  selbst kann aus einer physikalischen Eigenschaft  $y_{obs}$ , wie z.B. der temperaturabhängigen Elliptizität eines Proteins bei einer definierten Wellenlänge, bestimmt werden (Gleichung 2).



$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{(y_N - y_{obs})}{(y_{obs} - y_U)} \quad \text{Gl. 2}$$

$$\Delta G = -RT \ln K_U \quad \text{Gl. 3}$$

$K_U$ : Gleichgewichtskonstante der Entfaltung;  $y_N$ ,  $y_U$ : physikalische Eigenschaft des nativen bzw. denaturierten Proteins;  $y_{obs}$ : Messgröße bei Vorliegen einer Mischung von N und U;  $\Delta G$ : freie Enthalpie der Entfaltung (in J mol<sup>-1</sup>);  $R$ : allgemeine Gaskonstante (in J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>);  $T$ : Temperatur (in K)

Unter den zwei Annahmen, dass die Änderung der molaren Wärmekapazität  $\Delta C_p$  konstant und die Grundlinien für natives und denaturiertes Protein linear verlaufen, lässt sich aus der Kombination von Gleichung 3 mit der Gibbs-Helmholtz-Gleichung durch Integration des Enthalpie- und des Entropieterms zwischen  $T_M$  und  $T$  die freie Enthalpie der Entfaltung berechnen (Gleichung 4).<sup>135; 136</sup> Gleichungen 5a und 5b geben dabei die lineare Änderung der Messgröße des nativen bzw. des entfalteten Proteins in Abhängigkeit der Temperatur wieder.

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_M) \cdot \frac{T_M - T}{T_M} - \Delta C_p \cdot \left[ T_M - T + T \cdot \ln \left( \frac{T}{T_M} \right) \right] \quad \text{Gl. 4}$$

$$y_N = y_N^0 + m_N \cdot T \quad \text{Gl. 5a}$$

$$y_U = y_U^0 + m_U \cdot T \quad \text{Gl. 5b}$$

$\Delta G(T)$ : freie Enthalpie des thermischen Übergangs (in J mol<sup>-1</sup>);  $T$ : Temperatur (in K);  $T_M$ : Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs (in K);  $\Delta H$ : van't Hoff Enthalpie der Entfaltung bei  $T_M$  (in J mol<sup>-1</sup>);  $\Delta C_p$ : Änderung der molaren Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck (in J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>);  $y_N$ ,  $y_U$ : physikalische Eigenschaft des nativen (N) bzw. denaturierten (U) Proteins;  $m_N$ ,  $m_U$ : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins;  $y_N^0$ ,  $y_U^0$ : auf  $T = 0$  K extrapoliert Werte für  $y_N$  und  $y_U$

Die Kombination der Gleichungen 2-5 ergibt Gleichung 6, worüber durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 3.0 bzw. Grafit 5.0 der Schmelzpunkt ( $T_M$ ) des thermischen Übergangs und die van't Hoff-Enthalpie  $\Delta H_D$  ermittelt wurden.

$$y(T) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot T + (y_U^0 + m_U \cdot T) \cdot \exp\left\{-\frac{\Delta H(T_M)}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_M}\right) - \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \left[1 - \frac{T_M}{T} + \ln\left(\frac{T_M}{T}\right)\right]\right\}}{1 + \exp\left\{-\frac{\Delta H(T_M)}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_M}\right) - \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \left[1 - \frac{T_M}{T} + \ln\left(\frac{T_M}{T}\right)\right]\right\}} \quad \text{Gl. 6}$$

$y(T)$ : Messgröße, hier gemessene Elliptizität (in Grad);  $y_N$ ,  $y_U$ : physikalische Eigenschaft des nativen (N) bzw. denaturierten (U) Proteins, wobei  $y^0$  jeweils die auf  $T = 0$  K extrapolierten Werte angibt;  $m_N$ ,  $m_U$ : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins;  $T_M$ : Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs (in K);  $\Delta H$ : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei  $T_M$  (in  $\text{J mol}^{-1}$ );  $\Delta C_p$ : Änderung der molaren Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck (in  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ );  $T$ : Temperatur (in K);  $R$ : allgemeine Gaskonstante (in  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )

Zur Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde für die G3P\*-Varianten eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von  $10000 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  für N2 und  $1000 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  für N1 angenommen.<sup>121</sup> Für die isolierten N2-Domänen wurden  $\Delta C_p$ -Werte von  $8000 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  und für TolAC ein Wert von  $6000 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  verwendet.<sup>79; 121</sup> Über die aus der Auswertung erhaltenen Werte für den Übergangsmittelpunkt  $T_M$  und die van't Hoff-Enthalpie  $\Delta H_D$  kann die konformationelle Stabilität des Proteins in Abhängigkeit der Temperatur berechnet werden (Gleichung 4).

### 2.11.1.3 Auswertung der Entfaltungsübergänge nach einem Dreizustandsmodell

Für die thermische Entfaltung des G3P\* bei 230 nm ergaben sich biphasische Übergänge. Während der Denaturierung wird demnach ein Intermediat gebildet (Gleichung 7). Die Auswertung dieser thermischen Übergänge erfolgte daher gemäß dem Dreizustandsmodell<sup>137</sup>, wobei die beiden Gleichgewichtskonstanten der Entfaltung  $K_1$  und  $K_2$  berücksichtigt werden mussten (Gleichung 8).



$$K_1 = \frac{[\text{I}]}{[\text{N}]} ; K_2 = \frac{[\text{U}]}{[\text{I}]} \quad \text{Gl. 8}$$

$K_1$ : Gleichgewichtskonstante des Übergangs von N nach I;  $K_2$ : Gleichgewichtskonstante des Übergangs von I nach U; N: natives Protein; I: Intermediat; U: entfaltetes Protein

Die Gesamtproteinmenge (P) berechnet sich aus der Summe der Konzentrationen an nativem Protein [N], Intermediat [I] und denaturiertem Protein [U] (Gleichung 9). Durch Kombination der Gleichungen 8 und 9 ergibt sich nach Umformung Gleichung 10, über die die Konzentration an denaturiertem Protein in Abhängigkeit der Gesamtkonzentration berechnet werden kann.

$$[\text{P}] = [\text{N}] + [\text{I}] + [\text{U}] \quad \text{Gl. 9}$$

$$[\text{U}] = \frac{K_1 \cdot K_2 \cdot [\text{P}]}{K_1 \cdot K_2 + K_1 + 1} \quad \text{Gl. 10}$$

Aus der Summe der Anteile des denaturierten Proteins ( $X_U$ ) und des Intermediats ( $X_I$ ) ergibt sich der apparente Anteil des denaturierten Proteins  $y_{app}$  (Gleichung 11). Der Parameter  $z$  entspricht dabei der optischen Ähnlichkeit des Intermediats mit dem entfalteten Zustand.

$$y_{app} = [X_U] + z \cdot [X_I]; \quad [X_U] = \frac{[U]}{[P]}; \quad [X_I] = \frac{[U]}{K_2 \cdot [P]} \quad \text{Gl. 11}$$

Die Kombination der Gleichungen 8-11 ergibt Gleichung 12, welche die über die Messgröße  $y(T)$  beobachtete Entfaltung in Abhängigkeit von der Temperatur beschreibt. Die Berechnung der Schmelztemperaturen für die beiden Domänen N1 und N2, sowie deren van't Hoff Enthalpien aus den thermischen Übergängen des G3P\* bei 230 nm, erfolgte anhand von Gleichung 12 wiederum durch nicht-lineare Regression unter Verwendung der Programme Grafit 3.0 und Grafit 5.0.

$$y(T) = y_N^0 + m_N T + \frac{1}{1 + K_2 + \frac{1}{K_1}} \cdot (K_2 + z) \cdot \left[ y_N^0 + m_U T - (y_N^0 + m_N T) \right] \quad \text{Gl. 12}$$

$$K_1 = \exp \left\{ -\frac{\Delta H_1}{R} \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{M,1}} \right) - \frac{\Delta C_{p,1}}{R} \left( 1 - \frac{T_{M,1}}{T} + \ln \frac{T_{M,1}}{T} \right) \right\}$$

$$K_2 = \exp \left\{ -\frac{\Delta H_2}{R} \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{M,2}} \right) - \frac{\Delta C_{p,2}}{R} \left( 1 - \frac{T_{M,2}}{T} + \ln \frac{T_{M,2}}{T} \right) \right\}$$

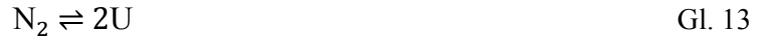
$y(T)$ : Messgröße, gemessene Elliptizität (in Grad);  $y_N, y_U$ : Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins;  $y_N^0, y_U^0$ : Werte für  $y_N$  und  $y_U$  auf  $T=0$  K extrapoliert;  $m_N, m_U$ : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins;  $T_{M,1}, T_{M,2}$ : Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs der 1. Domäne ( $T_{M,1}$ ) bzw. des Übergangs der 2. Domäne ( $T_{M,2}$ ) (in K);  $\Delta H_1, \Delta H_2$ : van't Hoff Enthalpie der Entfaltung bei  $T_{M,1}$  bzw.  $T_{M,2}$  (in  $\text{J mol}^{-1}$ );  $\Delta C_{p,1}, \Delta C_{p,2}$ : Differenz der molaren Wärmekapazitäten des denaturierten und nativen Proteins der bei  $T_{M,1}$  bzw.  $T_{M,2}$  entfaltenden Domäne (in  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ );  $z$ : optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem entfalteten Zustand;  $T$ : Temperatur (in K);  $R$ : allgemeine Gaskonstante (in  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )

Zur Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde für die G3P\*-Varianten eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von  $10000 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  für N2 und  $1000 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  für N1 angenommen. Die optische Ähnlichkeit wurde auf 0,2 festgelegt.<sup>79; 121</sup> Über die aus dem Angleich ermittelten Werte für  $\Delta H_D$  und die Schmelzpunkte konnte für jede der Domänen des G3P\* nach Gleichung 4 die freie Enthalpie berechnet werden.

#### 2.11.1.4 Auswertung der thermisch-induzierten Entfaltungsübergänge der Gβ1-Proteine

Da die Gβ1-Proteine in einem einphasigen Übergang entfalten, wurden der Verlauf ihrer thermischen Entfaltung ebenfalls nach dem einfachen Zweizustandsmodell  $N \rightleftharpoons U$  aus 2.11.1.2 ausgewertet. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass einige der Varianten eine deutlich erhöhte Tendenz zur Dimerisierung haben. Die Dissoziationskonstante der hyperstabilen Variante Gβ1-M2 befindet sich im Bereich von 30 nM, weshalb der Großteil der Moleküle bereits bei einer Proteinkonzentration von 1 μM als Dimer vorliegt. Die Entfaltung des Proteins ist folglich an die Dissoziation des Dimers gekoppelt. Im einfachen Fall entfaltet das Dimer direkt in den denaturierten,

jedoch monomeren Zustand (Gleichung 13). Die Gleichgewichtskonstante  $K_U$  dieser Entfaltungsreaktion ergibt sich nach dem Massenwirkungsgesetz aus dem Quotienten des Quadrates der Konzentration an denaturiertem Protein und der Konzentration des Dimers (Gleichung 14).



$$K_U = \frac{[U]^2}{[N_2]} = \frac{2C_t f_U^2}{(1 - f_U)} \quad \text{Gl. 14}$$

$K_U$ : Gleichgewichtskonstante der Entfaltung (in  $\mu\text{M}$ );  $[N_2]$ : Konzentration an nativem Dimer (in  $\mu\text{M}$ );  $[U]$ : Konzentration an entfaltetem Protein (in  $\mu\text{M}$ );  $C_t$ : Gesamtkonzentration an monomerem Protein (in  $\mu\text{M}$ );  $f_U$ : Anteil des entfalteteten Proteins

Unter der Annahme von Gleichung 13 ist  $K_U$  direkt proportional zur Gesamtkonzentration an monomerem Protein und lässt sich aus dem Anteil an entfaltetem Protein  $f_U$  ermitteln (Gleichung 14).<sup>138</sup> Dieser wiederum ergibt sich in Abhängigkeit der Temperatur aus der Messgröße des thermischen Übergangs ( $y_{\text{obs}}$ ) und den entsprechenden Signalen des gefalteten (N) und entfalteteten (U) Proteins (Gleichung 15).

$$f_U(T) = \frac{y_N(T) - y_{\text{obs}}(T)}{y_N(T) - y_U(T)} \quad \text{Gl. 15}$$

$f_U$ : Anteil des entfalteteten Proteins;  $y_{\text{obs}}$ : Messgröße bei Vorliegen einer Mischung von  $N_2$  und  $U$ ;  $y_N$ ,  $y_U$ : Signal des gefalteten (N) und entfalteteten (U) Proteins,  $T$ : Temperatur (in K)

Durch erneute Analyse der thermischen Übergänge von 1, 4 bzw. 10  $\mu\text{M}$  G $\beta$ 1-M2 wurde der Anteil an entfaltetem Protein und damit anhand von Gleichung 14 die jeweilige Gleichgewichtskonstante in Abhängigkeit von der Temperatur berechnet. Durch die Auftragung des natürlichen Logarithmus von  $K_U$  gegen das Inverse der Temperatur (van't Hoff-Auftragung) konnte nach Gleichung 16 durch lineare Regression der Werte im Übergangsbereich die apparente Enthalpie der Entfaltung des Dimers  $\Delta H_{\text{vH}}(\text{app})$  für die verschiedenen Konzentrationen an G $\beta$ 1-M2 berechnet werden.

$$\frac{\partial \ln K_U}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H_{\text{vH}}(\text{app})}{R} \quad \text{Gl. 16}$$

$K_U$ : Gleichgewichtskonstante der Entfaltung ( $\mu\text{M}$ );  $\Delta H_{\text{vH}}(\text{app})$ : apparente Enthalpie der Entfaltung des Dimers (in  $\text{J mol}^{-1}$ );  $T$ : Temperatur (in K);  $R$ : allgemeine Gaskonstante (in  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )

Die Abhängigkeit der Schmelztemperatur von der Konzentration des G $\beta$ 1-M2 ist zwar vorhanden, jedoch verhältnismäßig gering. In erster Näherung sind damit sowohl die Enthalpie der Entfaltung des Dimers,  $\Delta H_{\text{vH}}(\text{Dimer})$ , als auch die Entropie  $\Delta S_{\text{vH}}(\text{Dimer})$  unabhängig von der Temperatur. Unter dieser Voraussetzung ergibt sich nach Gleichung 17 die an die Dissoziation des Dimers gekoppelte Enthalpie der Entfaltung außerdem aus der Steigung der Auftragung von  $1/T_M$  gegen den natürlichen Logarithmus der Konzentration an Monomeren ( $C_t$ ).<sup>138</sup>

$$\frac{1}{T_M} = -\frac{R}{\Delta H_{\text{vH}}(\text{Dimer})} \ln C_t + \frac{\Delta S_{\text{vH}}(\text{Dimer})}{\Delta H_{\text{vH}}(\text{Dimer})} \quad \text{Gl. 17}$$

### 2.11.1.5 Kalorimetrische Messungen (DSC)

Zur Bestimmung der thermischen Stabilität und des Oligomerisierungsgrades von WT-G $\beta$ 1 und der hyperstabilen Variante G $\beta$ 1-M2 bei höheren Konzentrationen wurden die Proteine zunächst in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0, 1,5 M GdmCl über Nacht dialysiert. Nach der Kalibrierung des VP-DSC Mikrokalimeters (Zellvolumen 0,532 ml) mit dem jeweiligen Dialysepuffer wurden die zuvor entgasten Proteinproben mit Konzentrationen zwischen 62 und 140  $\mu$ M gemessen. Die Heizrate während der Temperaturläufe betrug 90 °C h<sup>-1</sup>. Nach Korrektur der Daten um den Pufferwert, Umrechnung in die molare Wärmekapazität und Korrektur der Basislinien wurden die molaren Wärmekapazitäten der Varianten mit den Gleichungen 18 und 19 unter der Annahme eines Nicht-Zweizustandsmodells ausgewertet. Der Wert für  $\Delta C_p$  wurde dabei auf null festgesetzt. Die Analyse wurde mit dem Programm Origin 5.0 durchgeführt.

$$C_p(T) = -\frac{K_A(T) \cdot \Delta H_{A,cal} \cdot \Delta H_{A,vH}}{(1 + K_A(T))^2 \cdot RT^2} + \dots \quad \text{Gl. 18}$$

$$K_A(T) = \exp\left\{\frac{-\Delta H_{A,vH}}{RT} \left(1 - \frac{T}{T_M}\right)\right\} \quad \text{Gl. 19}$$

$C_p(T)$ : molare Wärmekapazität (kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>);  $T$ : Temperatur (in K);  $T_M$ : Temperatur am Übergangsmittelpunkt von Domäne A (in K);  $\Delta H_{A,vH}$ : van't Hoff Enthalpie der Entfaltung von Domäne A;  $\Delta H_{A,cal}$ : kalorimetrische Enthalpie der Entfaltung von Domäne A; R: allgemeine Gaskonstante (in J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

## 2.11.2 Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge

### 2.11.2.1 Messung Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltungsübergänge

Die Stabilität der Proteine gegenüber GdmCl bzw. Harnstoff wurde anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals der Proteinlösung bei einer definierten Wellenlänge nach Anregung bei 280 oder 295 nm an einem Jasco-Fluoreszenzspektrophotometer FP-6500 untersucht. Die genaue Denaturierungsmittelkonzentration wurde nach refraktometrischer Bestimmung der Brechungsindices der einzelnen Proben ermittelt. Die jeweilige Konzentration ergibt sich dabei aus der Differenz der Brechungsindices des Puffers in Gegenwart und Abwesenheit von GdmCl bzw. Harnstoff (Gleichungen 20 und 21).<sup>139</sup>

$$[\text{GdmCl}] = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot (\Delta n)^2 - 91,6 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 20}$$

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot (\Delta n)^2 + 185,56 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 21}$$

[GdmCl]: GdmCl-Konzentration (in M); [Harnstoff]: Harnstoff-Konzentration (in M);  $\Delta n$ : Differenz der Brechungsindices der Lösungen mit und ohne Denaturierungsmittel

Die Entfaltung sowohl der Varianten der isolierten N1-Domäne, als auch von N1 im fd G3P\* durch GdmCl bei 25 °C wurde anhand der Änderung der Trp-Fluoreszenz der Proteine bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Der Übergang der N2-Domäne wurde selektiv über die Änderung der Tyr-Fluoreszenz bei 310 nm (Anregung 280 nm) detektiert. Die Stabilität der isolierten IF1-N1-Varianten gegenüber GdmCl wurde bei 325 nm (Anregung 280 nm) analysiert. Die Messungen mit 1  $\mu$ M Protein erfolgten nach Inkubation der Proben für mindestens 1 h bei 25 °C. Für den GdmCl-

induzierten Übergang von 2  $\mu\text{M}$  der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY diente die Fluoreszenzänderung bei 325 nm nach Anregung bei 295 nm als Messsonde.

Die Entfaltung der N2-Domäne in der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY durch Harnstoff wurde unter den gleichen Bedingungen, jedoch bei 15 °C anhand der Signaländerung bei 300 nm nach Anregung bei 280 nm untersucht. Alle Messungen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1100  $\mu\text{l}$  in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 in temperierbaren Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm unter ständigem Rühren. Die Bandbreite der Anregungswellenlänge betrug jeweils 3 nm, die der Emissionswellenlänge 5 nm.

Im Fall von G $\beta$ 1 wurde die Denaturierung von 1  $\mu\text{M}$  Protein durch GdmCl anhand der Änderung der Fluoreszenz bei 342 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Stabilität von G $\beta$ 1-M2 wurde zusätzlich die Konzentration der Variante im Bereich von 0,25 bis 10  $\mu\text{M}$  variiert und entsprechend die Bandbreite der Anregungs- und Emissionswellenlänge angepasst. Die Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 ebenfalls in temperierbaren Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt, nachdem die Proben vorher bei der gleichen Temperatur 1 h lang inkubiert worden waren.

### 2.11.2.2 Auswertung Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltungsübergänge

Die Denaturierungsmittel-induzierten Übergänge waren bis auf den der Chimäre einphasig, weshalb sie gemäß eines Zweizustandsmodells ausgewertet wurden.<sup>140</sup> Nach dem linearen Extrapolationsmodell wurde dabei angenommen, dass zwischen der Proteinstabilität und der Konzentration an Denaturierungsmittel eine lineare Abhängigkeit besteht (Gleichung 22).

$$\Delta G = \Delta G(\text{H}_2\text{O}) + m \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 22}$$

$\Delta G$ : freie Enthalpie der Entfaltung (in  $\text{J mol}^{-1}$ );  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ : freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in  $\text{J mol}^{-1}$ );  $m$ : Kooperativität des Übergangs (in  $\text{J mol}^{-1} \text{M}^{-1}$ );  $[\text{D}]$ : Denaturierungsmittelkonzentration (in M)

Unter der Bedingung, dass auch die spektroskopischen Eigenschaften des nativen (N) und des denaturierten Proteins (U) linear von der Denaturierungsmittelkonzentration abhängt (Gleichung 23) wurden die Übergänge anhand von Gleichung 24 durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 3.0 bzw. Grafit 5.0 ausgewertet. Gleichung 24 ergibt sich dabei durch die Kombination der Gleichungen 2, 3, 22 und 23a,b und beschreibt die Entfaltung anhand der Messgröße  $y_{\text{obs}}$  in Abhängigkeit von der Konzentration an Denaturierungsmittel.<sup>141</sup>

$$y_{\text{N}} = y_{\text{N}}^0 + m_{\text{N}} \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 23a}$$

$$y_{\text{U}} = y_{\text{U}}^0 + m_{\text{U}} \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 23b}$$

$$y_{\text{obs}}([\text{D}]) = \frac{y_{\text{N}}^0 + m_{\text{N}} \cdot [\text{D}] + (y_{\text{U}}^0 + m_{\text{U}} \cdot [\text{D}]) \cdot \exp\left\{-\frac{\Delta G(\text{H}_2\text{O}) + m \cdot [\text{D}]}{RT}\right\}}{1 + \exp\left\{-\frac{\Delta G(\text{H}_2\text{O}) + m \cdot [\text{D}]}{RT}\right\}} \quad \text{Gl. 24}$$

$y_{\text{N}}, y_{\text{U}}$ : Signal des gefalteten (N) und entfalteten Proteins (U);  $y_{\text{N}}^0, y_{\text{U}}^0$ : spektroskopische Eigenschaft des nativen bzw. entfaltenen Proteins in Abwesenheit des Denaturierungsmittels;  $m_{\text{N}}, m_{\text{U}}$ : Steigung der Basislinie des nativen bzw. denaturierten Proteins;  $[\text{D}]$ : Denaturierungsmittelkonzentration (in M);  $y_{\text{obs}}$ : Messgröße bei Vorliegen einer Mischung von N und U;  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ : freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in  $\text{J mol}^{-1}$ );  $R$ : allgemeine Gaskonstante (in  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ );  $T$ : Temperatur (in K);  $m$ : Kooperativität des Übergangs (in  $\text{J mol}^{-1} \text{M}^{-1}$ )

Die Auswertung des Entfaltungsübergangs der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY zeigte einen biphasischen Verlauf und wurde daher analog zur Analyse biphasischer thermischer Übergänge (2.11.1.3) gemäß eines Dreizustandsmodells ausgewertet.<sup>137</sup> Für die Entfaltung gelten damit die Gleichungen 8-11, die mit Gleichung 23 zu Gleichung 25 kombiniert wurden. Anhand der Gleichung 25 kann wiederum durch nicht-lineare Regression die freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels und die Kooperativität  $m$  der beiden Übergänge ermittelt werden.

$$y_{\text{obs}}([D]) = y_{\text{N}}^0 + m_{\text{N}} \cdot [D] + \frac{1}{1 + K_2 + \frac{1}{K_1}} \cdot (K_2 + z) \cdot (y_{\text{U}}^0 + m_{\text{U}} \cdot [D]) - (y_{\text{N}}^0 + m_{\text{N}} \cdot [D]) \quad \text{Gl. 25}$$

$$K_1 = K_{\text{NI}} = \exp\left\{\frac{-\Delta G_{1,\text{H}_2\text{O}}^0 + m_1[D]}{RT}\right\}$$

$$K_2 = K_{\text{IU}} = \exp\left\{\frac{-\Delta G_{2,\text{H}_2\text{O}}^0 + m_2[D]}{RT}\right\}$$

$y_{\text{obs}}$ : Messgröße, gemessene Fluoreszenz;  $y_{\text{N}}$ ,  $y_{\text{U}}$ : Signal des gefalteten (N) und entfalteten Proteins (U), wobei  $y^0$  jeweils die auf 0 M Denaturierungsmittel extrapolierten Werte angibt;  $m_{\text{N}}$ ,  $m_{\text{U}}$ : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins;  $\Delta G_{1,\text{H}_2\text{O}}^0$ ,  $\Delta G_{2,\text{H}_2\text{O}}^0$ : freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in J mol<sup>-1</sup>); [D]: Konzentration des Denaturierungsmittels;  $z$ : optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem entfalteten Zustand;  $T$ : Temperatur (in K);  $R$ : allgemeine Gaskonstante (in J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

## 2.12 Analyse des Faltungsmechanismus der Proteine

### 2.12.1 Kinetische Messungen zur Faltung der G3P\*-Varianten bzw. isolierten Domänen

#### 2.12.1.1 Kinetik nach *stopped-flow*-Mischung

Die Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken der isolierten Domänen des G3P\*, sowie schnelle Faltungsreaktionen der Domänen im G3P\* wurden nach schneller Mischung an einem DX.17MV *Sequential stopped-flow*-Spektrofluorimeter (*Applied Photophysics*) gemessen. Vor jeder Messung wurden die Lösungen durch Inkubation in den Vorschubspritzen der vortemperierten Messapparatur für 2 min auf die gewünschte Messtemperatur von 15 °C (Entfaltung durch Harnstoff) bzw. 25 °C (Entfaltung durch GdmCl) gebracht. Durch Vorschub der Spritzen (Vorschubdruck 2,2 bar) wurde natives bzw. denaturiertes Protein elffach in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit unterschiedlichen Denaturierungsmittelkonzentrationen verdünnt. Die Proteinendkonzentration betrug bei allen Messungen jeweils 1 µM.

Die Faltung der N1-Domäne wurde nach Anregung bei 295 nm anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 340 nm detektiert. Als Filter zur Absorption von Streu- und Fluoreszenzlicht unterhalb von 340 nm wurde dem Photomultiplier eine mit Aceton gefüllte 5 mm-Küvette vorgelagert. Die Faltungsreaktionen der N2-Domäne wurden nach Anregung bei 280 nm anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 320 nm (Filter: Küvette mit 10 mM cGMP, pH 1,4 in ddH<sub>2</sub>O) verfolgt. Die Bandbreite des Anregungsspalts betrug 10 nm und die Schichtdicke der Beobachtungszelle 2 mm. Die am Photomultiplier eingestellte Spannung wurde für die verschiedenen Varianten jeweils individuell angepasst, um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Für

jede Denaturierungsmittelkonzentration wurden zudem acht Einzelkinetiken detektiert, die dann gemittelt wurden. Die Auswertung der Kurvenverläufe erfolgte, wie unter 2.12.3 beschrieben, anhand des Angleiches exponentieller Funktionen.

### 2.12.1.2 Kinetik nach manueller Mischung

Bedingt durch die Assoziation der Domänen und die teilweise Kopplung der Faltung des G3P\* an die Isomerisierung von Pro161 bzw. P213 ist vor allem die Entfaltungsgeschwindigkeit des Proteins deutlich herabgesetzt. Die Kinetiken der langsamen Ent- und Rückfaltung der G3P\*-Varianten wurden daher nach manueller Mischung über die Änderung der Fluoreszenz an einem Jasco FP-6500 Spektrofluorimeter verfolgt. Die Messungen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1100  $\mu$ l in temperierbaren Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Bandbreite der Anregungswellenlänge betrug jeweils 3 nm, die der Emissionswellenlänge 5 nm. Die Faltungsreaktionen bei 15 °C (Entfaltung durch Harnstoff) bzw. 25 °C (Entfaltung durch GdmCl) wurden durch 24fache Verdünnung von 24  $\mu$ M nativem bzw. entfaltetem Protein in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 und unterschiedlichen Denaturierungsmittelkonzentrationen initiiert. Die Faltung der N2-Domäne wurde selektiv über die Änderung der Tyr-Fluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm untersucht, die der N1-Domäne anhand der Änderung der Trp-Fluoreszenz bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm. Die langsamen Ent- und Rückfaltungsreaktionen der N2-Domäne der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY wurden bei 300 nm nach Anregung bei 280 nm detektiert.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die langsamen Rückfaltungsreaktionen der N2-Domäne der Varianten fd G3P\* IIHY P161A und fd G3P\* EGDS durch den Faltungshelfer hFKPB12+IF, der Prolylisomeraseaktivität besitzt, katalysiert werden können. Dazu wurden die Faltung von 1  $\mu$ M der in 5,5 M GdmCl entfaltenen Proteine in Gegenwart von hFKPB12+IF (50 nM – 1  $\mu$ M) bei 25 °C analysiert. Als Sonde diente wiederum die Änderung der Fluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm. Alle Kurvenverläufe wurden, wie unter 2.12.3 beschrieben, anhand des Angleiches exponentieller Funktionen ausgewertet.

### 2.12.1.3 Doppelmischexperimente zur Untersuchung der Faltung der N-terminalen Domänen ausgehend von ungedocktem G3P\*

Zur Analyse der Faltung der N1- und N2-Domäne der G3P\*-Varianten im ungedockten Zustand wurden Doppelmischexperimente durchgeführt. Die durch die *cis*→*trans*-Isomerisierung von Pro161 limitierte Entfaltungsreaktion der N2-Domäne im Wildtyp-G3P\* bei 25 °C wurde nach manueller Mischung an einem Jasco FP-6500 Spektrofluorimeter anhand der Änderung der Fluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Dazu wurden 66  $\mu$ M entfaltetes Protein (5,5 M GdmCl) zunächst durch elffache Verdünnung in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 für 300 s rückgefaltet. Die Denaturierung der N2-Domäne wurde nach erneutem Sprung in Entfaltungsbedingungen (1 - 2 M GdmCl) initiiert. Die Bandbreite der Anregungswellenlänge betrug 3 nm, die der Emissionswellenlänge 5 nm.

Die schnelle Entfaltungsreaktion der N1-Domäne des fd G3P\* IIHY EGDS in Gegenwart entfalteter N2-Domäne wurde an einem DX.17MV *Sequential stopped-flow*-Spektrofluorimeter (*Applied Photophysics*) gemessen. Dazu wurde zunächst die Rückfaltung der N1-Domäne durch die elffache Verdünnung von in 7 M GdmCl denaturiertem G3P\* in Puffer initiiert. Nach 1 s

Rückfaltungsdauer wurde die N1-Domäne durch sechsfache Verdünnung in Puffer unterschiedlicher GdmCl-Konzentrationen erneut entfaltet. Der Verlauf der Entfaltung wurde anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt.

Die Entfaltung der N2-Domäne aus nicht assoziiertem G3P\* wurde ebenfalls anhand von *stopped-flow*-Doppelmischexperimenten untersucht. Entfaltetes Protein wurde dabei jeweils wiederum durch elffache Verdünnung in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 in Rückfaltungsbedingungen überführt. Die Dauer der Rückfaltung wurde je nach G3P\*-Variante zwischen 0,5 und 600 s variiert. Die erneute Denaturierung der Domäne erfolgte durch sechsfache Verdünnung in Entfaltungsbedingungen. Zusätzlich wurde die Faltung der N2-Domäne ausgehend von vollständig denaturiertem WT fd G3P\* untersucht. Nach einem kurzen 0,55 s-Rückfaltungspuls durch elffache Verdünnung des in 5,5 M GdmCl entfalteten Proteins in Puffer wurde die Rückfaltung der N2-Domäne durch einen zweiten Sprung in GdmCl-Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 M initiiert. Die Faltungsreaktionen der N2-Domäne wurden anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm detektiert.

Die Rückfaltung von N1 und N2 in den gedockten Zustand des WT fd G3P\* bzw. der Variante fd G3P\* P161A mit *cis*-Pro213 nach schneller Mischung verfolgt. Dazu wurde natives Protein kurz für 1,5 s in 3,5 M GdmCl entfaltet und durch erneuten Sprung in Rückfaltungsbedingungen durch sechsfache Verdünnung die Rückfaltung initiiert. Die entsprechenden Kinetiken wurden anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Alle Kurvenverläufe wurden, wie unter 2.12.3 beschrieben, anhand des Angleiches exponentieller Funktionen ausgewertet.

#### 2.12.1.4 Kinetik des Überganges in den lose-assoziierten bzw. gedockten Zustand

Die Variante fd G3P\* P213G liegt trotz des Fehlens des Prolinschalters als Mischung aus nicht assoziierten und gedockten Molekülen vor. Die Einnahme des assoziierten Zustandes ist jedoch nicht mit einer Signaländerung verbunden. Um die Geschwindigkeit der Domänenassoziation zu ermitteln, wurde daher ein Zweischritt-Entfaltungstest durchgeführt.<sup>142; 143</sup> Dazu wurde in 3,3 M GdmCl denaturiertes Protein (66 µM) durch elffache Verdünnung in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 zunächst für unterschiedliche Zeitspannen rückgefaltet und anschließend durch sechsfache Verdünnung in 1 M GdmCl erneut entfaltet. Der Verlauf der biphasischen Kinetiken wurde nach manueller Mischung anhand der Änderung der Fluoreszenz bei 310 nm (Anregung 280 nm) an einem Jasco FP-6500 Spektrofluorimeter bei 25 °C verfolgt. Die langsamere der beiden Phasen spiegeln dabei die Entfaltung der N2-Domäne aus dem assoziierten fd G3P\* P213G wider. Die Bandbreite der Anregungswellenlänge während der Messung betrug 3 nm, die der Emissionswellenlänge 5 nm.

Die Geschwindigkeit der Einnahme des lose-assoziierten Zustandes der Domänen während der Rückfaltung der stabilisierten Varianten fd G3P\* IIHY und fd G3P\* IIHY P161A wurde ebenfalls in einem Zweischritt-Entfaltungstest ermittelt. Die Doppelmischexperimente wurden an einem DX.17MV *Sequential stopped-flow*-Spektrofluorimeter (*Applied Photophysics*) durchgeführt. In 5,5 M GdmCl entfaltetes Protein wurde dabei wiederum durch elffache Verdünnung in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 für variable Zeitspannen rückgefaltet. Durch einen weiteren Sprung in 2,45 M GdmCl (sechsfache Verdünnung) konnte die Entfaltungsreaktion der N2-Domäne der Proteine anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm detektiert werden. Alle Kurvenverläufe wurden, wie unter 2.12.3 beschrieben, anhand des Angleiches exponentieller

Funktionen ausgewertet und die resultierenden Amplituden gegen die jeweilige Rückfaltungsdauer aufgetragen.

### 2.12.3 Auswertung der kinetischen Messungen

Die Faltungsreaktionen der G3P\*-Varianten, ihrer isolierten Domänen und die Faltungskinetiken der Gβ1-Varianten wurden durch den Angleich mono- oder biexponentieller Funktionen ausgewertet (Gleichung 26). Der Angleich an die Daten erfolgte mit dem Programm Grafit 3.0 bzw. Grafit 5.0.

$$F(t) = F_0 + \sum_{i=0}^n A_i \cdot \exp\{-k_i \cdot t\}; \quad k_i = 1 / \tau_i \quad \text{Gl. 26}$$

F(t): Fluoreszenzsignal zur Zeit t; F<sub>0</sub>: Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt t=0 s; A<sub>i</sub>: Amplitude der Signaländerung; k<sub>i</sub>: Rate der Signaländerung während der Ent- bzw. Rückfaltung eines Proteins (in s<sup>-1</sup>); τ<sub>i</sub>: Zeitkonstante der Signaländerung (in s)

Gerade bei langsamen Reaktionen kann es zu lichtinduzierten Schädigungen oder Aggregationseffekten kommen, die sich auf das Fluoreszenzsignal auswirken. Die Fluoreszenz ist daher zeitlich nicht konstant. Vielmehr ergibt sich eine annähernd lineare Veränderung des Endwertes, die bei der Analyse durch einen zusätzlichen linearen Anteil berücksichtigt werden kann (Gleichung 27).

$$F(t) = F_0 + m \cdot t + \sum_{i=0}^n A_i \cdot \exp\{-k_i \cdot t\}; \quad k_i = 1 / \tau_i \quad \text{Gl. 27}$$

F(t): Fluoreszenzsignal zur Zeit t; F<sub>0</sub>: Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt t=0 s; A<sub>i</sub>: Amplitude der Signaländerung; k<sub>i</sub>: Rate der Signaländerung während der Ent- bzw. Rückfaltung eines Proteins (in s<sup>-1</sup>); m: Steigung des linearen Anteils; τ<sub>i</sub>: Zeitkonstante der Signaländerung (in s)

Durch die Veränderung der Denaturierungsmittelkonzentration wird das Gleichgewicht zwischen der Population an nativem und denaturiertem Protein gestört. Die apparente Geschwindigkeitskonstante λ der Nachstellung des Gleichgewichtes unter den neuen Bedingungen entspricht dabei der Rate der Signaländerung der Faltungskinetik. Unter der Annahme eines einfachen Zweizustandsmodells lassen sich über nicht-lineare Regression mit Gleichung 28 aus dem Verlauf der ineinander übergehenden apparenten Ent- und Rückfaltungsraten die mikroskopischen Raten in Abwesenheit von Denaturierungsmittel, k<sub>EF</sub> und k<sub>RF</sub>, sowie die kinetischen m-Werte bestimmen.

$$\lambda = k_{EF} \cdot \exp\{m_{EF} \cdot [D]\} + k_{RF} \cdot \exp\{m_{RF} \cdot [D]\} \quad \text{Gl. 28}$$

λ: apparente Geschwindigkeitskonstante; k<sub>EF</sub>, k<sub>RF</sub>: extrapolierte Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in s<sup>-1</sup>); m<sub>EF</sub>, m<sub>RF</sub>: kinetische m-Werte der Ent- bzw. Rückfaltung (in M<sup>-1</sup>); [D]: Denaturierungsmittelkonzentration (in M)

Aus den mikroskopischen Raten und den kinetischen m-Werten lassen sich der Kooperativitätsparameter m und der Übergangsmittelpunkt der Entfaltung berechnen (Gleichung 29 bzw. 30).

$$m = RT \cdot (m_{\text{EF}} - m_{\text{RF}}) \quad \text{Gl. 29}$$

$$[\text{D}]_{\text{m}} = \frac{\ln \frac{k_{\text{EF}}}{k_{\text{RF}}}}{(m_{\text{RF}} - m_{\text{EF}})} \quad \text{Gl. 30}$$

$m$ : Kooperativitätsparameter des Gleichgewichtsüberganges;  $k_{\text{EF}}$ ,  $k_{\text{RF}}$ : extrapolierte Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in  $\text{s}^{-1}$ );  $m_{\text{EF}}$ ,  $m_{\text{RF}}$ : kinetische  $m$ -Werte der Ent- bzw. Rückfaltung (in  $\text{M}^{-1}$ );  $[\text{D}]_{\text{m}}$ : Denaturierungsmittelkonzentration am Übergangsmittelpunkt (in  $\text{M}$ );  $T$ : Temperatur (in  $\text{K}$ );  $R$ : allgemeine Gaskonstante (in  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )

Aufgrund der Komplexität des Faltungsmechanismus des G3P\* ist eine solche Auswertung der gemessenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten nur bedingt möglich. Zumindest für die N1-Domänen der G3P\*-Varianten und die entsprechenden isolierten N1-Domänen sowie die Gβ1-Varianten konnte über diese Analyse die Stabilität ermittelt werden.

## 2.12.2 Analyse der Faltung der Gβ1-Varianten

### 2.12.2.1 Kinetik nach schneller bzw. manueller Mischung

Die Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken des WT-Gβ1 und der monomeren Variante Gβ1-M2 L37N, sowie der Rückfaltungsast des Gβ1-M2-Proteins wurden in Einzelmischexperimenten nach schneller Mischung an einem DX.17MV *Sequential stopped-flow*-Spektrofluorimeter (*Applied Photophysics*) bei 25 °C verfolgt. Analog zu den Messungen des G3P\* (2.12.1.1) wurde natives bzw. entfaltetes Protein elffach in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 und unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen verdünnt. Die Proteinendkonzentration betrug jeweils 1 μM. Die Rückfaltung der hyperstabilen Variante Gβ1-M2 wurde zusätzlich bei einer Proteinkonzentration von 0,25 μM untersucht. Als Messsignal wurde die Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 280 nm verwendet.

Aufgrund der Kopplung an die Dissoziation des Dimers ist die Entfaltung von Gβ1-M2 erst nach manueller Mischung detektierbar und wurde daher an einem Jasco FP-6500 Spektrofluorimeter anhand der Änderung der Fluoreszenz bei 342 nm nach Anregung bei 280 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verfolgt. Die Messung von 0,25 μM bzw. 1 μM Protein wurde ebenfalls durch elffache Verdünnung in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 und unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen initiiert. Im Übergangsbereich von 4 bis 6 M GdmCl wurde analog dazu auch die Rückfaltung von Gβ1-M2 nach manueller Mischung untersucht. Die Bandbreite der Anregungs- und Emissionswellenlänge wurde je nach Proteinkonzentration angepasst.

Der Entfaltungsast des Monomers der hyperstabilen Variante wurde über Doppelmischexperimente erhalten. Dazu wurde zunächst die Rückfaltung des in 7,4 M GdmCl denaturierten Proteins (66 bzw. 16,5 μM) durch die elffache Verdünnung auf 4,8 M GdmCl initiiert. Durch den 1,5 s-Rückfaltungspuls wurde die Faltung der monomeren Spezies ermöglicht, jedoch nicht die nachgelagerte Assoziation der Moleküle. Nach dem Sprung in Entfaltungsbedingungen durch sechsfache Verdünnung wurde der Verlauf der Entfaltung des Monomers anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Alle Kinetiken wurden, wie unter 2.12.3 beschrieben, anhand des Angleiches exponentieller Funktionen ausgewertet.

### 2.12.2.2 Doppelmischexperimente zur Analyse der Kinetik der Dimerisierung

Die Assoziation der Monomere des Gβ1-M2-Proteins findet nicht während der konformationellen Faltung der Monomere statt, sondern erfolgt in einer nachgelagerten Reaktion, die lediglich im Übergangsbereich von 4 bis 6 M GdmCl durch die daran gekoppelte Faltung der monomeren Spezies spektroskopisch sichtbar ist. Die Geschwindigkeit der Assoziationsreaktion unter nativen Bedingungen wurde analog zu Kapitel 2.12.1.4 über einen Zweischnitt-Entfaltungstest ermittelt. Die entsprechenden Doppelmischexperimente in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 bei 25 °C wurden wiederum an einem DX.17MV *Sequential stopped-flow*-Spektrofluorimeter (*Applied Photophysics*) durchgeführt.

In 7,4 M GdmCl denaturiertes Protein (11 μM bzw. 66 μM) wurde durch elffache Verdünnung für variable Zeitspannen in 2, 3 bzw. 3,5 M GdmCl rückgefaltet. Durch weitere sechsfache Verdünnung in 7,0 M GdmCl konnte die schnelle Entfaltungsreaktion der monomeren Spezies des Gβ1-M2 anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm detektiert werden. Die Kurvenverläufe wurden, wie unter 2.12.3 beschrieben, anhand des Angleiches exponentieller Funktionen ausgewertet und die erhaltenen Amplituden gegen die Rückfaltungsdauer aufgetragen. Der Angleich an die Daten erfolgte unter der Annahme, dass die Faltung des Monomers und die Einstellung des Monomer-Dimer-Gleichgewichtes sequenzielle Reaktionen sind (Gleichung 30):



N: gefaltetes Monomer; N<sub>2</sub>: dimere Spezies; U: entfaltetes Protein; k<sub>EF</sub>, k<sub>RF</sub>: Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltung (in s<sup>-1</sup>); k<sub>on</sub>, k<sub>off</sub>: mikroskopischen Raten der Assoziation und Dissoziation (in μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> bzw. s<sup>-1</sup>)

Auf Grundlage dieses Modells ergeben sich für die Änderung der Konzentrationen der drei Spezies U, N und N<sub>2</sub> die folgenden Differenzialgleichungen (Gleichung 31-33).

$$\frac{\partial[\text{U}]}{\partial t} = -k_{RF} \cdot [\text{U}] + k_{EF} \cdot [\text{N}] \quad \text{Gl. 31}$$

$$\frac{\partial[\text{N}]}{\partial t} = k_{RF} \cdot [\text{U}] - k_{EF} \cdot [\text{N}] - 2k_{on} \cdot [\text{N}]^2 + 2k_{off} \cdot [\text{N}_2] \quad \text{Gl. 32}$$

$$\frac{\partial[\text{N}_2]}{\partial t} = k_{on} \cdot [\text{N}]^2 - k_{off} \cdot [\text{N}_2] \quad \text{Gl. 33}$$

[N]: Konzentration an gefaltetem Monomer (in μM); [N<sub>2</sub>]: Konzentration der dimeren Spezies (in μM); [U]: Konzentration an entfaltetem Protein (in μM); k<sub>EF</sub>, k<sub>RF</sub>: Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltung (in s<sup>-1</sup>); k<sub>on</sub>, k<sub>off</sub>: mikroskopischen Raten der Assoziation und Dissoziation (in μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> bzw. s<sup>-1</sup>)

Die Auswertung der Verläufe unter Verwendung der Gleichungen 31-33 und der Proteinkonzentrationen während der Rückfaltung (1 bzw. 6 μM) erfolgte durch nicht-linearen *least squares* Angleich des postulierten theoretischen Modells (Gleichung 30) mit dem Programm DynaFit. Zur Verringerung der Anzahl an Variablen wurden die Informationen über die Geschwindigkeitskonstanten k<sub>EF</sub> und k<sub>RF</sub>, die dem Verlauf des Rückfaltungstests der monomeren Spezies entnommen worden waren, konstant gesetzt. Im betrachteten Denaturierungsmittelbereich von 2-3,5 M GdmCl geht monomeres Gβ1-M2 zudem vollständig in den nativen Zustand über. Aus der

Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Dimers ( $K_D$ ) in Übergangsbereich (2.12.2.3) ging hervor, dass bei 1  $\mu\text{M}$  der hyperstabilen Variante das Gleichgewicht deutlich auf der Seite des Dimers liegt. Aus diesem Grund wurde die Dissoziationskonstante  $k_{\text{off}}$  bei den Angleichen an die Amplitudenverläufe bei 2, 3 bzw. 3,5 M GdmCl vernachlässigt. Bei der erneuten Analyse der Rückfaltungskinetiken im Übergangsbereich (2.12.2.3) zur Bestimmung des  $K_D$ -Wertes wurde  $k_{\text{off}}$  jedoch als freier Parameter in die Analyse einbezogen.

### 2.12.2.3 Bestimmung der Dissoziationskonstante des G $\beta$ 1-M2-Dimers

Die Analyse der Faltungskinetiken hat gezeigt, dass die langsamere der beiden Rückfaltungsphasen im Übergangsbereich zwischen 4 und 6 M GdmCl die durch die Assoziation der Moleküle limitierte Faltung der Monomere widerspiegelt. Die entsprechenden Kurvenverläufe von 1  $\mu\text{M}$  G $\beta$ 1-M2 wurden daher unter der Annahme des sequenziellen Modells in Gleichung 30 noch einmal neu ausgewertet (2.12.2.2), um die mikroskopischen Raten der Assoziation und Dissoziation,  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$ , bei der entsprechenden GdmCl-Konzentration zu ermitteln. Aus dem Quotient von  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  lässt sich die Dissoziationskonstante  $K_D$  des Dimers berechnen (Gleichung 34).

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad \text{Gl. 34}$$

$K_D$ : Dissoziationskonstante (in  $\mu\text{M}$ );  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$ : mikroskopische Raten der Assoziation und Dissoziation (in  $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bzw.  $\text{s}^{-1}$ )

Neben der Auswertung der Kinetiken wurde die Dissoziationskonstante zu Vergleichszwecken zusätzlich über die Analyse der Gleichgewichtsübergänge von G $\beta$ 1-M2 bei verschiedenen Proteinkonzentrationen ermittelt. Da sich die monomere Spezies und das Dimer in ihren Fluoreszenzeigenschaften nicht unterscheiden, zeigen die Gleichgewichtsübergänge mit 0,25, 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Protein einen einphasigen Verlauf. Die Gleichgewichtsentfaltung kann folglich nach dem Modell in Gleichung 30 über die apparente Gesamtgleichgewichtskonstante  $K_{\text{app}}$  beschrieben werden (Gleichung 35).

$$K_{\text{app}} = \frac{[\text{U}]}{[\text{N}] + 2[\text{N}_2]} \quad \text{Gl. 35}$$

$K_{\text{app}}$ : apparente Gesamtgleichgewichtskonstante;  $[\text{N}]$ : Konzentration an gefaltetem Monomer (in  $\mu\text{M}$ );  $[\text{N}_2]$ : Konzentration der dimeren Spezies (in  $\mu\text{M}$ );  $[\text{U}]$ : Konzentration an entfaltetem Protein (in  $\mu\text{M}$ )

Die Konzentration an denaturiertem Protein  $[\text{U}]$  ist proportional zur Gleichgewichtskonstante  $K_U$  der Entfaltung und ergibt sich daher durch Umstellung der Gleichung 36a. Die Konzentration des Dimers  $[\text{N}_2]$  lässt sich über die Dissoziationskonstante ermitteln (Gleichung 36b).

$$K_U = \frac{[\text{U}]}{[\text{N}]} \quad \text{Gl. 36a}$$

$$[\text{N}_2] = \frac{[\text{N}]^2}{K_D} \quad \text{Gl. 36b}$$

Die Kombination der Gleichungen 35, 36a und 36b resultiert in Gleichung 37, die die drei Gleichgewichtskonstanten in Bezug zur Konzentration des gefalteten Monomers setzt. Im Folgenden wird dieser Ausdruck durch die Variable  $a$  substituiert.

$$\frac{[N]}{K_D} = \frac{1}{2} \left( \frac{K_U}{K_{app}} - 1 \right) = a \quad \text{Gl. 37}$$

Die Konzentrationen an nativem Protein  $[N]$  ergibt sich aus Gleichung 38 über die Gesamtproteinkonzentration  $[N_0]$  und der Konzentration des Dimers  $[N_2]$  bzw. des denaturierten Proteins  $[U]$  (Gleichung 38).

$$[N] = [N_0] - [U] - 2[N_2] \quad \text{Gl. 38}$$

Aus den Gleichungen 36-38 resultiert Gleichung 39, über welche die Dissoziationskonstante des Dimers in Abhängigkeit von der apparenten Gesamtgleichgewichtskonstante und der Gleichgewichtskonstante der Entfaltung des Monomers berechnet werden kann.

$$K_D = \frac{[N_0]}{a(1 + K_U) + 2a^2} \quad \text{Gl. 39}$$

Die  $K_{app}$ -Werte wurden als Funktion der GdmCl-Konzentration aus der Zweizustandsanalyse (Vgl. Gleichung 6) der Gleichgewichtsübergänge von 0,25, 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  G $\beta$ 1-M2 ermittelt. Die Gleichgewichtskonstante der Entfaltung ( $K_U$ ) bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen wurde aus dem Quotienten der entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltung der monomeren Spezies,  $k_{EF}$  und  $k_{RF}$ , erhalten (Gleichung 28).

## 2.13 Charakterisierung der Interaktion der N1-Domäne des G3P\* mit TolAC-AEDANS

### 2.13.1 Messung von Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenzemissionsspektren von je 1  $\mu\text{M}$  der Bindungspartner TolAC-AEDANS und isolierter N1-Domäne bzw. WT fd G3P\* sowie der entsprechenden Mischungen wurden in temperierbaren Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) an einem Jasco FP-6500 Spektrofluorimeter bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 gemessen. Die Aufnahme der Emissionsspektren im Bereich von 300 bis 550 nm nach Anregung bei 280 nm erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 120 nm  $\text{min}^{-1}$  und einer Dämpfung von 0,5 s. Die Bandbreite der Anregungswellenlänge betrug 3 nm, die der Emissionswellenlänge 5 nm. Die Spektren wurden jeweils um die Fluoreszenz des Puffers korrigiert.

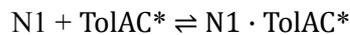
### 2.13.2 Kinetik der Bindung der N1-Domäne des G3P\* an TolAC-AEDANS

Die Bindung des Akzeptors TolAC-AEDANS an die isolierte N1-Domäne bzw. an N1 in den verschiedenen G3P\*-Varianten wurde nach schneller Mischung an einem DX.17MV *Sequential stopped-flow*-Spektrofluorimeter (*Applied Photophysics*) verfolgt. Die Assoziationsreaktion des jeweiligen Bindungspartners (Konzentrationsbereich: 0 - 16  $\mu\text{M}$ ) mit 0,2  $\mu\text{M}$  TolAC-AEDANS wurde durch 1:1 Mischung in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 und gegebenenfalls 0,1 M GdmCl bei 25 °C initiiert. Als Messsignal der Assoziation der Proteine diente die Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb

von 460 nm, wobei Streu- und Fluoreszenzlicht durch eine mit p-Nitroanilin-Lösung (2 mg ml<sup>-1</sup> in Ethanol) gefüllte Küvette (Schichtdicke 5 mm) vor dem Photomultiplier absorbiert wurde. Die Anregung erfolgte bei 280 nm mit einer Bandbreite von 10 nm. Es wurden jeweils mindestens sechs Einzelmessungen durchgeführt, gemittelt und der resultierende Verlauf nach Kapitel 2.12.3 durch Angleich einer monoexponentiellen Funktion ausgewertet.

Die darüber erhaltenen apparenten Raten und Amplituden wurden gegen die Donorkonzentration aufgetragen. Durch lineare Regression des Verlaufes der Raten ergibt sich aus dem Ordinatenabschnitt die mikroskopische Rate der Dissoziation ( $k_{off}$ ) und aus der Steigung der Gerade die mikroskopische Rate der Assoziation ( $k_{on}$ ). Nach Gleichung 34 wurde die Dissoziationskonstante  $K_D$  aus dem Quotienten von  $k_{off}$  und  $k_{on}$  berechnet. Um den  $K_D$ -Wert aus dem Verlauf der Amplituden zu ermitteln, wurde dieser analog zu einer Gleichgewichtstitration analysiert (Gleichung 43).

Der Interaktion von N1 mit TolAC-AEDANS erfolgt nach dem nachstehenden Reaktionsschema:



Die Dissoziationskonstante  $K_D$  berechnet sich nach Gleichung 40 zu:

$$K_D = \frac{[N1] \cdot [TolAC^*]}{[N1 \cdot TolAC^*]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad \text{Gl.40}$$

$K_D$ : Dissoziationskonstante (in  $\mu\text{M}$ );  $[N1]$ : Konzentration an freiem N1 (in  $\mu\text{M}$ ),  $[TolAC^*]$ : Konzentration an freiem TolAC-AEDANS (in  $\mu\text{M}$ );  $[N1 \cdot TolAC^*]$ : Konzentration des N1-TolAC-AEDANS-Komplexes (in  $\mu\text{M}$ );  $k_{on}$ : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (in  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ );  $k_{off}$ : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (in  $\text{s}^{-1}$ )

Die Konzentrationen an ungebundener N1-Domäne  $[N1]$  bzw. freiem TolAC-AEDANS  $[TolAC^*]$  ergeben sich unter Berücksichtigung der Massenerhaltung zu  $[N1] = [N1]_0 - [N1 \cdot TolAC^*]$  und  $[TolAC^*] = [TolAC^*]_0 - [N1 \cdot TolAC^*]$  (mit  $[N1]_0$  und  $[TolAC^*]_0$  als den Gesamtkonzentrationen an N1 bzw. TolAC-AEDANS). Durch Einsetzen dieser Gleichungen in Gleichung 40 ergibt sich die Konzentration des N1-TolAC-AEDANS-Komplexes (Gleichung 41).

$$[N1 \cdot TolAC^*] = \frac{[N1]_0 + [TolAC^*]_0 + K_D}{2} \pm \sqrt{\frac{([N1]_0 + [TolAC^*]_0 + K_D)^2}{4} - [N1]_0 [TolAC^*]_0} \quad \text{Gl. 41}$$

Die Assoziationsreaktion wird über die Änderung der Fluoreszenz der kovalent an TolAC gebundenen AEDANS-Einheit verfolgt. Die gemessene Fluoreszenz ist dabei abhängig von den Konzentrationen an freiem und gebundenem TolAC-AEDANS (Gleichung 42).

$$F = F_0 + \Delta F \cdot \frac{[N1 \cdot TolAC^*]}{[TolAC^*]_0} \quad \text{Gl. 42}$$

F: gemessene Fluoreszenz;  $F_0$ : Fluoreszenz des freien TolAC-AEDANS;  $\Delta F$ : maximale Fluoreszenzänderung bei vollständiger Bindung;  $[N1 \cdot TolAC^*]$ : Konzentration des N1-TolAC-AEDANS-Komplexes (in  $\mu\text{M}$ );  $[TolAC^*]$ : Konzentration an freiem TolAC-AEDANS (in  $\mu\text{M}$ )

Die Kombination der Gleichungen 41 und 42 resultiert in Gleichung 43, die die Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz von den Gesamtkonzentrationen der Bindungspartner und dem  $K_D$ -Wert des Komplexes aus N1 und TolAC-AEDANS wiedergibt. Durch Angleich dieser Gleichung an den Verlauf der Fluoreszenzamplitude in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ergibt sich die Dissoziationskonstante  $K_D$ .

$$F = F_0 + \frac{\Delta F}{[\text{TolAC}^*]_0} \left( \frac{[\text{N1}]_0 + [\text{TolAC}^*]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([\text{N1}]_0 + [\text{TolAC}^*]_0 + K_D)^2}{4} - [\text{N1}]_0[\text{TolAC}^*]_0} \right) \quad \text{Gl. 43}$$

Um die Affinität der aktiven Zustände des WT fd G3P\* und der stabilisierten Variante fd G3P\* IIHY zu bestimmen, wurden diese als langlebige Faltungsintermediate populierte. Dazu wurden die in 5,0 M GdmCl denaturierten Proteine 25fach in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 verdünnt und die Rückfaltung über einen Zeitraum von 450 s ermöglicht. Anschließend wurden die Ansätze bis zur Messung auf Eis gestellt, um die durch die Isomerisierung von Pro213 limitierte Einnahme des gedockten Zustandes zu verlangsamen. Vor der Messung wurden die Proteine für 2 min in den Vorschubspritzen der vortemperierten Messapparatur bei 25 °C inkubiert. Die Aufnahme und Analyse der Assoziationskinetiken nach 1:1 Mischung mit 0,4 µM TolAC-AEDANS in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 erfolgte analog zu den nativen Proteinen.

### 2.13.3 Rückfaltung des G3P\* in Gegenwart von TolAC-AEDANS

Die Rückfaltung verschiedener G3P\*-Varianten und der isolierten N1-Domäne bei 25 °C wurde zusätzlich in Gegenwart von TolAC-AEDANS untersucht, das im nicht assoziierten Zustand des G3P\* mit dessen N1-Domäne interagieren kann. In GdmCl entfaltetes G3P\* wurde durch zehn- bzw. elffache Verdünnung (Endkonzentration: 1 µM) in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 und zusätzlich 1 µM TolAC-AEDANS in Rückfaltungsbedingungen überführt. Dadurch kann die schnell faltende N1-Domäne mit TolAC-AEDANS interagieren. Die Verdrängung von TolAC durch die Rückfaltung des G3P\* wurde anhand der Änderung der Fluoreszenz bei 490 nm nach Anregung bei 280 nm in Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) an einem Jasco FP-6500 Spektrofluorimeter verfolgt. Die Bandbreite der Anregungswellenlänge betrug 3 nm, die der Emissionswellenlänge 5 nm. Die Kinetiken wurden um die Fluoreszenz des Puffers korrigiert und durch Angleich exponentieller Funktionen (2.12.3) ausgewertet.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Die Faltung des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen fd

Eine wichtige Voraussetzung, um den Wirkungsmechanismus und damit die Funktion eines Proteins aufklären zu können, ist die Kenntnis über dessen Stabilität und Faltungsmechanismus. Letzterer ist jedoch gerade für die in der Zelle überwiegend vorkommenden Mehrdomänenproteine deutlich komplizierter als für kleine Eindomänenproteine, welche meist nach einem einfachen Zweizustandsmodell innerhalb weniger Sekunden falten.<sup>56; 144-148</sup> Grund dafür sind unter anderem Wechselwirkungen zwischen den Domänen, die, wie im Fall der beiden N-terminalen Domänen (N1 und N2) des Gen-3-Proteins (G3P) des filamentösen fd Phagen, zu ihrer Stabilisierung und gleichzeitig zur Inaktivierung des Proteins führen können.<sup>96; 97; 122; 149</sup>

Die Interaktion der genannten Domänen N1 und N2 des G3P, die für die Infektion von *E. coli* Zellen durch den fd Phagen essentiell sind, wird zum großen Teil über die Gelenkregion der N2-Domäne vermittelt (Abbildung 3.1.1).<sup>59; 62; 96</sup> Eine wichtige Rolle spielt dabei Prolinrest 213 in dieser Gelenkregion, das im geschlossenen Zustand in *cis*-Konformation vorliegt und dadurch die Faltung der Gelenkregion und die Assoziation der Domänen ermöglicht.<sup>120</sup> Barbara Eckert konnte zudem zeigen, dass die aufgrund der benachbarten Reste Gln212 und Pro214 sehr langsame Isomerisierung der Gln212-Pro213-Peptidbindung die Infektiosität des Phagen fd reguliert.<sup>96</sup>

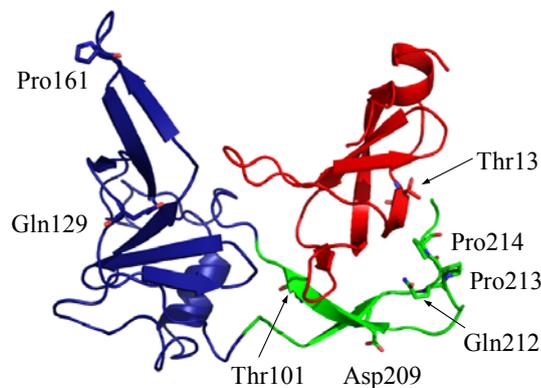


Abbildung 3.1.1: Tertiärstruktur des N1N2-Fragments von WT fd G3P\*.

Die Reste Pro161, Gln212, Pro213 und Pro214 sowie die Positionen der stabilisierenden Substitutionen in fd G3P\* IIHY sind als Stäbchen-Modelle gezeigt. Die N1-Domäne ist in rot, der globuläre Teil von N2 in blau und die Gelenkregion in grün dargestellt. Die Abbildung wurde anhand der PDB-Struktur 2G3P<sup>60</sup> mit dem Programm Pymol<sup>123</sup> erstellt.

Der Faltungsmechanismus des Fragments, das die beiden N-terminalen Domänen umfasst, wurde, wie bereits erwähnt, von Andreas Martin anhand der stark stabilisierten Variante fd G3P\* IIHY untersucht (Abbildung 3.1.2a), um teilgefaltete und damit weniger stabile Intermediate besser analysieren zu können.<sup>120; 122</sup> Dieses Protein enthält neben den Austausch T13I und Q129H mit T101I und D209Y auch zwei Substitutionen in der Gelenkregion (Abbildung 3.1.1), welche zusammen mit Q129H die Stabilität der labileren N2-Domäne deutlich erhöhen.<sup>121</sup>

Es hat sich jedoch gezeigt, dass dieser Substitutionshintergrund die Auswirkungen destabilisierender AS-Austausche auf die Stabilität und den Faltungsmechanismus des jeweiligen G3P\* stark beeinflusst. Während zum Beispiel die Entfaltung der beiden N-terminalen Domänen im fd G3P\* IIHY trotz des Austausches der beiden zu Pro213 benachbarten AS zu Alanin noch immer gekoppelt ist<sup>126</sup>, bewirken die gleichen Substitutionen im WT fd G3P\*, dass die Domänen fast vollständig unabhängig voneinander vorliegen (Johanna Koch, unveröffentlichte Daten). Um folglich Aussagen über den Effekt von AS-Austauschen auf die Faltungseigenschaften der beiden N-terminalen Domänen des WT fd G3P\* treffen zu können, muss auch der Faltungsmechanismus des natürlich vorkommenden G3P\* bekannt sein.

Entsprechende Untersuchungen wurden bereits von Roman Jakob unter anderem im Rahmen seiner Diplomarbeit begonnen. Er konnte zeigen, dass analog zu fd G3P\* IIHY die Entfaltung beider Domänen ausgehend von nativem WT fd G3P\* kinetisch gekoppelt und, wie die Einnahme des gedockten Zustandes, durch die notwendige Isomerisierung von Pro213 deutlich verlangsamt ist (▼;●, Abbildung 3.1.2a).<sup>150</sup> Die Entfaltung der N1-Domäne aus dem nicht assoziierten Zustand sowie deren Rückfaltung laufen dagegen wiederum im gleichen schnellen Zeitbereich ab wie die der N1-Domäne der stabilisierten Variante.

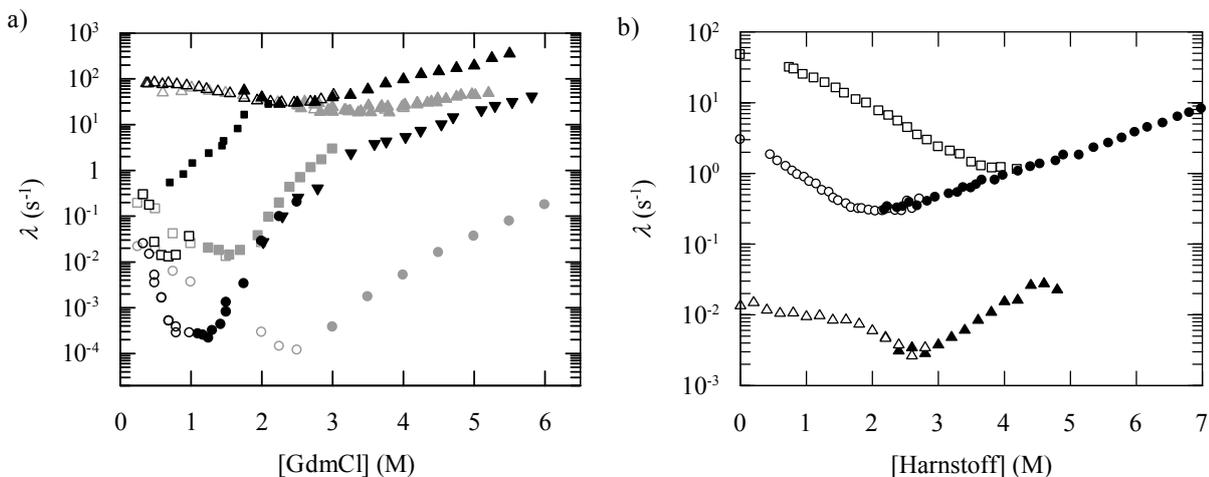


Abbildung 3.1.2: Auftragung der Ent- und Rückfaltungsraten von WT fd G3P\*, fd G3P\* IIHY und isolierter N2. a) Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten  $\lambda$  (offene Symbole) von WT fd G3P\* (schwarze Symbole) bzw. fd G3P\* IIHY (graue Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration bei 25 °C. Die Reaktionen der N1-Domäne wurden anhand der Trp-Fluoreszenz nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Nach Anregung bei 280 nm wurden die Faltungsraten der N2-Domäne in Handmischexperimenten über die Messung der Fluoreszenz bei 310 nm und nach *stopped-flow*-Mischung anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 340 nm erhalten. Gezeigt sind die Rückfaltung ( $\Delta$ ;  $\triangle$ ) der N1-Domäne und deren Entfaltung aus dem nicht assoziierten Zustand ( $\blacktriangle$ ;  $\blacktriangle$ ) erhalten durch Doppelmischexperimente, die gekoppelte Entfaltung von N1 und N2 ausgehend von nativem Protein ( $\blacktriangledown$ ;  $\bullet$ ;  $\circ$ ), sowie die Rückfaltung der N2-Domäne ( $\square$ ;  $\circ$  und  $\square$ ;  $\circ$ ). Die Entfaltungsraten der N2-Domäne im ungedockten Zustand ( $\blacksquare$ ;  $\blacksquare$ ) wurden über Doppelmischexperimente ermittelt. Die gezeigten Daten wurden der Diplomarbeit von Roman Jakob<sup>150</sup> und Referenz<sup>151</sup> entnommen. b) Entfaltungs- (offene Symbole) und Rückfaltungskinetiken (ausgefüllte Symbole) der isolierten N2-Domäne Q129H in Abhängigkeit von der Harnstoff-Konzentration bei 15 °C. Gezeigt sind die konformationelle Rückfaltung der *cis*- bzw. *trans*-Spezies der N2 ( $\square$ ;  $\circ$ ), deren Entfaltung ( $\bullet$ ) und die durch die Isomerisierung von Pro161 limitierten Ent- und Rückfaltungsraten ( $\blacktriangle$ ;  $\triangle$ ). Die Daten wurden der Doktorarbeit von Roman Jakob<sup>94</sup> entnommen, wobei die entsprechende Abbildung modifiziert wurde. Alle Messungen sind in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 0,5 bzw. 1  $\mu$ M Protein durchgeführt worden.

Die monophasische Entfaltung der N2-Domäne ausgehend von nicht assoziiertem WT fd G3P\* ist aufgrund fehlender günstiger Wechselwirkungen zwischen den Domänen ebenfalls deutlich beschleunigt (■, Abbildung 3.1.2a). Während der Rückfaltung der N2-Domäne wurden dagegen zwei Phasen detektiert, wobei die schnellere der beiden ( $\tau_1 = 37$  s in 0,5 M GdmCl; □, Abbildung 3.1.2a) analog zu fd G3P\* IIHY der konformationellen Faltung des globulären Teils von N2, die zweite der losen Domänenassoziation zugeordnet wurde (○, Abbildung 3.1.2a;  $\tau_2 = 195$  s in 0,5 M GdmCl).<sup>150</sup>

Während seiner Doktorarbeit konnte R. Jakob jedoch durch die eingehende Analyse des Faltungsmechanismus von isolierter N2 im Denaturierungsmittel Harnstoff zeigen, dass die Rückfaltung dieser Domäne nicht in zwei sondern drei Phasen abläuft, wobei der in der N2-Domäne des nativen G3P\* ebenfalls in *cis*-Konformation vorkommende Prolinrest 161 eine wichtige Rolle spielt (Abbildung 3.1.1).<sup>151</sup> In einer schnellen Reaktion faltet dabei zunächst die geringe Population denaturierter N2 mit *cis*-Pro161 ( $\tau = 33$  ms in 1 M Harnstoff), danach erfolgt die 30fach langsamere Faltung der Spezies mit Pro161 in *trans*-Konformation (□;○, Abbildung 3.1.2b). Im letzten Schritt kommt es zur *trans*→*cis*-Isomerisierung des Prolin- Restes, wodurch N2 stabilisiert wird (△, Abbildung 3.1.2b). Die Entfaltungsraten der beiden nativen Formen  $N^{cis}$  und  $N^{trans}$  sind dagegen gleich und folgen daher dem gleichen Chevronast (●, Abbildung 3.1.2b). Zur besseren Zuordnung der isomeren Spezies der Prolinreste 161 und 213 gilt im Folgenden die Festlegung, dass Konformere, die sich auf Pro161 beziehen, über hochgestellte Bezeichnungen gekennzeichnet werden, diejenigen von Pro213 sind entsprechend tiefgestellt ( $N/U_{Pro213}^{Pro161}$ ).

Durch den Vergleich der Rückfaltungskinetiken der isolierten N2-Domäne mit denen der N2-Domäne im WT fd G3P\* in Harnstoff konnte abgeleitet werden, dass die Faltung dieser Domäne im N1N2-Fragment ebenfalls in diesen drei Phasen abläuft. Die Strukturierung des globulären Teils von N2 erfolgt damit nicht nur unabhängig von N1 und der eventuell gleichzeitig stattfindenden Faltung der Gelenkregion, sondern ist vor allem auch schneller, als aus den Daten der Rückfaltung in GdmCl zunächst geschlussfolgert worden war.<sup>94</sup>

### 3.1.1 Die Faltung des globulären Teils der N2-Domäne erfolgt in der Totzeit der manuellen Mischung

Die Analyse der Faltung der N2-Domäne im durch Harnstoff entfalteten WT fd G3P\* fand in Gegenwart von nativer N1 statt, da diese sehr stabil ist und in Harnstoff nur zu einem geringen Teil entfaltet wird. Einige der in dieser Arbeit untersuchten Substitutionen sind jedoch in der N1-Domäne lokalisiert, weshalb zur Analyse der Faltung beider Domänen dieser Varianten wieder auf das stärkere Denaturierungsmittel GdmCl zurückgegriffen werden musste. Um die Effekte der Austausche auf die Faltung des WT fd G3P\* evaluieren zu können, wurde zunächst untersucht, inwieweit sich der oben beschriebene Faltungsmechanismus von N2 in Gegenwart von Harnstoff und bei 15 °C auf die Faltung der isolierten Form und des Gesamtproteins in GdmCl bei 25 °C übertragen lässt. Im Folgenden werden in

den Auftragungen die bereits bekannten Chevrongdaten in grau dargestellt. Farblich hervorgehoben werden jeweils die entsprechend diskutierten Daten.

Die isolierte N2-Domäne besitzt nur eine sehr geringe Stabilität ( $T_M = 34,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ), weshalb der Verlauf der Rückfaltungsraten nicht gut aufgelöst werden konnte ( $\nabla$ , Abbildung 3.1.3). Die nach *stopped-flow*-Mischung aufgenommenen Kinetiken zeigen jedoch, dass die Faltung von N2 schnell abläuft ( $\tau = 0,42 \text{ s}$  in  $0,2 \text{ M GdmCl}$ ). Oberhalb von  $0,3 \text{ M GdmCl}$  kann die gebildete Spezies aufgrund ihrer geringen Stabilität nicht mehr falten. Stattdessen sind Faltungsreaktionen mit noch schnelleren Raten detektierbar ( $\diamond$ , Abbildung 3.1.3).

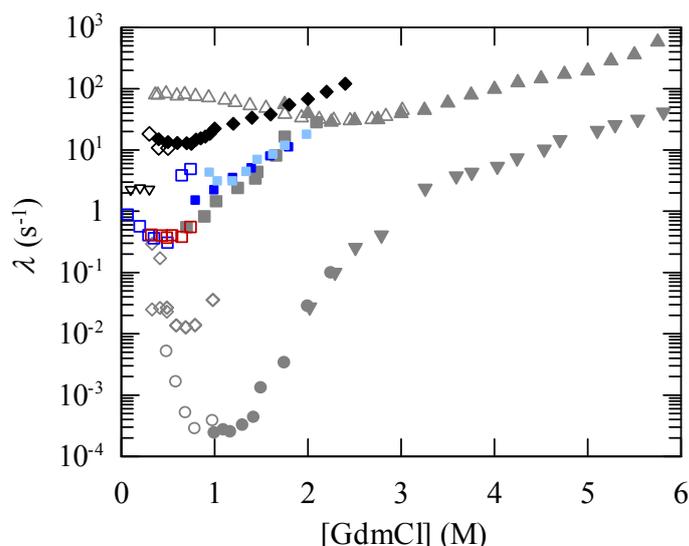


Abbildung 3.1.3: Chevron-Auftragung der Faltungs- und Entfaltungsraten von WT fd G3P\*.

Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von WT fd G3P\* (graue Symbole) aus Abbildung 3.1.2 und isolierter N2 (schwarze Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Raten der Rückfaltung der N2-Domäne ausgehend von vollständig entfaltetem WT fd G3P\* ( $\square$ ) bzw. in  $2 \text{ M GdmCl}$  teilweise denaturiertem Protein ( $\square$ ) wurden nach Doppel- bzw. Einzelmischexperimenten erhalten, die Entfaltungsraten von N2 aus dem nicht assoziierten Zustand über Doppelmischexperimente nach Rückfaltung für  $0,5 \text{ s}$  ( $\blacksquare$ ) bzw.  $150 \text{ s}$  ( $\blacksquare$ ) in  $0,5 \text{ M GdmCl}$ . Die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne ( $\blacklozenge$ ;  $\blacktriangledown$ ;  $\blacklozenge$ ) wurden anhand von Einzelmischexperimenten erhalten. Gezeigt sind außerdem die Rückfaltung ( $\triangle$ ) der N1-Domäne des WT fd G3P\* und deren Entfaltung aus dem nicht assoziierten Zustand ( $\blacktriangle$ ) erhalten durch Doppelmischexperimente, die gekoppelte Entfaltung von N1 und N2 ausgehend von nativem Protein ( $\blacktriangledown$ ;  $\bullet$ ), sowie die Rückfaltung der N2-Domäne ( $\diamond$ ;  $\circ$ ). Die Entfaltungsraten der N2-Domäne im ungedockten Zustand nach  $20 \text{ s}$  Rückfaltungsdauer ( $\blacksquare$ ) wurden ebenfalls über Doppelmischexperimente ermittelt. Einige der Daten wurden, wie in Abbildung 3.1.2 beschrieben, der Diplomarbeit von Roman Jakob<sup>150</sup> entnommen. Nach *stopped-flow*-Mischung wurden die Faltungsraten der N2-Domäne anhand der Änderung der Fluoreszenz oberhalb von  $320 \text{ nm}$  (Anregung bei  $280 \text{ nm}$ ) erhalten. Die Messungen wurden in  $0,1 \text{ M KP}$ -Puffer,  $\text{pH } 7,0$  mit  $0,5$  bzw.  $1 \text{ } \mu\text{M}$  Protein durchgeführt.

Nach dem von Roman Jakob aufgestellten Modell ist aufgrund des geringen  $U^{cis}$ -Anteils während der Rückfaltung der N2-Domäne fast ausschließlich die Faltung der  $U^{trans}$ -Spezies beobachtbar, die erst durch die langsame Isomerisierung des Pro161 in die stabilere *cis*-Form umgewandelt wird.<sup>151</sup> Die während der langsameren Faltungsreaktion gebildete instabile Spezies entspricht demnach isolierter N2 mit *trans*-Pro161 ( $N^{trans}$ ). Im gefalteten Zustand ist der Anteil an  $N^{cis}$  deutlich gegenüber  $N^{trans}$  erhöht, wodurch die Amplitude der Entfaltungskinetiken ausgehend von gefalteter N2 durch die Reaktion von  $N^{cis} \rightarrow U^{cis}$  dominiert wird.

Der niedrige  $T_M$ -Wert der isolierten N2-Domäne ließ vermuten, dass N2 im nicht assoziierten WT fd G3P\* gegenüber GdmCl ebenfalls nur eine marginale Stabilität besitzt. Im nativen, gedockten WT fd G3P\* ist die N2-Domäne dagegen durch die Interaktion mit N1 stark stabilisiert. Der Übergangsmittelpunkt ihres Gleichgewichtsüberganges liegt bei 1,4 M GdmCl, der der N1-Domäne bei 2,6 M GdmCl.<sup>121</sup> Aufgrund der Limitierung durch die maximal mögliche Verdünnung während der *stopped-flow*-Mischung wurde die Faltung der N2-Domäne zunächst ausgehend von (in 2 M GdmCl) teilweise entfaltetem G3P\* untersucht. Unter diesen Bedingungen ist die labilere N2 bereits entfaltet, N1 befindet sich dagegen noch fast vollständig im nativen Zustand. Gemäß der erhaltenen Rückfaltungsreaktionen läuft die Faltung des globulären Teils der N2-Domäne im teilgefalteten WT fd G3P\* deutlich schneller ab als aufgrund früherer Daten<sup>150</sup> angenommen. Die Zeitkonstante ist von 37 s auf 2,8 s in 0,5 M GdmCl verringert (□, Abbildung 3.1.3).

Um auch die Rückfaltung der N2-Domäne ausgehend von vollständig denaturiertem WT fd G3P\* untersuchen zu können, wurden zusätzlich Doppelmischexperimente durchgeführt. Durch elffache Verdünnung des entfalteten Proteins von 5,5 M nach 0,5 M GdmCl für 0,55 s wurde zunächst die Faltung der N1-Domäne ermöglicht ( $\tau = 83$  ms). Die Rückfaltung der N2-Domäne wurde nach einem weiteren Sprung in GdmCl-Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 M verfolgt. Die Raten der resultierenden monophasischen Kinetiken (□, Abbildung 3.1.3) sind dabei identisch mit denen der Rückfaltung ausgehend von in 2 M GdmCl teilweise gefaltetem G3P\*. Im Vergleich zu isolierter N2 ist die Rückfaltung jeweils geringfügig verlangsamt. Eine Aussage darüber, ob die Rückfaltungsgeschwindigkeit der N2-Domäne durch die Anwesenheit der gefalteten N1-Domäne, mit der sie über die Gelenkregion verknüpft ist, beeinflusst wird, kann jedoch nicht getroffen werden, da dazu die Informationen über die isolierte N2-Domäne fehlen.

Die Entfaltung der N2-Domäne aus dem nicht assoziierten Zustand kann ebenfalls anhand von Doppelmischexperimenten untersucht werden. Bereits nach kurzer Rückfaltungsdauer von 0,5 s in 0,5 M GdmCl und erneutem Sprung diesmal in Entfaltungsbedingungen ergeben sich Entfaltungskinetiken, deren Zeitkonstanten (0,125 s in 1,6 M GdmCl) im Bereich der von Roman Jakob nach einer Rückfaltungszeit von 20 s gemessenen Raten liegen (■;■, Abbildung 3.1.3).<sup>150</sup> Auch nach Verlängerung der Rückfaltungsdauer auf 150 s in 0,5 M GdmCl entfaltet oberhalb von 1,2 M GdmCl zumindest ein Teil der N2-Moleküle des WT fd G3P\* mit der gleichen Geschwindigkeit (■, Abbildung 3.1.3). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die beiden N2-Spezies ( $N^{cis}$  und  $N^{trans}$ ) gleich schnell entfalten.<sup>151</sup> Unterhalb von 1,2 M GdmCl deutet sich nach längerer Rückfaltung ein Abknicken des Entfaltungsastes an. Das ist ein Hinweis darauf, dass hier im Gegensatz zur Entfaltung nach kurzer Rückfaltung wieder die Denaturierung der stabileren  $N^{cis}$ -Spezies das Fluoreszenzsignal dominiert. Die  $trans \rightarrow cis$ -Isomerisierung des Prolin161 findet demnach vermutlich in diesem Zeitfenster statt.

Der Unterschied der Entfaltungsraten von isolierter N2-Domäne und N2 im nicht assoziierten Zustand des G3P\* zeigt, dass letztere leicht stabilisiert ist. Dies ist vermutlich auf günstige Wechselwirkungen zwischen den Domänen im gefalteten Zustand zurückzuführen. Die verlangsamte Entfaltung von N2 im G3P\* ist bereits nach sehr kurzer Rückfaltungsdauer beobachtbar, weil diese Interaktionen wahrscheinlich bereits während der Faltung der *trans*-Spezies ausgebildet werden.

### 3.1.2 Die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro213 ist der konformationellen Entfaltung von N2 aus dem gedockten Zustand nachgelagert

Da die Faltung des globulären Teils der N2-Domäne im WT fd G3P\* innerhalb weniger Sekunden abgeschlossen ist, müssen die beiden von R. Jakob detektierten langsameren Rückfaltungsphasen in der GdmCl-abhängigen Faltung<sup>150</sup> anderen Reaktionen zugeordnet werden. Die gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass die schnellere die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro161 widerspiegelt. Um mehr Informationen über den Faltungsmechanismus des WT fd G3P\* zu erhalten, wurden die langsamen Schritte der Ent- und Rückfaltung der N2-Domäne im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 2,6 M GdmCl nach manueller Mischung näher untersucht (Abbildung 3.1.4). Da sich im globulären Teil der N2-Domäne und der Gelenkregion zwölf der fünfzehn Tyrosinreste befinden, diente die Änderung der Tyr-Fluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm als selektive Sonde.

Wie bereits zuvor beobachtet, sind im Bereich der langsamen Rückfaltung der N2-Domäne im WT fd G3P\* biphasische Kinetiken detektierbar, deren Raten zum großen Teil mit den früheren Daten übereinstimmen (◇;○, Abbildung 3.1.4).<sup>150</sup> Unter 0,5 M GdmCl ergibt sich jedoch ein Abknicken des Rückfaltungsastes der schnelleren Reaktion (◇, Abbildung 3.1.4). Ob diese Phase die an die Isomerisierung von Pro161 gekoppelte Faltung von N2 oder eine nachgelagerte lose Assoziation der beiden Domänen zeigt, ist nicht eindeutig feststellbar. Der Verlauf der Raten und Amplituden stimmt jedoch mit dem Faltungsmodell der isolierten N2-Domäne überein, wonach der Reaktionsverlauf durch die Isomerisierung von Pro161 limitiert wird.<sup>151</sup>

Während bei geringen GdmCl-Konzentrationen die *U<sup>trans</sup>*-Spezies der N2-Domäne selbstständig innerhalb einer Sekunde falten kann, ist deren Faltung bei höheren Konzentrationen an Denaturierungsmittel an die Isomerisierung des Pro161 in die stabilere *cis*-Konformation gekoppelt, wodurch die Amplitude dieser Phase ansteigt (◇, Abbildung 3.1.4b). Oberhalb von etwa 0,5 M GdmCl verliert auch die *N<sup>cis</sup>*-Spezies zunehmend an Stabilität, was sich in der Abnahme der Amplitude der Reaktion widerspiegelt. Die Amplitude der langsamsten Phase nimmt erst ab einer Konzentration von 0,75 M GdmCl deutlich zu (○, Abbildung 3.1.4b). In diesem GdmCl-Bereich ist die Faltung von N2 im G3P\* erst möglich, wenn, gekoppelt an die langsame *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro213, der gefaltete Zustand der N2-Domäne durch die Domänenassoziation stabilisiert wird.

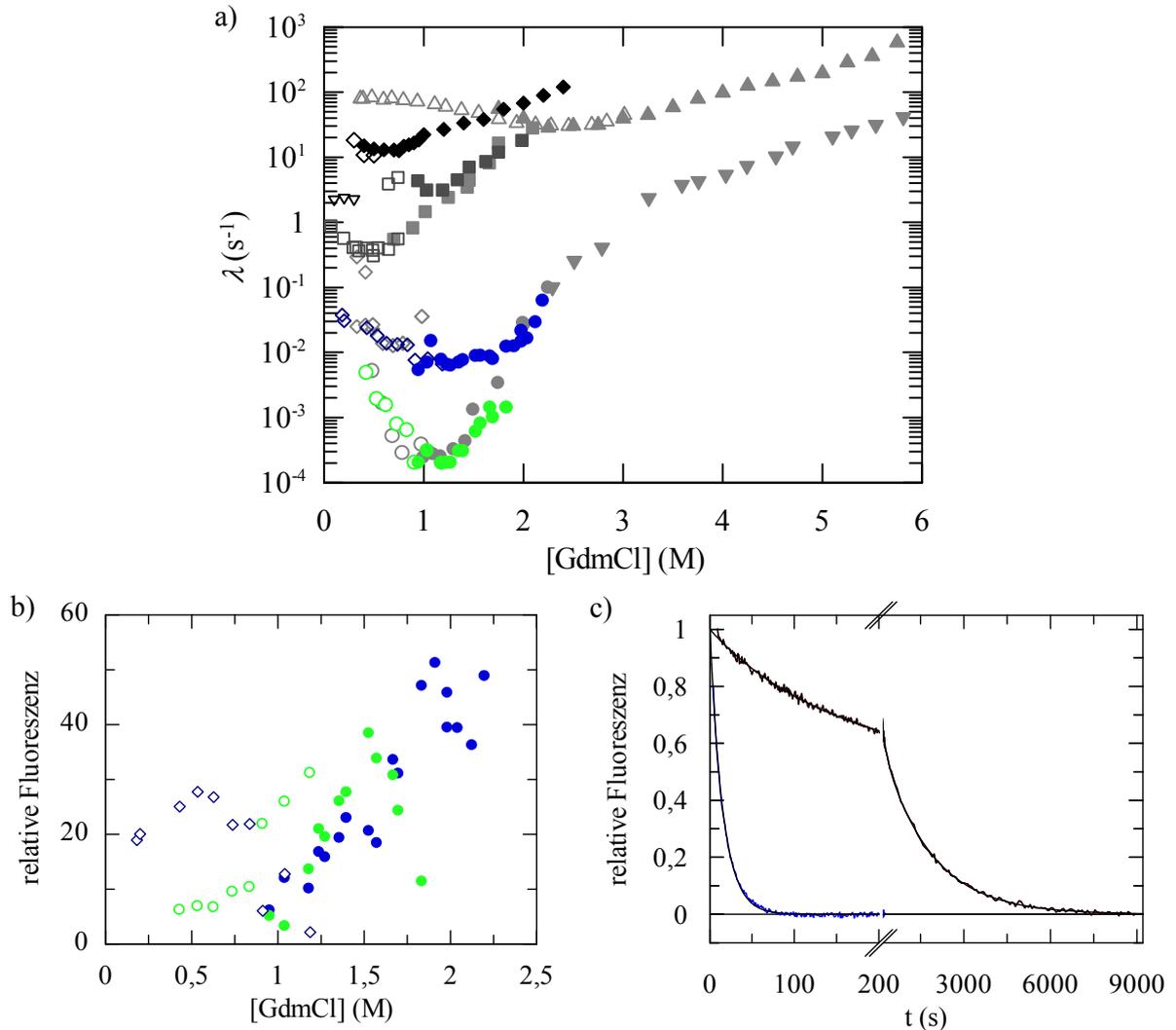


Abbildung 3.1.4: Die langsamen Faltungs- und Entfaltungsreaktionen des WT fd G3P\*.

a) Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von WT fd G3P\* in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Raten der schnelleren und langsamsten Entfaltungsphase des WT fd G3P\* aus dem nativen Zustand ( $\bullet$ ;  $\circ$ ) und die schnellere und langsamste Rückfaltungsreaktion ausgehend von vollständig entfaltetem Protein ( $\diamond$ ;  $\circ$ ) wurden über Einzelmischexperimente nach manueller Mischung anhand der Änderung der Fluoreszenz bei 310 nm (Anregung 280 nm) erhalten. Gezeigt sind außerdem die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne ( $\blacklozenge$ ;  $\nabla$ ;  $\diamond$ ), die Raten der Rückfaltung der N2-Domäne ausgehend von vollständig entfaltetem WT fd G3P\* bzw. in 2 M GdmCl teilweise denaturiertem Protein ( $\square$ ), die Entfaltungsraten von N2 aus dem nicht assoziierten Zustand nach Rückfaltung für 150 s in 0,5 M GdmCl ( $\blacksquare$ ), die Rückfaltung der N1-Domäne des WT fd G3P\* ( $\triangle$ ) und deren Entfaltung aus dem nicht assoziierten Zustand ( $\blacktriangle$ ) erhalten durch Doppelmischexperimente, die gekoppelte Entfaltung von N1 und N2 ausgehend von nativem Protein ( $\blacktriangledown$ ;  $\bullet$ ), sowie die Daten der Rückfaltung der N2-Domäne im G3P\*, die von Roman Jakob gemessen wurden ( $\diamond$ ;  $\circ$ ). Die Entfaltungsraten der N2-Domäne im ungedeckten Zustand nach 20 s Rückfaltungsdauer ( $\blacksquare$ ) wurden ebenfalls über Doppelmischexperimente ermittelt. Bis auf die Daten der Rück- und Entfaltung der N2-Domäne ( $\square$ ;  $\blacksquare$ ) wurden alle in grau dargestellten Daten der Diplomarbeit von Roman Jakob entnommen.<sup>150</sup> (b) Auftragung der entsprechenden Amplituden der schnelleren ( $\diamond$ ) und langsamsten Rückfaltungsphase ( $\circ$ ) sowie der schnelleren ( $\bullet$ ) und langsamsten Entfaltungsphase ( $\circ$ ) der N2-Domäne im WT fd G3P\* nach manueller Mischung als Funktion der GdmCl-Konzentration. (c) Entfaltungskinetiken von nativem Wildtyp-G3P\* in 1,5 M (schwarz) bzw. 2,1 M GdmCl (blau). Die schwarzen durchgezogenen Linien stellen den Angleich mono- bzw. biexponentieller Funktionen an die Daten mit Zeitkonstanten von  $\tau(2,1 \text{ M}) = 15,3 \text{ s}$  bzw.  $\tau_1(1,5 \text{ M}) = 121 \text{ s}$  und  $\tau_2(1,5 \text{ M}) = 1670 \text{ s}$  dar. Zum besseren Vergleich wurden die Reaktionsverläufe normiert. Die Reaktionen wurden nach manueller Mischung bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Alle Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 0,5 bzw. 1  $\mu\text{M}$  Protein bei 25 °C durchgeführt.

Entgegen früherer Beobachtungen folgt die Entfaltung des WT fd G3P\* erst oberhalb von 2 M GdmCl einem monoexponentiellen Reaktionsverlauf, darunter sind nach manueller Mischung zwei Phasen detektierbar. Mit Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 121$  s und  $\tau_2 = 1670$  s (in 1,5 M GdmCl) befinden sich die Reaktionen dabei im Zeitbereich der beobachteten Rückfaltungsphasen (●,●, Abbildung 3.1.4). Im Gegensatz zur Amplitude der langsamsten Reaktion, deren Maximum bei etwa 1,5 M GdmCl liegt, steigt die der schnellen Entfaltungsreaktion kontinuierlich an (●, Abbildung 3.1.4b). Die entsprechenden Raten folgen dabei dem Entfaltungssast des G3P\* ausgehend von nativem Protein (●, Abbildung 3.1.4a).

Ein ähnlicher Verlauf der Entfaltung war bereits vorher von Stefan Lorenz für die leicht stabilisierte Variante fd G3P\* E50G beobachtet worden.<sup>152</sup> Die zusätzliche Phase wurde hier der konformationellen Entfaltung der N2-Domäne ausgehend von nativem G3P zugeordnet, die schneller abläuft als die langsame *cis*→*trans*-Isomerisierung des Pro213. Grundlage dafür ist ein auf Simulationen basierendes Modell zum Faltungsmechanismus von Proteinen mit einem Prolinrest.<sup>153</sup> Die spektroskopisch sichtbare Ent- bzw. Rückfaltung des G3P\* ist danach an die Isomerisierung der Peptidylprolylbindung des Pro213 gekoppelt (Gleichung 44),



mit  $N$  als nativem Protein,  $U_{trans}$  als Spezies mit dem nicht nativen *trans*-Konformer an Position 213 und  $U_{cis}$  mit Pro213 in der nativen *cis*-Konformation. Aus der Analyse dieses linearen Modells ergeben sich die apparenten Raten der konformationellen Faltung ( $\lambda_1$ ) und der Prolylisomerisierung ( $\lambda_2$ ). Für den hier betrachteten Fall, in dem  $\lambda_1$  auch im Übergangsbereich deutlich größer ist als  $\lambda_2$ , sind bei der Entfaltung ausgehend von vollständig nativem Protein beide Reaktionen detektierbar. Unterhalb von 1,6 M GdmCl dominiert dabei die Amplitude der langsameren Prolylisomerisierungsreaktion, da hier das Gleichgewicht noch auf der Seite der nativen Moleküle liegt. Mit zunehmender GdmCl-Konzentration nimmt die Amplitude dieser Reaktion ab, da sich das Gleichgewicht immer weiter auf die Seite des denaturierten Proteins verlagert. Dadurch steigt gleichzeitig der Anteil der Signaländerung der konformationellen Entfaltung an der Gesamtsignaländerung kontinuierlich an. Für die langsame Phase wird dagegen ein glockenförmiger Verlauf erwartet<sup>153</sup>, so wie er für WT fd G3P\* tatsächlich beobachtet wurde (●, Abbildung 3.1.4b).

Das Modell (Gleichung 44) ist gut geeignet, um den Verlauf der Entfaltung ausgehend von nativem und damit gedocktem G3P\* zu beschreiben. Durch die von *cis*-Pro213 kontrollierte Strukturierung der Gelenkregion und die damit gekoppelte Assoziation der Domänen wird die N2-Domäne stark stabilisiert, unabhängig davon, ob Pro161 in dieser Domäne in *cis*- oder *trans*-Konformation vorliegt. Bei der Rückfaltung beeinflussen zusätzlich die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro161 und die unterschiedlichen Stabilitäten der in der Totzeit der Handmischung gebildeten Spezies  $N^{cis}$  und  $N^{trans}$  die Raten und Amplituden der Assoziationsreaktion. Dies führt vermutlich dazu, dass die *trans*→*cis*-Isomerisierung von

Pro213 scheinbar mit steigender GdmCl-Konzentration langsamer wird, obwohl von Prolylisomerisierungsraten angenommen wird, dass sie unabhängig von der GdmCl-Konzentration ablaufen.<sup>106; 154</sup>

### 3.1.3 Anhand von Doppelmischexperimenten kann die Rückfaltung des G3P\* direkt in die native Form verfolgt werden

Der Verlauf der Raten und Amplituden der Entfaltung des WT fd G3P\* deutet darauf hin, dass die während der Entfaltung zusätzlich detektierte Phase (●, Abbildung 3.1.4) nicht die Entfaltung der N2-Domäne im geöffneten Intermediat bzw. nach Isomerisierung von Pro161 widerspiegelt, sondern die konformationelle Entfaltung aus dem noch gedockten Zustand. In diesem Fall sollten sich nach nur kurzzeitiger Entfaltung für 1,5 s (in 3,5 M GdmCl) und erneutem Sprung in native Bedingungen die Raten der Rückfaltung von N2 direkt in die geschlossene Konformation ergeben. Der 1,5s-Entfaltungspuls reicht aus, um die Domänenassoziation im WT fd G3P\* zu lösen (Vgl. ▼, Abbildung 3.1.4). Tatsächlich sind in diesem Faltungsexperiment drei Phasen detektierbar, wobei sich die Amplitude der schnellsten Reaktion gegenläufig zu den anderen beiden verhält (Abbildung 3.1.5a). Die Raten dieser schnellen Phase, deren Amplitude am größten ist, entsprechen denen der Rückfaltung der N1-Domäne ausgehend von vollständig entfaltetem WT fd G3P\* (△, Abbildung 3.1.5). Dies ist zu erwarten, da nach Auflösung des assoziierten Zustandes durch den Entfaltungspuls die N1-Domäne schnell entfaltet.

Die anderen beiden Rückfaltungsraten fallen bei sehr niedrigen GdmCl-Konzentrationen mit den Rückfaltungsraten der entsprechenden *cis*- bzw. *trans*-Spezies von N2 im nicht assoziierten Zustand zusammen (△;○, Abbildung 3.1.5c). Die Faltung der  $U_{cis}^{cis}$ - (intermediäre Phase) und  $U_{cis}^{trans}$ -Spezies der N2-Domäne (langsame Phase) sind demnach unabhängig von der Konformation des Pro213 in der Gelenkregion. Allerdings ist die Amplitude der langsamen Rückfaltungsreaktion deutlich kleiner. Dies ist zu erwarten, da in der nativen Form des WT fd G3P\* nur 14 % des Pro161 in der *trans*-Konformation vorkommen<sup>94</sup> und der 1,5s-Entfaltungspuls zu kurz war, um das *cis/trans*-Gleichgewicht an Pro161 signifikant zu verschieben. Pro213 befindet sich nach dem kurzen Entfaltungsschritt ebenfalls noch in seiner nativen *cis*-Konformation. Daher werden die rückgefalteten N2-Domänen mit *cis*- bzw. *trans*-Pro161 durch die unmittelbar folgende Domänenassoziation stabilisiert und ihre Rückfaltungsäste verlängert, bis sie in den Chevronast der konformationellen Entfaltung aus dem gedockten Zustand übergehen (△;○, Abbildung 3.1.5c).

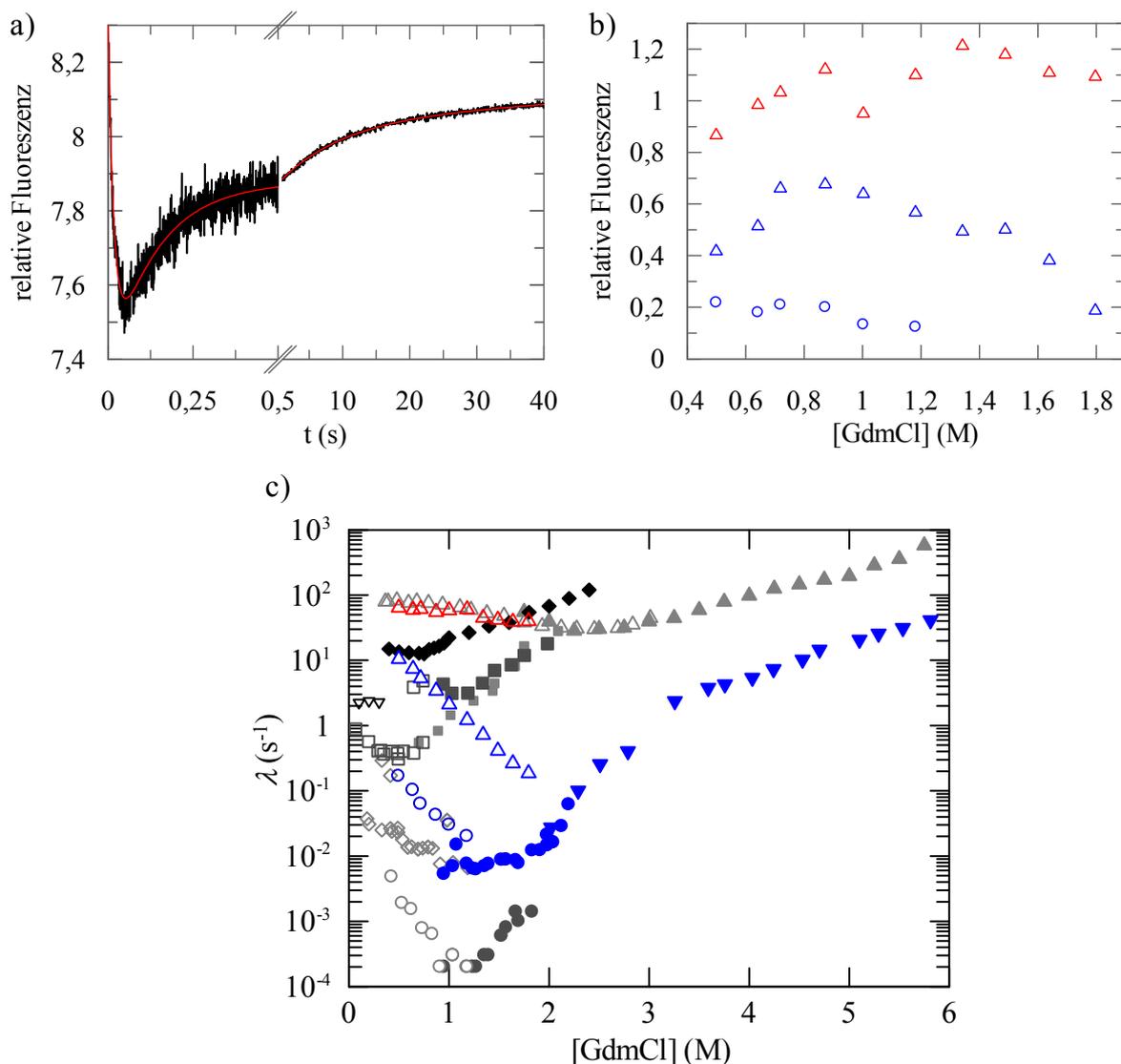


Abbildung 3.1.5. Analyse der Faltung des denaturierten WT fd G3P\* direkt in gedockten Zustand.

a) Rückfaltungskinetik von 1  $\mu$ M des WT fd G3P\* in 0,64 M GdmCl nach Entfaltung in 3,5 M GdmCl für 1,5 s. Die rote durchgezogene Linie stellt den Angleich einer triexponentiellen Funktion an die Daten mit Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 17$  ms,  $\tau_2 = 0,134$  s und  $\tau_3 = 9,75$  s da. b) Auftragung der Fluoreszenzamplituden der langsamen ( $\circ$ ) und intermediären Rückfaltungsphase ( $\Delta$ ) der N2-Domäne und des Betrages der Amplitude der schnellen Rückfaltung ( $\Delta$ ) der N1-Domäne im WT fd G3P\* als Funktion der GdmCl-Konzentration nach Entfaltung des Proteins für 1,5 s in 3,5 M GdmCl und erneutem Sprung in Rückfaltungsbedingungen. Die Reaktionen wurden nach *stopped-flow*-Mischung oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. c) Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) des WT fd G3P\* aus Abbildung 3.1.4 in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Gezeigt sind die Raten der langsamen ( $\circ$ ) und intermediären Rückfaltungsphase ( $\Delta$ ) der N2-Domäne sowie die der schnellen Rückfaltung ( $\Delta$ ) der N1-Domäne des WT fd G3P\* aus dem entfalteten Zustand mit *cis*-Pro213. Diese wurden, wie unter b) beschrieben, über Doppelmischexperimente nach schneller Mischung erhalten. Ebenfalls aufgetragen sind die über Einzelmischexperimente bestimmten Entfaltungs- ( $\bullet$ ;  $\blacklozenge$ ) und Rückfaltungsraten ( $\diamond$ ;  $\circ$ ) von N2 ausgehend von vollständig nativem bzw. entfaltetem Protein. Gezeigt sind außerdem die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne ( $\blacklozenge$ ;  $\nabla$ ;  $\diamond$ ), die Raten der Rückfaltung der N2-Domäne ausgehend von vollständig entfaltetem WT fd G3P\* bzw. in 2 M GdmCl teilweise denaturiertem Protein ( $\square$ ), die Entfaltungsraten von N2 aus dem nicht assoziierten Zustand nach Rückfaltung für 150 s in 0,5 M GdmCl ( $\blacksquare$ ), die Rückfaltung der N1-Domäne des WT fd G3P\* ( $\Delta$ ) und deren Entfaltung aus dem nicht assoziierten Zustand ( $\blacktriangle$ ) erhalten durch Doppelmischexperimente sowie die gekoppelte Entfaltung von N1 und N2 ausgehend von nativem Protein ( $\blacktriangledown$ ;  $\bullet$ ). Die Entfaltungsraten der N2-Domäne im ungedockten Zustand ( $\blacksquare$ ) nach 20 s Rückfaltungsdauer wurden von Roman Jakob über Doppelmischexperimente ermittelt. Einige der Daten wurden, wie in Abbildung 3.1.2 beschrieben, der Diplomarbeit von Roman Jakob entnommen.<sup>150</sup> Alle Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 0,5 bzw. 1  $\mu$ M Protein bei 25 °C durchgeführt.

Durch die Assoziation mit der N1-Domäne werden beide Formen der N2-Domäne also stark stabilisiert. Wenn Pro213 in *trans*-Konformation vorliegt, so wie in vollständig entfaltetem G3P\*, ist eine derartige Stabilisierung während der Rückfaltung nicht möglich. Aus diesem Grund besitzen die Chevrons der *cis*- bzw. *trans*-Form der N2-Domäne im Wildtyp-Protein mit *trans*-Pro213 Minima unterhalb von 1,3 M GdmCl (Abbildung 3.1.5). Die Analyse der beiden in blau dargestellten Chevrons in Abbildung 3.1.5 zeigt, dass WT fd G3P\* mit Pro161 und Pro213 in *cis*-Konformation ein Minimum und damit einen Übergangsmittelpunkt bei ca. 2,2 M GdmCl besitzt, der der entsprechenden Spezies mit *trans*-Pro161 befindet sich bei 1,3 M GdmCl. Der Übergangsmittelpunkt dieser *trans*-Form ist damit nur geringfügig gegenüber dem Wert aus dem Gleichgewichtsübergang ( $[GdmCl]_m = 1,4 \text{ M}$ ) verringert.<sup>121</sup> Die Destabilisierung des globulären Teils der N2-Domäne durch *trans*-Pro161 kann demnach nicht durch *cis*-Pro213 und die damit verbundene Faltung der Gelenkregion bzw. die Assoziation der Domänen kompensiert werden.

In der nativen Form dominiert die deutlich stabilere  $N_{cis}^{cis}$ -Spezies mit *cis*-Pro161 im globulären Teil der N2-Domäne und *cis*-Pro213 in der Gelenkregion. Wie bereits erwähnt enthält gedocktes WT fd G3P\* zu 14% *trans*-Pro161.<sup>94</sup> Im Gegensatz zur Messung der Entfaltungskinetiken ist vor der Aufnahme des Gleichgewichtsüberganges genügend Zeit vorhanden, damit sich die Konzentrationsverhältnisse der acht möglichen Spezies ( $N_{cis}^{cis}$ ,  $N_{cis}^{trans}$ ,  $N_{trans}^{cis}$  und  $N_{trans}^{trans}$  bzw.  $U_{cis}^{cis}$ ,  $U_{cis}^{trans}$ ,  $U_{trans}^{cis}$  und  $U_{trans}^{trans}$ ) bei der entsprechenden GdmCl-Konzentration einstellen können. So führt z.B. bei 1,4 M GdmCl die vollständige Entfaltung der  $N_{trans}^{cis}$  bzw.  $N_{trans}^{trans}$ -Spezies sowie die zur Hälfte erfolgte Entfaltung von  $N_{cis}^{trans}$  dazu, dass das Gleichgewicht weg von der  $N_{cis}^{cis}$ -Form zu den weniger stabilen Spezies und damit der Mittelpunkt des Gleichgewichtsüberganges zu niedrigeren GdmCl-Konzentrationen verschoben wird, da im entfaltetem Zustand die *trans*-Isomere dominieren.

Während dieser Nachstellung des Gleichgewichtes muss es zwangsläufig auch zu einer Verschiebung des *cis/trans*-Gleichgewichtes an Pro161 in Richtung der *trans*-Konformation kommen. Sowohl die Untersuchung der isolierten N2-Domäne<sup>151</sup> durch Roman Jakob als auch die Analyse der Rückfaltung des G3P\* nach manueller Mischung ( $\diamond; \circ$ , Abbildung 3.1.4) legen die Vermutung nahe, dass die *trans*→*cis*-Isomerisierung des Pro161 durch die Kopplung an die konformationelle Faltung spektroskopisch sichtbar ist. Der entsprechende Entfaltungsast sollte sich daher durch die Entfaltung der nicht assoziierten Form des G3P\* ergeben. Um dies zu untersuchen wurden weitere Doppelmischexperimente durchgeführt. Dabei wurde entfaltetes WT fd G3P\* zunächst für 300 s in 0,5 M GdmCl rückgefaltet und anschließend im Denaturierungsmittelbereich von 1 bis 2 M GdmCl erneut entfaltet (Abbildung 3.1.6).

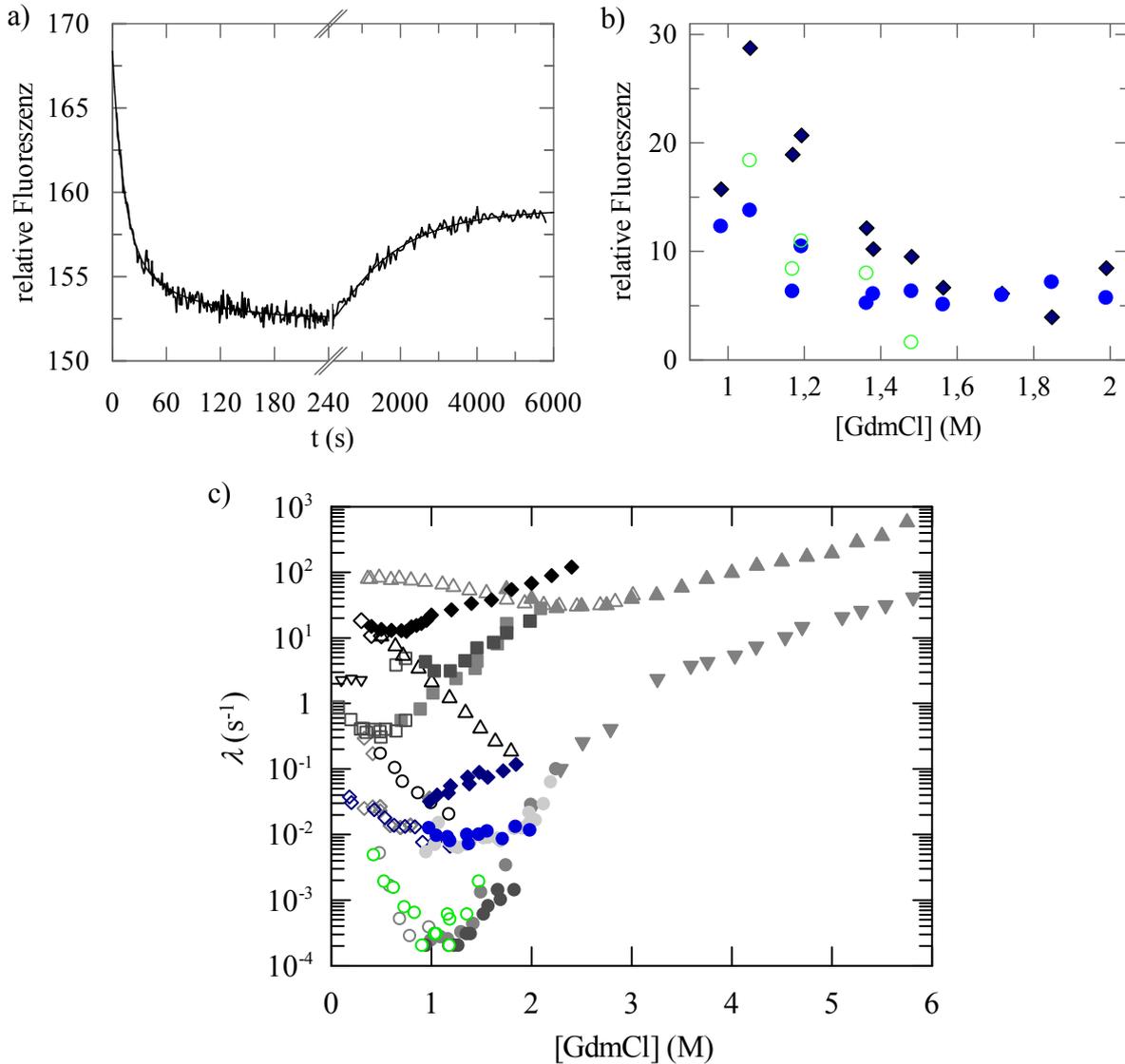


Abbildung 3.1.6. Analyse der Entfaltung der N2-Domäne ausgehend von nicht assoziiertem WT fd G3P\*.  
 a) Entfaltungskinetik von 1  $\mu\text{M}$  der N2-Domäne im WT fd G3P\* in 1,4 M GdmCl nach Rückfaltung des vollständig entfalteten Proteins für 300 s in 0,5 M GdmCl. Die schwarze durchgezogene Linie stellt den Angleich einer triexponentiellen Funktion an die Daten mit Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 13,2$  s,  $\tau_2 = 102$  s und  $\tau_3 = 1667$  s dar. b) Auftragung der Amplituden der schnellen ( $\blacklozenge$ ) und intermediären Entfaltungsphase ( $\bullet$ ) und des Betrages der Amplitude der langsamsten Rückfaltungsreaktion ( $\circ$ ) der N2-Domäne im WT fd G3P\* als Funktion der GdmCl-Konzentration nach Rückfaltung des entfalteten Proteins für 300 s in 0,5 M GdmCl und erneutem Sprung in Entfaltungsbedingungen. Die in a) und b) gezeigten Daten wurde bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm erhalten. c) Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von WT fd G3P\* in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Raten der schnellen ( $\blacklozenge$ ) und intermediären Entfaltungsreaktion ( $\bullet$ ) sowie der langsamen Rückfaltungsphase ( $\circ$ ) des WT fd G3P\* aus dem nicht assoziierten Zustand wurden, wie in a) beschrieben, über Doppelmischexperimente bestimmt. Aufgetragen sind zudem die über Einzelsprünge nach manueller Mischung erhaltenen Entfaltungs- ( $\bullet$ ;  $\bullet$ ) und Rückfaltungsraten ( $\diamond$ ;  $\circ$ ) ausgehend von vollständig nativem bzw. entfaltetem Protein sowie die Raten der langsamen ( $\circ$ ) und intermediären Rückfaltungsphase ( $\triangle$ ) der N2-Domäne aus dem entfalteten Zustand mit *cis*-Pro213. Gezeigt sind außerdem die Raten der Rückfaltung der N2-Domäne ausgehend von entfaltetem WT fd G3P\* ( $\square$ ), die Entfaltungsraten von N2 aus dem nicht assoziierten Zustand nach Rückfaltung für 150 s ( $\blacksquare$ ) bzw. 20 s ( $\blacksquare$ ) in 0,5 M GdmCl, die Rückfaltung der N1-Domäne des WT fd G3P\* ( $\triangle$ ) und deren Entfaltung aus dem ungedockten Zustand ( $\blacktriangle$ ) erhalten durch Doppelmischexperimente, die gekoppelte Entfaltung von N1 und N2 ausgehend von nativem Protein ( $\blacktriangledown$ , verfolgt nach *stopped-flow*-Mischung). Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind zusätzlich die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne ( $\blacklozenge$ ;  $\blacktriangledown$ ;  $\diamond$ ). Wie in Abbildung 3.1.2 beschrieben, wurde ein Teil der Daten der Diplomarbeit von Roman Jakob entnommen.<sup>150</sup> Alle Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 0,5 bzw. 1  $\mu\text{M}$  Protein bei 25 °C durchgeführt.

Nach 300 s Rückfaltungsdauer ist sowohl die N1- als auch die N2-Domäne gefaltet. Die Gelenkregion ist dagegen noch nicht strukturiert, da Pro213 noch weitgehend in *trans*-Konformation vorliegt. Während der Entfaltung dieses Intermediates sind drei Phasen detektierbar, wobei die schnelle ( $\tau = 13,3$  s) und die mittlere ( $\tau = 102$  s) ein abfallendes Signal zeigen, die langsame ( $\tau = 1667$  s; jeweils in 1,4 M GdmCl) dagegen mit einem Anstieg der Fluoreszenz verbunden ist (Abbildung 3.1.6a). Grund für letzteren ist, wie auch schon in den Rückfaltungsexperimenten beobachtet, die Kopplung der Faltung von N2 an die Isomerisierung von Pro213 und die Einnahme des gedockten Zustandes. Oberhalb von 1,5 M GdmCl ist diese Rückfaltungsreaktion nicht mehr detektierbar, da das Gleichgewicht zu stark auf der Seite der Entfaltung liegt (○, Abbildung 3.1.6b,c).

Die intermediäre Phase folgt in ihren Raten der konformationellen Entfaltung ausgehend von nativem Protein. Ihre Amplitude ist jedoch im Vergleich zu den Daten aus den Einzelmischexperimenten deutlich verringert (●, Abbildung 3.1.6b,c). Das Auftreten dieser Reaktion deutet an, dass im entfalteten Zustand analog zu Pro161 auch Pro213 sowohl in *trans*- als auch *cis*-Konformation vorkommt, wobei das Gleichgewicht auf der Seite der  $U_{trans}$ -Spezies liegt. Bei geringen GdmCl-Konzentrationen wird die größte Signaländerung durch die zusätzliche schnelle Phase verursacht (◆, Abbildung 3.1.6). Der Verlauf ihrer Raten geht in den Chevronast der schnellen Rückfaltungsreaktion über (◆, Abbildung 3.1.6b). Dies deutet an, dass hier analog zum Faltungsmechanismus der isolierten N2-Domäne in Harnstoff die durch die *cis*→*trans*-Isomerisierung von Pro161 limitierte Entfaltung der  $N^{cis}$ -Spezies beobachtet wird.

### 3.1.4 Die Substitution des Pro161 gegen Alanin hat keine Auswirkung auf den gedockten Zustand

Nach den gezeigten Ergebnissen kann für WT fd G3P\* keine der konformationellen Faltung der einzelnen Domänen nachgelagerte lose Assoziationsreaktion beobachtet werden. Die N2-Domäne wird stattdessen sowohl während der konformationellen Faltung als auch im nicht assoziierten Zustand durch die Isomerisierung von Pro161 in die *cis*-Konformation stabilisiert, bevor der gedockte Zustand, limitiert durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro213, eingenommen wird. Durch diese abschließende Kopplung der beiden Domänen wird die Stabilität von N2 im nativen G3P\* deutlich erhöht. Die Substitution des Pro161 durch Alanin, das ausschließlich in *trans*-Konformation vorliegt, sollte sich demnach lediglich auf die Rückfaltung, jedoch kaum auf die Stabilität des Wildtyp-G3P\* im Gleichgewicht bzw. dessen Entfaltung aus dem nativen Zustand auswirken.

Die Stabilität der entsprechenden Variante fd G3P\* P161A wurde durch thermisch-induzierte Entfaltung untersucht, wobei die Änderung des CD-Signals bei 230 nm als Sonde diente.<sup>121</sup> Genau wie zuvor für WT fd G3P\* und die Variante fd G3P\* P213G beobachtet, entfaltet fd G3P\* P161A bei dieser Wellenlänge in einem zweiphasigen Übergang. Während der ersten Phase kommt es zur Entfaltung der labileren N2-Domäne, die gleichzeitig auch die

Dissoziation der Domänen und die Entfaltung der Gelenkregion widerspiegelt. Der zweite Übergang kann der Denaturierung der stabileren N1-Domäne zugeordnet werden (Abbildung 3.1.7). Die nach Angleich gemäß eines Dreizustandsmodells erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.1.1 aufgelistet.

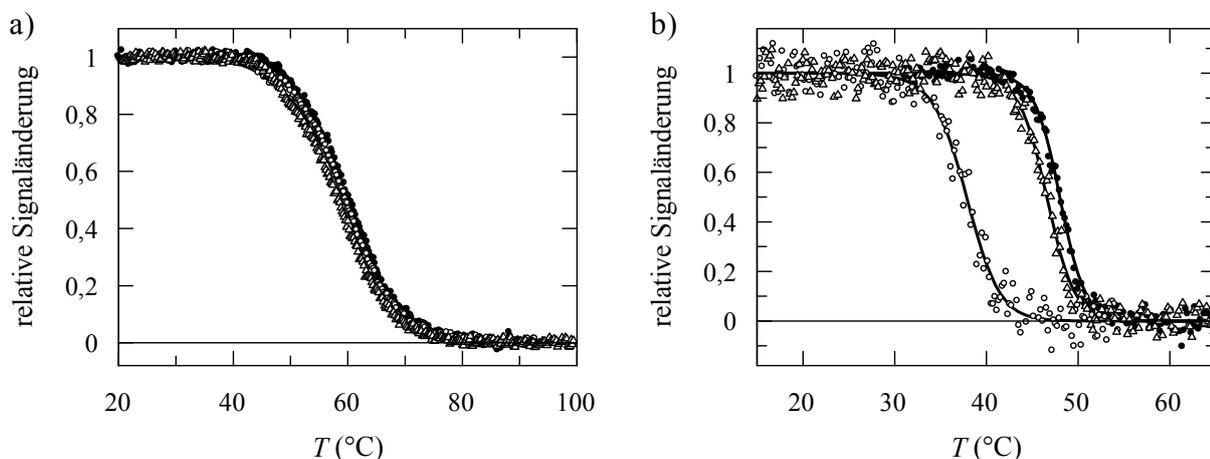


Abbildung 3.1.7: Thermisch-induzierte Entfaltung von WT fd G3P\* und den beiden substituierten Varianten. Auftragung der relativen Änderung des CD-Signals bei a) 230 nm und b) 210 nm von WT fd G3P\* (●), fd G3P\* P213G (○) und fd G3P\* P161A (△) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die durchgezogenen Linien stellen den Angleich an die Daten gemäß eines a) Dreizustands- bzw. b) Zweizustandsmodells dar. Die Übergänge von 4  $\mu\text{M}$  Protein (1  $\mu\text{M}$  bei 210 nm) wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm, einer Heizrate von 60  $^{\circ}\text{C h}^{-1}$  und einer Dämpfung von 8 s gemessen. Die aus der Datenanalyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.1.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1.1: Stabilitätsdaten aus der thermisch-induzierter Entfaltung von WT fd G3P\* und den Varianten fd G3P\* P161A bzw. fd G3P\* P213G

Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
	$T_M$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta G^{45^{\circ}\text{C}}$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$T_M$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta G^{60^{\circ}\text{C}}$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
WT fd G3P*	48,5	591	6,2	60,2	230	0,1
	48,0	612	5,6	-	-	-
fd G3P* P161A	47,1	636	4,1	60,5	211	0,3
	46,6	560	2,7	-	-	-
fd G3P* P213G	44,9	279	-0,1	60,2	225	0,1
	37,8	442	-11,0	-	-	-
isolierte N2-Domäne	34,6	304	-11,7	-	-	-

Angegeben sind für die G3P\*-Varianten fd G3P\* P161A, fd G3P\* P213G und WT fd G3P\* sowie die isolierte N2-Domäne die Schmelztemperaturen  $T_M$ , die Enthalpie der jeweiligen Entfaltungsreaktion am  $T_M$  ( $\Delta H$ ) und die freien Enthalpien der Entfaltung  $\Delta G^{45^{\circ}\text{C}}$  und  $\Delta G^{60^{\circ}\text{C}}$  bei 45  $^{\circ}\text{C}$  bzw. 60  $^{\circ}\text{C}$ . Die Stabilitätsdaten der beiden Domänen im G3P\* wurden nach Auswertung des biphasischen Entfaltungsübergangs, der anhand des CD-Signals bei 230 nm gemessen wurde, gemäß eines Dreizustandsmodells erhalten (Abbildung 3.1.7a). Der erste Übergang spiegelt die Entfaltung der N2-Domäne sowie die Dissoziation der Domänen wider, der zweite Übergang die Denaturierung der N1-Domäne. Darunter jeweils aufgelistet sind die Stabilitätsdaten von N2 im jeweiligen G3P\*, welche, wie die der isolierten N2-Domäne, über die Änderung des CD-Signals bei 210 nm ermittelt wurden (Abbildung 3.1.7b). Die entsprechenden thermischen Übergänge wurden gemäß eines Zweizustandsmodells ausgewertet. Für die Analyse wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von 10000  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  für N2 bzw. für N1 1000  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  angenommen. Für die isolierte N2-Domäne wurde ein Wert von 8000  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  verwendet. Die Daten für WT fd G3P\* wurden der Arbeit<sup>121</sup> entnommen; die Werte für fd G3P\* P213G bei 230 nm der Referenz<sup>79</sup>. Die Daten zu isolierter N2-Domäne sind eine persönliche Mitteilung von Roman Jakob. Die Messungen wurden unter den in Abbildung 3.1.7 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Im Gegensatz zu Variante fd G3P\* P213G, in der der Austausch des Pro213 zu einer Abnahme des  $T_M$ -Wertes der N2-Domäne um ca. 3 °C führt, ist die Stabilität von N2 in fd G3P\* P161A erwartungsgemäß nur geringfügig gegenüber WT fd G3P\* verringert. Die ähnlich hohe Enthalpie deutet darauf hin, dass in diesem Protein die stabilisierende Assoziation zwischen den Domänen noch besteht. Die Kooperativität der Entfaltung von N2 in der Variante mit Glycin an Position 213 ist dagegen deutlich kleiner, was zumindest auf eine Schwächung der Wechselwirkungen schließen lässt. Die Stabilität der N1-Domäne ist durch die Substitution im globulären Teil von N2 bzw. in der Gelenkregion, die zusammen mit N2 entfaltet, nicht beeinflusst.

Die durch die Denaturierung der N2-Domäne verursachte Signaländerung bei 230 nm ist sehr gering. Wenn die Übergänge der beiden Domänen nur schwach voneinander getrennt und zudem die Enthalpien der Übergänge klein sind, wird die Bestimmung des Übergangsmittelpunktes der N2-Domäne sehr ungenau. Aus diesem Grund wurde die Entfaltung der labileren  $\beta$ -Faltblattdominierten N2-Domäne zusätzlich selektiv über die Änderung des CD-Signals bei 210 nm verfolgt (Abbildung 3.1.7b, Tabelle 3.1.1). Dabei zeigte sich, dass zwar für WT fd G3P\* bzw. fd G3P\* P161A die Stabilitätsdaten mit den zuvor bei 230 nm erhaltenen Werten gut übereinstimmen, der Übergangsmittelpunkt der Variante mit P213G-Substitution ist jedoch um 7 °C verringert. Damit ist die N2-Domäne des fd G3P\* P213G nur geringfügig stabiler als die isolierte N2-Domäne ( $T_M = 34,6$  °C, Tabelle 3.1.1). Die gleichzeitig deutlich erhöhte Enthalpie zeigt allerdings an, dass im nativen fd G3P\* P213G zwischen den Domänen trotz der verringerten Stabilität Wechselwirkungen vorhanden sind, die vermutlich auch über die strukturierte Gelenkregion vermittelt werden (Tabelle 3.1.1).

Da die Faltungskinetiken in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration analysiert werden, wurde zu Vergleichszwecken zusätzlich die Stabilität der Proteine gegenüber diesem Denaturierungsmittel untersucht (Abbildung 3.1.8). Hier diente die Änderung der Fluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm als spezifische Sonde der Entfaltung der N2-Domäne, an die wiederum die Entfaltung der Gelenkregion und die Dissoziation der Domänen gekoppelt sind. Die Denaturierung der N1-Domäne wurde anhand der Zunahme der Fluoreszenz der drei enthaltenen Tryptophanreste bei 360 nm verfolgt. Die N2-Domäne besitzt ebenfalls ein Tryptophan, weshalb diese Sonde nicht vollständig selektiv für N1 ist. Die durch Trp181 in N2 verursachte schwache Signaländerung ist vermutlich der Grund dafür, dass das Fluoreszenzsignal vor allem des nativen fd G3P\* P161A in diesem Bereich nicht linear verläuft (Abbildung 3.1.8a). Die nach Angleich an die Daten unter Festlegung der Basislinie erhaltenen thermodynamischen Parameter der N1-Domäne der Variante sind im Vergleich zu WT fd G3P\* leicht verringert, was jedoch wahrscheinlich auf die ungenauere Auswertung zurückzuführen ist (Tabelle 3.1.2). Wie auch schon bei der thermisch-induzierten Entfaltung beobachtet, ist der Übergangsmittelpunkt der N1-Domäne durch die Substitution P213G ebenfalls nicht beeinflusst.

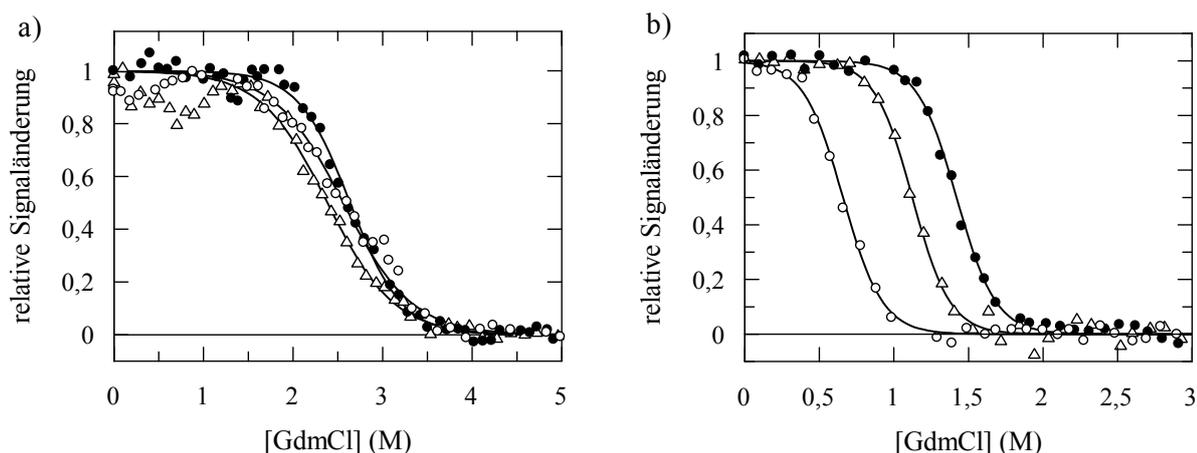


Abbildung 3.1.8: GdmCl-induzierte Entfaltung der P161A- bzw. P213G-substituierten G3P\*-Variante. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenzänderung von WT fd G3P\* (●), fd G3P\* P213G (○) bzw. fd G3P\* P161A (△) als Funktion der GdmCl-Konzentration bei (a) 360 nm nach Anregung bei 295 nm zur Detektion der Entfaltung der N1-Domäne anhand der Trp-Fluoreszenz und bei (b) 310 nm nach Anregung bei 280 nm zur Beobachtung der N2-Domäne anhand der Tyr-Fluoreszenz. Die durchgezogenen Linien stellen Kurvenangleiche an die Messwerte unter Annahme eines Zweizustandsmodells dar. Die Daten für WT fd G3P wurden der Arbeit <sup>121</sup> entnommen. Die Übergänge wurden bei 25 °C mit 0,5 μM WT fd G3P bzw. 1 μM fd G3P P213G und fd G3P P161A in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 1cm gemessen. Die aus der Datenanalyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.1.2 aufgelistet.

Tabelle 3.1.2: Stabilitätsdaten von WT fd G3P\* bzw. den Varianten fd G3P\* P161A und fd G3P\* P213G aus GdmCl-induzierter Entfaltung

Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
	[GdmCl] <sub>m</sub> (M)	<i>m</i> (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	Δ <i>G</i> <sup>25 °C</sup> (kJ mol <sup>-1</sup> )	[GdmCl] <sub>m</sub> (M)	<i>m</i> (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	Δ <i>G</i> <sup>25 °C</sup> (kJ mol <sup>-1</sup> )
WT fd G3P*	1,4	18,8	26,6	2,6	8,6	22,2
fd G3P* P161A	1,1	19,7	22,1	2,4	6,7	15,9
fd G3P* P213G	0,7	18,7	12,3	2,6	6,5	16,5

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte [GdmCl]<sub>m</sub>, die Kooperativitätsparameter *m* sowie die auf 0 M GdmCl extrapolierten freien Enthalpien der Entfaltung (Δ*G*) bei 25 °C. Der Übergang der N2-Domäne wurde nach Anregung bei 280 nm anhand der Fluoreszenz bei 310 nm gemessen, der der N1-Domäne bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Für beide Domänen erfolgte die Analyse der Daten nach einem Zweizustandsmodell. Die Daten für WT fd G3P\* wurden der Arbeit <sup>121</sup> entnommen. Die Messungen wurden unter den in Abbildung 3.1.8 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Die N2-Domänen der beiden Substitutionsvarianten sind wieder im Vergleich zum Wildtyp-G3P\* destabilisiert, insbesondere nach Austausch von Pro213 durch Glycin. Die Substitution P161A in der N2-Domäne wirkt sich weniger stark destabilisierend aus. Die unverändert hohen *m*-Werte der Entfaltung der N2-Domäne zeigen jedoch an, dass diese in beiden Varianten an die Entfaltung der Gelenkregion und die Domänenöffnung gekoppelt ist (Tabelle 3.1.2).

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit sich die P161A-Substitution in der N2-Domäne auf den Faltungsmechanismus des G3P\* auswirkt. Dazu wurden zunächst die Rückfaltung von N1 und des globulären Teils der N2-Domäne dieser Variante nach schneller Mischung analysiert. Die Raten beider Reaktionen stimmen mit denen des WT fd G3P\*

überein ( $\Delta$ ;  $\square$ , Abbildung 3.1.9). Auch in dieser Variante falten demnach beide Domänen unabhängig voneinander in schnellen Reaktionen. Die Faltungsraten von N2 mit P161A folgen dabei in ihrem Verlauf denen der N2-Domäne mit *trans*-Pro161 im geöffneten Zustand des G3P\*. Oberhalb von 0,5 M GdmCl ist jedoch keine zusätzliche Phase detektierbar, die der Faltung der N2-Spezies mit *cis*-Pro161 im WT fd G3P\* entspricht.

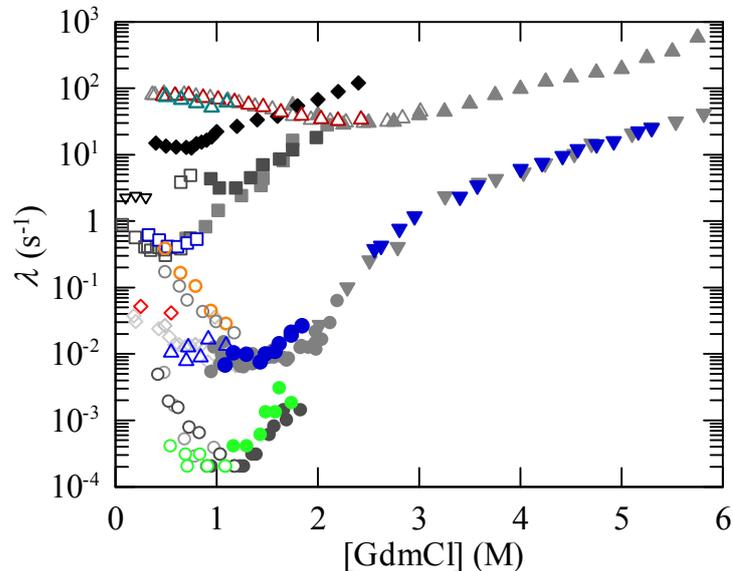


Abbildung 3.1.9. Chevronauftragung der Faltungs- und Entfaltungsraten der Variante fd G3P\* P161A. Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von WT fd G3P\* (graue Symbole) bzw. fd G3P\* P161A (farbige Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die langsamen Entfaltungs- ( $\bullet$ ;  $\circ$ ;  $\blacklozenge$ ;  $\blacktriangledown$ ) und Rückfaltungsraten ( $\diamond$ ;  $\triangle$ ;  $\circ$ ;  $\diamond$ ;  $\circ$ ) der N2-Domäne des jeweiligen G3P\* nach manueller Mischung wurden anhand der Änderung der Tyrosinfluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Gezeigt sind außerdem die schnelle Rückfaltung der N1-Domänen ( $\triangle$ ;  $\triangle$ ), die anhand der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt wurde. Die konformationelle Faltung der jeweiligen  $U^{trans}$ -Spezies ( $\square$ ;  $\square$ ) ausgehend von entfaltetem Protein sowie die gekoppelte Entfaltung von N1 und N2 aus dem nativen Zustand ( $\blacktriangledown$ ;  $\blacktriangledown$ ) nach *stopped-flow*-Mischung wurden anhand der Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Die Rückfaltung von N2 ( $\circ$ ;  $\circ$ ) und der N1-Domäne ( $\triangle$ ) ausgehend von denaturiertem Protein mit *cis*-Pro213 wurde nach Entfaltung für 1,5 s in 3,5 M GdmCl und erneutem Sprung in native Bedingungen über die gleiche Sonde detektiert. Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind außerdem die Entfaltungsraten der N2-Domäne nach 20 bzw. 150 s Rückfaltungsdauer in 0,5 M GdmCl ( $\blacksquare$ ;  $\blacksquare$ ), die Entfaltungsraten der N1-Domäne ( $\blacktriangle$ ) im ungedockten WT fd G3P\* sowie die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne ( $\blacklozenge$ ;  $\blacktriangledown$ ). Einige der Daten des WT fd G3P\* wurden, wie in Abbildung 3.1.2 beschrieben, der Diplomarbeit von Roman Jakob entnommen.<sup>150</sup> Alle Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 1  $\mu$ M Protein bei 25 °C durchgeführt.

Auch nach Austausch von Pro161 gegen Alanin erfolgt die langsame, nach manueller Mischung detektierte Rückfaltung in mehreren Phasen ( $\diamond$ ;  $\triangle$ ;  $\circ$ , Abbildung 3.1.10). Bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen ist lediglich eine Reaktion ( $\diamond$ ,  $\tau = 19,2$  s in 0,25 M GdmCl) mit einer geringen Amplitude detektierbar (Abbildung 3.1.10a), da die konformationelle Faltung der N2-Domäne zum großen Teil bereits in der Totzeit der manuellen Mischung abläuft (Abbildung 3.1.9). Diese Faltungsphase war auch für die isolierte N2-Domäne mit der P161A-Substitution beobachtet worden. Es wurde vermutet, dass sie die durch die *cis*  $\rightarrow$  *trans*-Isomerisierung der zusätzlich in N2 enthaltenen Prolinreste limitierte Faltung der N2-Domäne reflektiert. Diese Reaktion wird im WT fd G3P\* durch die Isomerisierung des Pro161 überdeckt, die im gleichen Zeitbereich abläuft.<sup>151</sup>

Oberhalb von 0,5 M GdmCl kann nur noch ein kleiner Teil der N2-Domäne vor der Assoziation mit N1 in die native Form übergehen. Die Faltung wird vielmehr durch die langsame *trans*→*cis*-Isomerisierung des Pro213 bestimmt, wodurch der assoziierte Zustand eingenommen und die N2-Domäne ausreichend stabilisiert wird (Abbildung 3.1.10c,b). Diese langsame Reaktion zeigt demnach auch die größte Amplitude (○, Abbildung 3.1.10d). Zusätzlich ist eine intermediäre Phase mit einer Zeitkonstante von etwa 100 s detektierbar, deren geringe Amplitude jedoch interessanterweise in die entgegengesetzte Richtung zeigt (△, Abbildung 3.1.10b-d). Die genaue Ursache der Signaländerung ist nicht bekannt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie lediglich durch Bleicheffekte verursacht wird, da die Probe während der ersten 240 s permanenter Lichteinstrahlung ausgesetzt war.

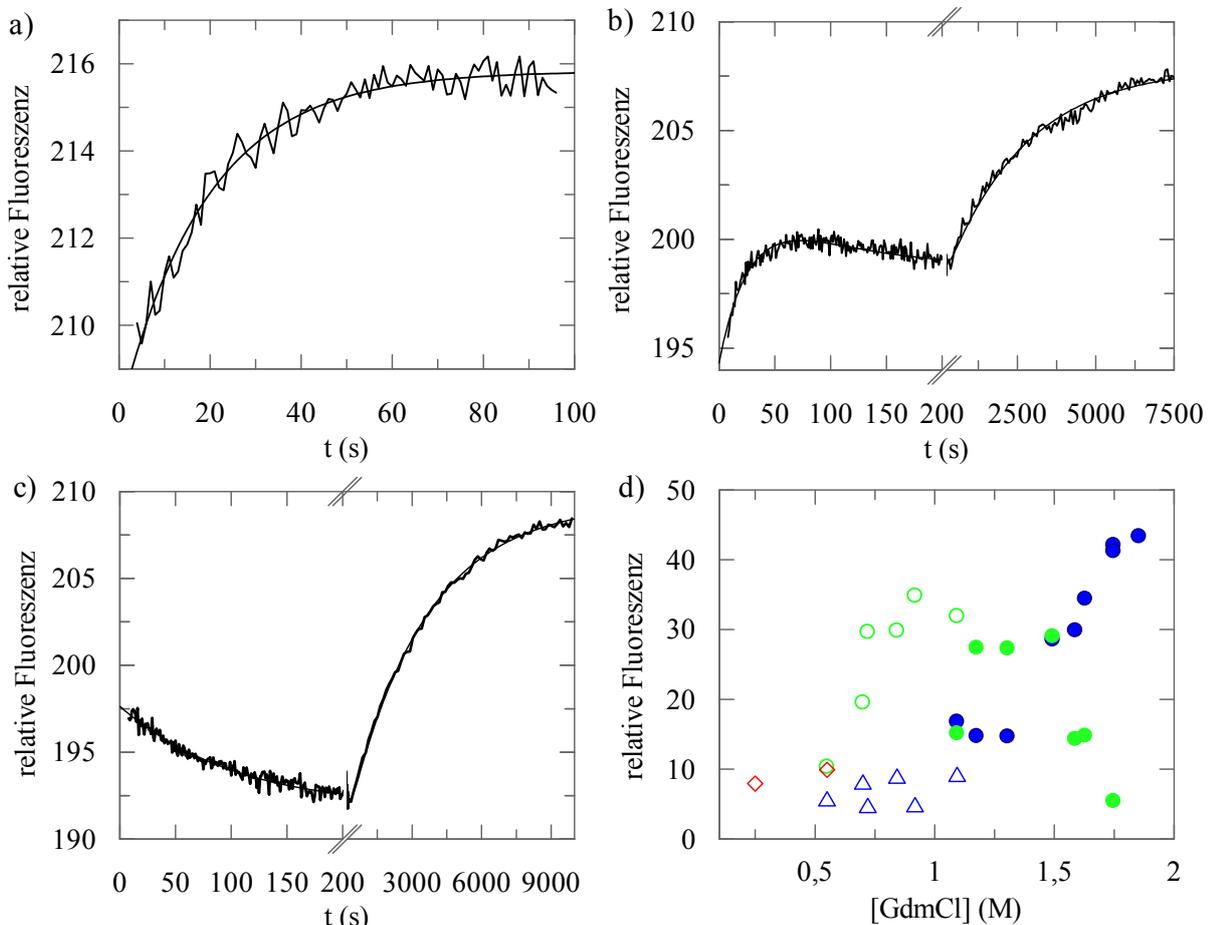


Abbildung 3.1.10. Rückfaltungskinetiken von fd G3P\* P161A in Abhängigkeit der GdmCl-Konzentration. Gezeigt sind die Faltungsreaktionen von 1  $\mu$ M entfaltetem fd G3P\* P161A nach Verdünnung in a) 0,25 M, b) 0,55 M bzw. c) 0,7 M GdmCl. Die schwarzen durchgezogenen Linien stellen Angleiche an die Daten mit mono-, bi- bzw. triexponentiellen Gleichungen da. Die daraus erhaltenen Zeitkonstanten ergeben sich zu a)  $\tau = 19,2$  s, b)  $\tau_1 = 29$  s,  $\tau_2 = 94$  s und  $\tau_3 = 2564$  s, c)  $\tau_1 = 127$  s und  $\tau_2 = 3300$  s. d) Auftragung der Amplituden der schnelleren (●) und langsamsten Entfaltungsphase (●) sowie der schnellen (◇), intermediären (△) und langsamsten (○) Rückfaltungsreaktionen der N2-Domäne im fd G3P\* P161A als Funktion der GdmCl-Konzentration. Die Daten wurden nach manueller Mischung bei 310 nm anhand der Tyr-Fluoreszenz (Anregung 280 nm) in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 bei 25 °C gemessen.

Wie bereits vermutet wird die Entfaltung des Proteins durch die Alanin-Substitution nicht verändert. Die Zeitkonstanten der monophasischen Entfaltungskinetiken von nativem

fd G3P\* P161A bei hohen GdmCl-Konzentrationen entsprechen denen des WT fd G3P\* (▼, Abbildung 3.1.9). Im Bereich von 1 bis 2 M GdmCl erfolgt die Entfaltung der N2-Domäne in einem zweiphasigen Prozess (●;●, Abbildung 3.1.9, Abbildung 3.1.10). Dem Raten- bzw. Amplitudenverlauf nach kann die schnelle Reaktion der konformationellen Entfaltung der N2-Domäne aus dem assoziierten Zustand (●), die langsamere (●) der Isomerisierung des Pro213 zugeordnet werden. Dass durch den AS-Austausch die Stabilität der N2-Domäne im Vergleich zu N2 im Wildtyp-Protein leicht verringert ist, zeigt sich in der geringfügigen Verschiebung des Chevronastes zu niedrigeren GdmCl-Konzentrationen (●;●, Abbildung 3.1.9).

Die Rückfaltung der N2-Domäne in den gedockten Zustand wurde wiederum über Doppelmischexperimente ermittelt, indem natives fd G3P\* P161A zunächst kurz für 1,5 s in 3,5 M GdmCl zur Population der  $U_{cis}$ -Spezies entfaltet wurde. Wie bereits ausgeführt, ist dieser Entfaltungspuls ausreichend, um das Protein konformationell zu entfalten, allerdings behält Pro213 in der Gelenkregion weitgehend seine *cis*-Konformation, so dass sich bei der Rückfaltung unmittelbar der geschlossene Zustand ausbilden kann. Im Gegensatz zu WT fd G3P\* sind während der Rückfaltung lediglich zwei Phasen detektierbar, wobei die schnellere der beiden die Faltung der N1-Domäne widerspiegelt (△, Abbildung 3.1.9). Die langsame Phase (○, Abbildung 3.1.9) reflektiert die Faltung der N2-Domäne. Ihre Rate entspricht der Rate der Bildung der  $N_{cis}^{trans}$ -Spezies in WT fd G3P\* (○, Abbildung 3.1.9). Die Analyse des entsprechenden Chevrons zeigt, dass die N2-Domäne bei der Faltung in die gedockte Form wiederum deutlich stabiler ist als bei Rückfaltung von vollständig denaturiertem G3P\* in den nicht assoziierten Zustand. Bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen stimmen die jeweiligen Faltungsraten jedoch wieder gut überein ( $\tau(U_{cis} \rightarrow N_{cis}) = 2,7$  s;  $\tau(U_{trans} \rightarrow N_{trans}) = 2,1$  s, jeweils in 0,5 M GdmCl, Abbildung 3.1.9, ○;□). Der Ablauf der Faltung der N2-Domäne wird demnach auch in fd G3P\* P161A nicht durch die Konformation des Pro213 beeinflusst. Die deutliche Stabilisierung der N2-Domäne in Gegenwart von *cis*-Pro213 wird vielmehr über die dann mögliche Assoziation mit der gefalteten N1-Domäne erreicht. Das Fehlen der Rückfaltungsphase mit einer Zeitkonstante von 0,134 s (in 0,64 M GdmCl), die im Ausgangsprotein die Bildung der  $N_{cis}^{cis}$ -Form reflektiert (△, Abbildung 3.1.5), bestätigt, dass die Faltung von fd G3P\* P161A im Wesentlichen der Faltung der Form des WT fd G3P mit *trans*-Pro161 folgt.

### 3.1.5 Durch den Austausch des Pro213 gegen Glycin liegt das WT fd G3P\* teilweise in nicht assoziierter Form vor

Anders als die P161A-Substitution hat der Austausch von Pro213 gegen Glycin einen deutlich negativen Einfluss auf die Stabilität der N2-Domäne des WT fd G3P, was sich auch in der Rückfaltungskinetik der Variante fd G3P\* P213G widerspiegelt. Während der Faltung ausgehend von vollständig denaturiertem fd G3P\* P213G sind drei Reaktionen spektroskopisch sichtbar (Abbildung 3.1.11). Die Verläufe der Faltungsraten der N1-Domäne

( $\triangle$ , Abbildung 3.1.11) und des globulären Teils der N2-Domäne mit Pro161 in *trans*-Konformation ( $\square$ , Abbildung 3.1.11) stimmen dabei mit den entsprechenden Raten überein, die für das Wildtyp-Protein erhalten worden waren. Die Stabilität des globulären Teils der N2-Domäne im nicht assoziierten Zustand ist also trotz des Austausches in der Gelenkregion unverändert. Nach manueller Mischung konnte dagegen nur eine Faltungsreaktion detektiert werden, deren Rate der Isomerisierung von Pro161 in seine *cis*-Konformation entspricht ( $\diamond$ , Abbildung 3.1.11). Die langsamste Reaktion, die der Bildung der assoziierten Form beim WT fd G3P entspricht, konnte bei fd G3P\* P213G nicht nachgewiesen werden.

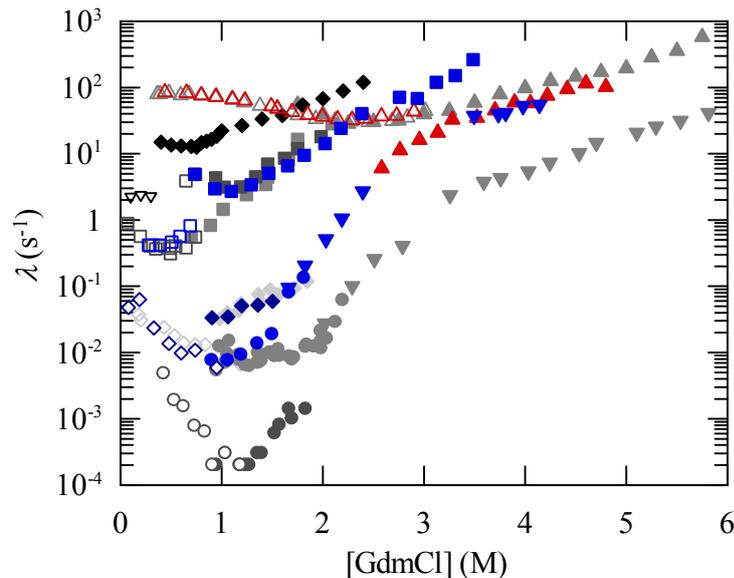


Abbildung 3.1.11. Chevronauftragung der Faltungs- und Entfaltungsraten des fd G3P\* P213G. Auftragung der apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von WT fd G3P\* (graue Symbole) bzw. fd G3P\* P213G (farbige Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Entfaltungs- ( $\bullet$ ;  $\blacklozenge$ ;  $\circ$ ;  $\bullet$ ) und Rückfaltungsraten ( $\diamond$ ;  $\diamond$ ;  $\circ$ ) der N2-Domäne des jeweiligen G3P\* nach manueller Mischung wurden anhand der Änderung der Tyrosinfluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Gezeigt sind außerdem die schnelle Rückfaltung der N1-Domänen ( $\triangle$ ;  $\triangle$ ), die anhand der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt wurde. Die konformationelle Faltung der jeweiligen  $U^{trans}$ -Spezies ( $\square$ ;  $\square$ ) ausgehend von entfaltetem Protein sowie die Entfaltung von N1 und N2 aus dem nativen Zustand ( $\blacktriangledown$ ;  $\blacktriangle$ ;  $\blacktriangledown$ ) wurden nach *stopped-flow*-Mischung anhand der Änderung der Fluoreszenz oberhalb von 320 nm (Anregung 280 nm; bzw. N1: Anregung bei 295 nm, Emission oberhalb von 340 nm) beobachtet. Die Entfaltung der  $N^{cis}$ -Spezies aus dem nicht assoziierten Zustand ( $\blacksquare$ ) konnte bereits in Einzelsprungexperimenten nach schneller Mischung anhand der gleichen Sonde detektiert werden. Im WT fd G3P\* sind diese Raten dagegen erst nach Rückfaltung für 20 bzw. 150 s in 0,5 M GdmCl und erneuter Überführung in Entfaltungsbedingungen beobachtbar ( $\blacksquare$ ;  $\blacksquare$ ). Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind außerdem die Entfaltungsraten der N1-Domäne ( $\blacktriangle$ ) im ungedockten WT fd G3P\* sowie die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne ( $\blacklozenge$ ;  $\blacktriangledown$ ). Einige der Daten des WT fd G3P\* wurden, wie in Abbildung 3.1.3 beschrieben, der Diplomarbeit von Roman Jakob entnommen.<sup>150</sup> Die Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 0,5 bzw. 1  $\mu$ M Protein bei 25 °C durchgeführt.

Der Verlauf der Rückfaltung deutet darauf hin, dass durch den Austausch des Pro213 gegen Glycin die Einnahme des gedockten Zustandes und damit die Stabilisierung der N2-Domäne verhindert werden und deshalb ein großer Teil der Proteine in geöffneter Form vorliegt. Tatsächlich ergeben sich bei der Entfaltung ausgehend von nativem Protein im Bereich von 1 bis 2 M GdmCl drei Phasen ( $\bullet$ ;  $\blacklozenge$ ;  $\blacksquare$ , Abbildung 3.1.11). Die Raten der schnellsten Entfaltungsreaktion, die nach *stopped-Flow*-Mischung detektiert wurde, stimmen

mit denen der Denaturierung von nicht assoziierter  $N^{cis}$ -Spezies im WT fd G3P\* überein (■;■, Abbildung 3.1.11), die in letzterem Fall jedoch erst über Doppelmischexperimente zugänglich ist. Im Gegensatz zum Wildtyp-Protein ist folglich die Entfaltung zumindest eines Teils der Moleküle des fd G3P\* P213G tatsächlich nicht durch die Dissoziation der Domänen limitiert.

Die intermediäre Phase (◆, Abbildung 3.1.11), die nach manueller Mischung erhalten wurde, entspricht mit einer Zeitkonstante von  $\tau = 29$  s (in 1,1 M GdmCl) der durch die  $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung von Pro161 limitierten Denaturierung von N2 im WT fd G3P\* ( $\tau = 27$  s in 1,1 M GdmCl). Die Raten der langsamen Entfaltungsreaktion der N2-Domäne (▼;●, Abbildung 3.1.11) gehen dem Verlauf nach in den Entfaltungsast von N1 ausgehend von nativem Protein über (▲, Abbildung 3.1.11). Oberhalb von 3,5 M GdmCl stimmen die über beide Sonden erhaltenen Entfaltungskinetiken überein. Die Zeitkonstante dieser Reaktion ( $\tau = 25$  ms in 3,7 M GdmCl) ist dabei zehnmal geringer als im WT fd G3P\* ( $\tau = 230$  ms in 3,7 M GdmCl) und entspricht damit der Zeitkonstante der Entfaltung der isolierten N1-Domäne. Dies bedeutet zum einen, dass trotz des Fehlens von Pro213 ein Teil der Population einen Zustand einnehmen kann, in dem durch die Assoziation der beiden Domänen die Entfaltung von N1 an die der N2-Domäne gekoppelt ist. Zum anderen weist die erhöhte Entfaltungsgeschwindigkeit der Domänen darauf hin, dass ihre Kopplung in diesem Zustand und damit die Stabilisierung von N2 deutlich schwächer ist als im Wildtyp-Protein. Tatsächlich ist der Entfaltungsast dieser assoziierten Spezies zu niedrigeren GdmCl-Konzentrationen verschoben. Dabei liegen die unterhalb von 1,6 M GdmCl nach manueller Mischung erhaltenen Raten der Entfaltung von N2 aus dieser assoziierten Form (●, Abbildung 3.1.11) im Zeitbereich der Raten der konformationellen Entfaltung der  $N_{cis}$ -Form von WT fd G3P\* (●, Abbildung 3.1.11).

Die Variante fd G3P\* P213G liegt folglich als Mischung aus geschlossener und offener Form vor. Dies erklärt auch die von Barbara Eckert beobachtete hohe Infektiosität des entsprechenden Phagen gegenüber pilusfreien *E. coli* HB2156 Zellen, bei deren Infektion die Zugänglichkeit der N1-Domäne für ihren Rezeptor, die C-terminale Domäne des Membranproteins TolA, von entscheidender Bedeutung ist.<sup>96</sup> Im Vergleich zum Ausgangsphagen ist der Phage mit P213G-Substitution hundertfach infektiöser, was auf die durch die Domänendissoziation deutlich bessere Exposition der Bindungsfläche auf der N1-Domäne zurückgeführt werden kann.

### 3.1.6 Die Geschwindigkeit der Assoziation der Domänen im fd G3P\* P213G ist gegenüber der $trans \rightarrow cis$ -Isomerisierung von Pro213 deutlich beschleunigt

Die Assemblierung von N1 und N2 im fd G3P\* P213G ist spektroskopisch nicht sichtbar. Um Informationen über die Geschwindigkeit der Bildung des assoziierten Zustandes zu erhalten, wurde daher ein Zweischnitt-Entfaltungstest für native Moleküle durchgeführt.<sup>142; 143</sup> Dazu wurde entfaltetes fd G3P\* P213G analog zu den bereits beschriebenen

Doppelmischexperimenten zunächst in 0,3 M GdmCl rückgefaltet und anschließend wieder entfaltet, wobei diesmal die Dauer der Rückfaltung und nicht die Entfaltungsbedingungen variiert wurden. Zur Detektion nach manueller Mischung wurde die Denaturierung von N2 in 1 M GdmCl verfolgt. Unter diesen Bedingungen ist die Rückfaltung der N2-Domäne ein zweiphasiger Prozess mit Zeitkonstanten von 25 s bzw. 120 s (◆;●, Abbildung 3.1.11). Die Zunahme der Amplituden dieser beiden Entfaltungsreaktionen ist dabei ein Maß für die Moleküle, die den stabilen Intermediatzustand bzw. die native Form erreicht haben. Die Proteine, in denen die N2-Domäne noch nicht in die stabilisierte oder gar assoziierte Form übergegangen ist, entfalten in der Totzeit der manuellen Mischung. In Abbildung 3.1.12 sind die gemessenen Amplituden der beiden Phasen in Abhängigkeit der Rückfaltungsdauer aufgetragen.

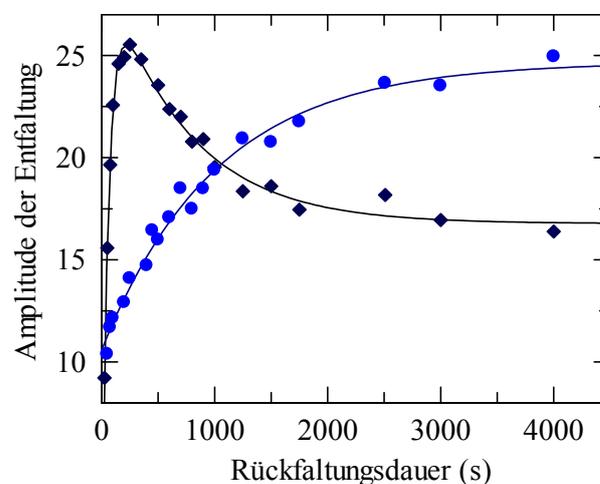


Abbildung 3.1.12. Bestimmung der Assoziationsrate der Domänen des fd G3P\* P213G.

Aufgetragen sind die Amplituden der schnellen ( $\tau = 25$  s, ◆) und langsamen ( $\tau = 120$  s, ●) Entfaltungsphase in 1,0 M GdmCl nach manueller Mischung in Abhängigkeit der Rückfaltungsdauer in 0,3 M GdmCl. Die Reaktionen wurden anhand der Tyr-Fluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm mit 1  $\mu$ M Protein in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 bei 25 °C verfolgt. In 3,3 M GdmCl denaturiertes fd G3P\* P213G wurde dabei durch elffache Verdünnung in 0,3 M GdmCl unterschiedlich lang rückgefaltet und danach in 1 M GdmCl erneut entfaltet. Die durchgezogenen Linien stellen den Angleich mono- bzw. biexponentieller Funktionen an die Daten dar. Für die schnelle Faltungsphase ergeben sich Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 61$  s und  $\tau_2 = 712$  s, für die langsame Reaktion ein Wert von  $\tau = 1020$  s.

Die schnelle Reaktion spiegelt die Entfaltung der  $N_{trans}^{cis}$ -Spezies wider, die limitiert wird durch die Isomerisierung von Pro161 in die nicht native *trans*-Konformation. Aus der Analyse des Amplitudenverlaufes der Phase ergibt sich, dass diese Spezies während der Rückfaltung in 0,3 M GdmCl mit einer Zeitkonstante von 61 s gebildet wird. Dies stimmt mit den aus der Faltung von vollständig denaturierten fd G3P\* P213G erhaltenen Daten überein ( $\tau = 42$  s, Abbildung 3.1.11, ◆). Die Amplitude der schnelleren Entfaltungsreaktion bleibt jedoch nicht konstant, sondern nimmt mit einer Zeitkonstante von 712 s leicht ab (◆, Abbildung 3.1.12). Die Amplitude der langsameren Phase, die die Entfaltung aus dem assoziierten Zustand reflektiert, nimmt dagegen kontinuierlich zu (●, Abbildung 3.1.12). Die Zeitkonstante dieses Anstieges liegt dabei mit 1020 s im Bereich der Abnahme des Signals

der schnellen Phase. Dies deutet darauf hin, dass die Faltung sequenziell abläuft, wobei die beiden Schritte direkt aufeinanderfolgen. Die schwache Assoziation der Domänen in fd G3P\* P213G, durch die die N2-Domäne leicht stabilisiert wird, ist demnach gegenüber der Einnahme des gedockten Zustandes durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro213 in WT fd G3P\* sechsfach beschleunigt.

Wie groß der relative Anteil der Moleküle des fd G3P\* P213G im geschlossenen Zustand ist, lässt sich aus dem Verlauf der Amplituden nicht bestimmen. Mit einer Zeitkonstante von 1000 s ist die Bildung der assoziierten Form des fd G3P\* P213G jedoch noch immer sehr langsam, was darauf hindeutet, dass trotz der Substitution des Pro213 die Isomerisierung einer Peptidbindung (z.B. zwischen Gln212 und Gly213) eine wichtige Rolle spielt. In entfalteten Peptidketten kommen zwar auch Nicht-Peptidylprolylbindungen in der *cis*-Form vor, aus Untersuchungen unter anderem von N-substituierten Amiden geht jedoch hervor, dass der Anteil solcher Konformationen deutlich unter 1 % liegt und daher sehr unwahrscheinlich ist.<sup>107; 155; 156</sup>

Auffällig ist in diesem Zusammenhang auch, dass die auf  $t = 0$  extrapolierten Werte der Amplituden beider Phasen größer null sind. Das bedeutet, dass bei Transfer von entfaltetem fd G3P\* P213G in native Bedingungen bereits in der Totzeit der Handmischung ein Teil der Variante in den stabilen Intermediatzustand  $N_{trans}^{cis}$  bzw. die assoziierte Form  $N_{cis}^{cis}$  übergeht. Dies ist nur dann möglich, wenn im entfalteten Protein die betroffene Peptidbindung im *cis/trans*-Gleichgewicht vorliegt. Welche Bindung im zweiten Fall in die *cis*-Konformation isomerisiert ist unklar. Es ist jedoch bekannt, dass im denaturierten Zustand Prolinreste häufig als Gemisch aus *cis*- und *trans*-Isomer vorkommen, wobei jeweils die *trans*-Spezies dominiert.<sup>106</sup> Für die stabilisierte Variante fd G3P\* IIHY mit der gleichen P213G-Substitution konnte dabei gezeigt werden, dass der Anteil des für die Assoziation erforderlichen *cis*-Isomers im denaturierten Zustand 2,4 % beträgt.<sup>79; 120</sup> Da zusätzlich die für dieses Protein gemessene Zeitkonstante der Assoziation mit 240 s sehr hoch war, wurde spekuliert, dass eventuell die notwendige Isomerisierung durch das zu Gly213 benachbarte Pro214 oder das ebenfalls in der Gelenkregion lokalisierte Pro211 erfolgt.<sup>79</sup>

### 3.1.7 Die Assemblierung des fd G3P\* P213G kann durch den Faltungshelfer hFKBP12+IF beschleunigt werden

Die Einnahme der assoziierten Form während der Rückfaltung zeigt keine Amplitude, weshalb eine mögliche Katalyse durch Prolylisomerasen nicht über die Änderung der Tyr-Fluoreszenz untersucht werden kann. Aus diesem Grund wurde die Rückfaltung der N2-Domäne im G3P\* zusätzlich indirekt über die Freisetzung des sekundären Rezeptors TolAC aus dem Komplex mit der N1-Domäne des G3P\* verfolgt.

Im gedockten Zustand des G3P\* wird die auf der Oberfläche von N1 lokalisierte Interaktionsfläche für die C-terminale Domäne von TolA durch die Interaktion mit der N2-Domäne verborgen. Bei der Infektion interagiert zunächst die N2-Domäne mit dem Pilus der Wirtszelle, woraufhin die Domänen dissoziieren. Die Bindungsstelle auf der N1-Domäne

wird zugänglich und TolAC kann binden.<sup>60; 72; 73</sup> Diese Interaktion kann *in vitro* sehr gut analysiert werden.

Hierfür wird TolAC an einem zusätzlichen Cysteinrest am C-Terminus mit dem Fluoreszenzfarbstoff IAEDANS modifiziert und dann der Energietransfer von den in der N1-Domäne enthaltenen Trp-Resten auf die AEDANS-Einheit gemessen.<sup>80; 97</sup> Die Bindung der isolierten N1-Domäne an TolAC-AEDANS erfolgt dabei innerhalb weniger Sekunden. Durch die Wechselwirkung kommt es aufgrund des Energietransfers zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität des Donors (N1-Domäne), während die Emission des Akzeptors AEDANS in TolAC ansteigt (Abbildung 3.1.13a). Im Verlauf der Rückfaltung des G3P\* erreicht die N1-Domäne innerhalb weniger Millisekunden den für TolAC bindungsaktiven Zustand. Dieser geht jedoch durch die abschließende Assoziation der Domänen wieder verloren. Im nativen G3P\* ist daher der Anteil an N1 mit exponierter Interaktionsfläche so niedrig, dass kaum Försterenergietransfer (FRET) auf TolAC-AEDANS stattfindet (Abbildung 3.1.13b). Die Abnahme der Fluoreszenz der AEDANS-Gruppe bei 490 nm nach Anregung bei 280 nm kann daher als Sonde für die Rückfaltung des G3P\* in den gedockten Zustand verwendet werden, da dadurch TolAC-AEDANS verdrängt wird.

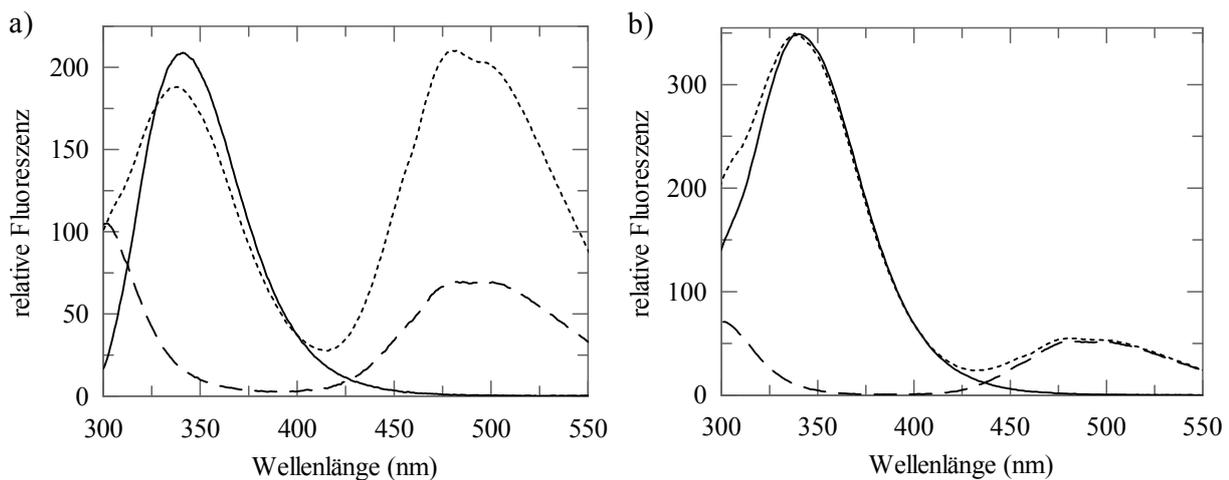


Abbildung 3.1.13: Interaktion des sekundären Rezeptors TolAC-AEDANS mit der N1-Domäne des G3P\*. Auftragung der Fluoreszenzspektren von a) 1  $\mu$ M isolierter N1-Domäne bzw. b) 1  $\mu$ M des WT fd G3P\* jeweils ohne (durchgezogene Linien) und in Gegenwart von 1  $\mu$ M TolAC-AEDANS (gepunktete Linie) sowie 1  $\mu$ M TolAC-AEDANS (gestrichelte Linie). Die Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 bei 25  $^{\circ}$ C durchgeführt.

Durch Verdünnung von denaturiertem G3P\* in 0,5 M GdmCl kommt es zunächst zur Interaktion der N1-Domäne mit TolAC, wodurch der Energietransfer und damit die AEDANS-Fluoreszenz zunimmt. Im Fall des WT fd G3P\* sind während der anschließenden Verdrängung von TolAC-AEDANS und der damit verbundenen Abnahme der Akzeptorfluoreszenz nach manueller Mischung zwei Phasen detektierbar (Abbildung 3.1.14a, Tabelle 3.1.3). Die Zeitkonstanten der beiden Reaktionen entsprechen dabei mit 82 s und 5620 s den durch die Isomerisierung von Pro161 bzw. Pro213 limitierten Faltungsschritten. Tatsächlich kann die hauptsächlich im entfalteten Zustand populierte  $U_{trans}^{trans}$ -Spezies unter den gegebenen Bedingungen nur zum Teil in die  $N_{trans}^{trans}$ -Form übergehen. Erst der Wechsel

von Pro161 in die stabilisierende *cis*-Konformation führt zur vollständigen konformationellen Faltung der N2-Domäne.

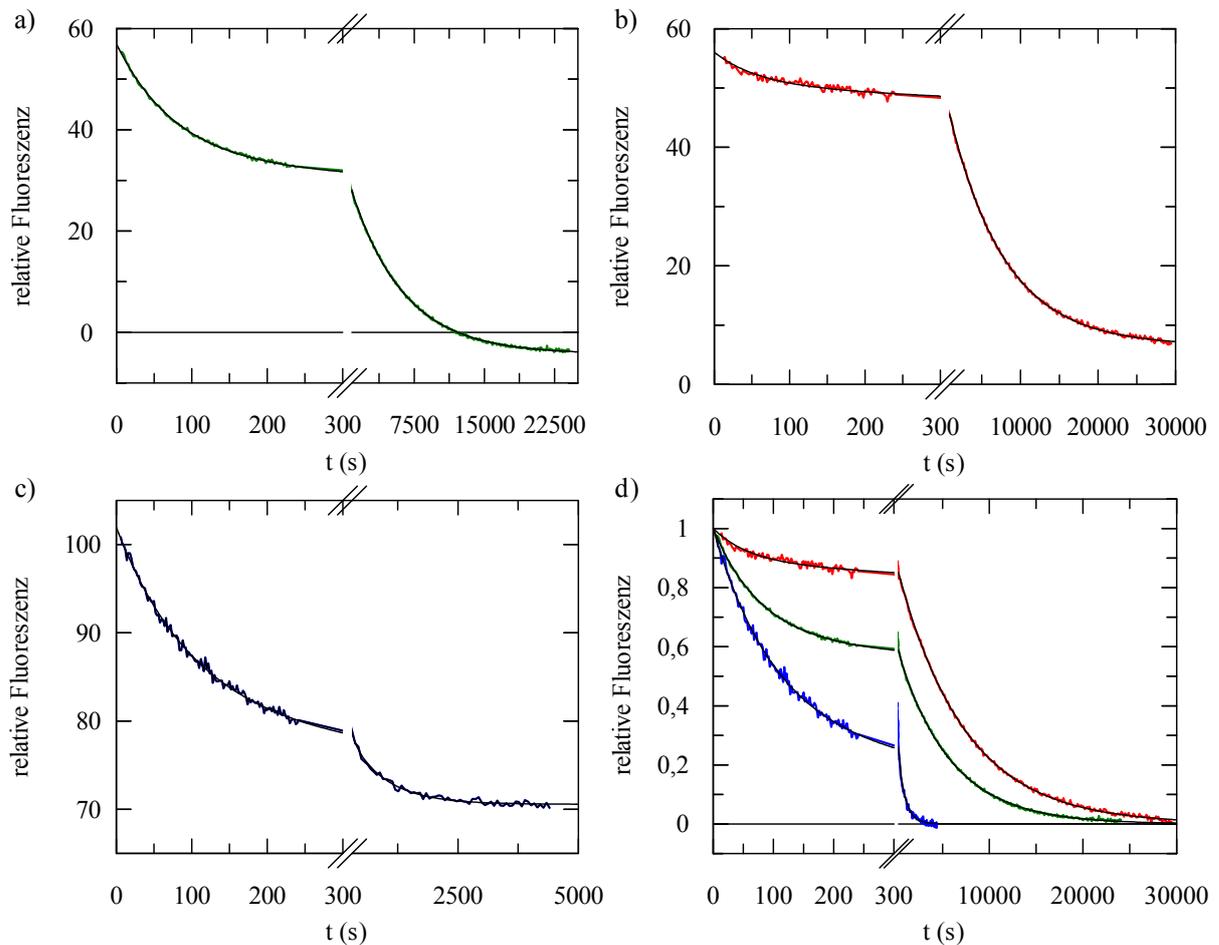


Abbildung 3.1.14: Freisetzung von TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit N1 durch Faltung des G3P\*.

Gezeigt sind die um den Pufferwert korrigierten Kinetiken der Verdrängung von TolAC-AEDANS während der Rückfaltung von a) WT fd G3P\*, b) fd G3P\* P161A und c) fd G3P\* P213G sowie in d) die entsprechend normierten Daten. Die Reaktionen wurden nach zehnfacher Verdünnung des jeweiligen denaturierten Proteins (10  $\mu$ M in 5 M GdmCl) in Gegenwart von 1  $\mu$ M TolAC-AEDANS anhand der AEDANS-Fluoreszenz bei 490 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die schwarzen Linien stellen den Angleich biexponentieller Funktionen an die Daten da. Die daraus resultierten Raten und Amplituden sind in Tabelle 3.1.3 aufgelistet. Die Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, 0,5 M GdmCl, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

Tabelle 3.1.3: Raten und Amplituden der Freisetzung von TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit N1 durch Faltung der jeweiligen G3P\*-Variante.

Variante	$A_1$	$A_2$	$A_{\text{ges}}$	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	$A_1/A_{\text{ges}}$ (%)	$A_2/A_{\text{ges}}$ (%)
WT fd G3P*	23,9	37,4	61,3	82	5260	39	61
fd G3P* P161A	5,7	43,8	49,5	60	7190	11	89
fd G3P* P213G	20,8	10,6	31,4	99	752	66	34
fd G3P* P213G <sup>a</sup>	18,3	14,9	33,1	20	326	55	45

Aufgelistet sind die Raten und Amplituden sowie deren prozentualen Anteile an der Gesamtamplitude aus dem Angleich biexponentieller Funktionen an die Kinetiken der TolAC-AEDANS-Verdrängung durch die Faltung der entsprechenden G3P\*-Variante in Abbildung 3.1.14. <sup>a</sup> Die Verdrängung von TolAC-AEDANS während dieser Reaktion wurde in Gegenwart von 1  $\mu$ M der Prolylisomerase hFKBP12+IF detektiert.<sup>127</sup> Die Messungen wurden unter den in Abbildung 3.1.14 bzw. Abbildung 3.1.15 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Ob die Interaktion zwischen N1 und TolAC allein durch die Einnahme der *cis*-Konformation an Pro161 gestört wird, ist anhand dieser Messung nicht eindeutig feststellbar. Jakob *et al.* konnten zeigen, dass durch diese Isomerisierung stabilisierende Wechselwirkungen zwischen den, die Schleife mit Pro161 flankierenden,  $\beta$ -Faltblättern in der N2-Domäne aufgebaut werden.<sup>157</sup> Diese wirken sich eventuell ungünstig auf die Interaktion mit N1 aus. Möglich ist auch, dass bereits durch die Strukturierung des globulären Teils der N2-Domäne die schwachen Wechselwirkungen mit der N1-Domäne verstärkt werden, und so TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit N1 verdrängt wird. Bei der Rückfaltung der isolierten N1-Domäne in Gegenwart von TolAC-AEDANS war die Fluoreszenz bei 490 nm mit 150 Einheiten deutlich höher als in den in Abbildung 3.1.14 gezeigten Experimenten (Daten nicht dargestellt). In den G3P\*-Varianten werden demnach tatsächlich bereits in der Totzeit der manuellen Mischung schwache Domäneninteraktionen mit der *trans*-Form der N2-Domäne aufgebaut, die die Wechselwirkung von N1 und TolAC-AEDANS behindern.

Für die vollständige Freisetzung von TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit N1 ist die Einnahme der nativen Konformation, in der WT fd G3P\* fast ausschließlich im gedockten Zustand vorkommt, notwendig (Abbildung 3.1.14). Dass dabei die Werte nach Korrektur um die Fluoreszenz des Puffers (in dem TolAC-AEDANS enthalten war) unter Null absinken, ist vermutlich auf Bleicheffekte des AEDANS-Farbstoffes während der Messung zurückzuführen.

Die Freisetzung von TolAC während der Rückfaltung der Variante fd G3P\* P161A erfolgt ebenfalls in einem zweiphasigen Prozess mit Zeitkonstanten von 60 und 7190 s, wobei die Gesamtamplitude der detektierbaren Verdrängung leicht verringert ist (Abbildung 3.1.14). Im nativen Zustand dieser leicht destabilisierten Variante sind demnach mehr Moleküle in der geöffneten Konformation als im Wildtyp-Protein. Erwartungsgemäß ist außerdem die Amplitude der ersten Phase mit einem Anteil von 11 % an der Gesamtamplitude im Vergleich zu der des WT fd G3P\* (39 %) deutlich verringert (Abbildung 3.1.14d, Tabelle 3.1.3). Aufgrund der Alaninsubstitution liegt Position 161 permanent in *trans*-Konformation vor. Die bereits im entsprechenden Rückfaltungsexperiment beobachtete schnellere Reaktion ist vermutlich wieder auf die *cis*→*trans*-Isomerisierung weiterer Prolinreste zurückzuführen, die im entfalteten Zustand ebenfalls als Gemisch aus *cis*- und *trans*-Spezies vorkommen. Der Anteil der *cis*-Form ist jedoch niedrig, weshalb die Amplitude der Reaktion deutlich kleiner ist. Durch die anschließende Assoziationsreaktion der Domänen im fd G3P\* P161A wird der Hauptteil des TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit N1 freigesetzt.

In fd G3P\* P213G dagegen kommt es zwar durch die prolylisomerisierungslimitierte Faltung des globulären Teils der N2-Domäne zu einer deutlichen Abnahme der AEDANS-Fluoreszenz in der ersten Phase ( $\tau_1 = 99$  s, Tabelle 3.1.2). Die relative Amplitude der nachfolgenden langsamen Assoziationsreaktion ist im Vergleich zum WT fd G3P\* verringert. Zur detektierbaren Signaländerung trägt sie nur noch mit 34 % bei (Tabelle 3.1.2). Dies deckt sich mit dem Faltungsmechanismus der Variante, nach dem ein Teil der Moleküle während

der Faltung nicht in den assoziierten Zustand übergeht (Abbildung 3.1.11). Bereits durch die Strukturierung von N2 in der Totzeit der manuellen Mischung wird die Wechselwirkung zwischen TolAC-AEDANS und N1 gestört. Die geringe Signaländerung während der langsamen Phase zeigt daher an, dass der Anteil an Molekülen im gedockten Zustand sehr gering ist.

Die Zeitkonstante des letzten Faltungsschrittes ( $\tau = 754$  s) ähnelt den im Doppelmischexperiment erhaltenen Werten (Abbildung 3.1.12). Die Assoziation der Domänen kann folglich über die Verringerung der AEDANS-Fluoreszenz während der Rückfaltung des G3P\* in Gegenwart von TolAC-AEDANS verfolgt werden. Um herauszufinden, ob an dieser Reaktion Prolinreste beteiligt sind, wurde das Verdrängungsexperiment in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  des Faltungshelfers hFKBP12+IF durchgeführt. Dieses Enzym besitzt zusätzlich zur Prolylisomerase hFKBP12 die Chaperondomäne (IF-Domäne) der homologen Prolylisomerase SlyD aus *E. coli*.<sup>127</sup> Dadurch ist zum einen die Prolylisomeraseaktivität deutlich erhöht, zum anderen die Spezifität gegenüber Proteinsubstraten für die AS vor dem Prolinrest herabgesetzt.<sup>158</sup> Die erhaltenen Daten zeigen, dass beide Phasen durch hFKBP12+IF katalysiert werden können (Abbildung 3.1.15, Tabelle 3.1.3), wobei der Effekt auf die erste Reaktion stärker ist als auf die langsame Domänenassoziation. Letztere ist trotzdem zweifach beschleunigt. Da Prolylisomerasen nur die Isomerisierung von Peptidylprolylbindungen katalysieren<sup>159</sup>, bestätigt diese Beobachtung, dass die Einnahme des assoziierten Zustandes des fd G3P\* P213G durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung eines weiteren Prolinrestes in der Gelenkregion erfolgt.

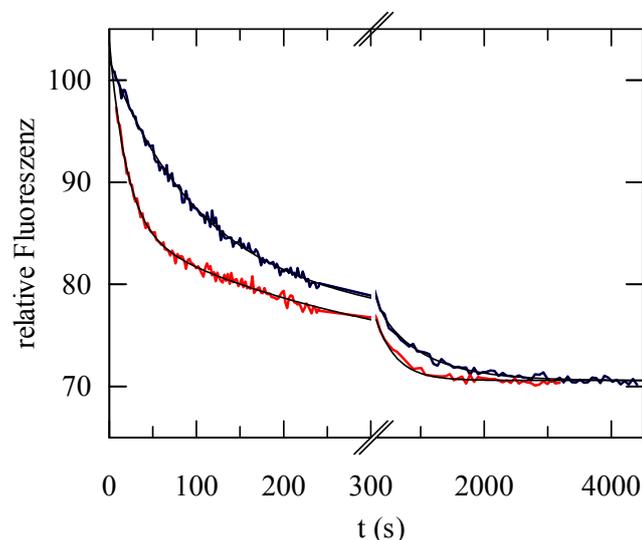


Abbildung 3.1.15: Katalyse der Verdrängung von TolAC-AEDANS durch hFKBP12+IF während der Faltung von fd G3P\* P213G. Gezeigt sind die um den Pufferwert korrigierten Kinetiken der Freisetzung von TolAC-AEDANS während der Rückfaltung von fd G3P\* P213G in Abwesenheit (blau) und in Gegenwart (rot) von  $1 \mu\text{M}$  des Faltungshelfers hFKBP12+IF. Die Reaktionen wurden nach zehnfacher Verdünnung des denaturierten Proteins ( $10 \mu\text{M}$  in  $5 \text{ M GdmCl}$ ) in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  TolAC-AEDANS anhand der AEDANS-Fluoreszenz bei  $490 \text{ nm}$  (Anregung  $280 \text{ nm}$ ) verfolgt. Die Messung wurde in  $0,1 \text{ M KP-Puffer}$ ,  $0,5 \text{ M GdmCl}$ ,  $\text{pH } 7,0$  mit einer Schichtdicke von  $1 \text{ cm}$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die schwarzen Linien stellen den Angleich biexponentieller Funktionen an die Daten mit Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 99 \text{ s}$  und  $\tau_2 = 752 \text{ s}$  (ohne hFKBP12+IF) bzw.  $\tau_1 = 20,6 \text{ s}$  und  $\tau_2 = 327 \text{ s}$  (in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  hFKBP12+IF) dar.

Für die stabilisierte Variante fd G3P\* IIHY P213G konnte keine Beschleunigung der Assoziationsreaktion durch die Prolylisomerase Cyclophilin 18 beobachtet werden.<sup>120</sup> Von Cyclophilin 18 ist jedoch bekannt, dass es die Isomerisierung von Pro213 beschleunigen kann und generell eine geringe Spezifität gegenüber der AS von und nach dem Prolinrest besitzt.<sup>160</sup> Die Ursache für den Unterschied in der Katalysierbarkeit der beiden P213G-Varianten ist nicht bekannt, ein möglicher Grund kann jedoch die Zugänglichkeit der betroffenen Peptidbindung in der Gelenkregion sein. Während im lose-assoziierten Zustand der stabilisierten Variante die Gelenkregion bereits teilweise gefaltet vorliegt<sup>62</sup>, ist sie im langlebigen Faltungsintermediat von WT fd G3P\* unstrukturiert (siehe auch Kapitel 3.2.2). Dies ist wahrscheinlich auch die Ursache für die unterschiedlich starke Beschleunigung der beiden Rückfaltungsphasen in fd G3P\* P213G, denn Pro161 in Schleife 3 der N2-Domäne ist sehr stark lösungsmittlexponiert und damit gut zugänglich für Prolylisomerasen.

### **3.1.8 Die Rückfaltung der N2-Domäne in der stabilisierten Variante fd G3P\* IIHY erfolgt unmittelbar in den lose-assoziierten Zustand**

Nach den vorhandenen Daten ergeben sich signifikante Unterschiede in den Faltungsmechanismen des Wildtyp-Proteins und der stabilisierten Variante fd G3P\* IIHY. Die Entfaltung des nativen WT fd G3P\* erfolgt in zwei spektroskopisch sichtbaren Schritten, wobei die konformationelle Entfaltung der N2-Domäne deutlich schneller ist als die *cis*→*trans*-Isomerisierung von Pro213. Für die stabilisierte G3P\*-Variante ist lediglich eine Entfaltungsphase detektierbar, deren Rate im Übergangsbereich der N2-Domäne der langsamen Prolylisomerisierungsreaktion von Pro213 entspricht (●, Abbildung 3.1.16).<sup>122</sup> Der Entfaltungsast der Variante fd G3P\* IIHY P213G ist zwar zu niedrigeren GdmCl-Konzentrationen verschoben, jedoch sind im Gegensatz zu fd G3P\* P213G neben der Entfaltung aus dem assoziierten Zustand keine weiteren Reaktionen detektierbar (●, Abbildung 3.1.16).<sup>120</sup> Das bedeutet, dass fd G3P\* IIHY im nativen Zustand trotz des Fehlens von Pro213 vollständig in der geschlossenen Konformation vorliegt.

Während der Rückfaltung der stabilisierten G3P\*-Variante bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen sind drei Phasen beobachtbar (▽;△;□, Abbildung 3.1.16), bevor der native Zustand in einer spektroskopisch unsichtbaren Reaktion durch die Isomerisierung von Pro213 ( $\tau = 6200$  s in 0,5 M GdmCl) erreicht wird. Die Strukturierung der N1-Domäne ist dabei wieder innerhalb weniger Millisekunden abgeschlossen. Die N2-Domäne faltet dagegen mit deutlicher Verzögerung in zwei sequenziellen Schritten. Die schnellere der beiden Phasen mit einer Zeitkonstante von 7 s spiegelt dabei die konformationelle Faltung ihres globulären Teils wider. Der zweite Schritt ( $\tau = 42$  s in 0,5 M GdmCl) wurde hier jedoch nicht der Isomerisierung von Pro161, sondern der losen Assoziation der beiden gefalteten Domänen zugeordnet (□, Abbildung 3.1.16).<sup>122</sup> Durch Doppelmischexperimente ließ sich analog zum WT fd G3P\* die Entfaltungsgeschwindigkeit von N2 aus diesem lose assoziierten Zustand bestimmen (■, Abbildung 3.1.16).<sup>122</sup> Sie ist zwar deutlich schneller als die Entfaltung der Domäne aus dem gedockten Zustand, jedoch gleichzeitig erheblich langsamer als die

Denaturierung der entsprechenden isolierten N2-Domäne (◆, Abbildung 3.1.16). Dies zeigt an, dass N2 durch die verstärkte Interaktion mit der N1-Domäne deutlich gegenüber der nicht assoziierten Form stabilisiert ist.

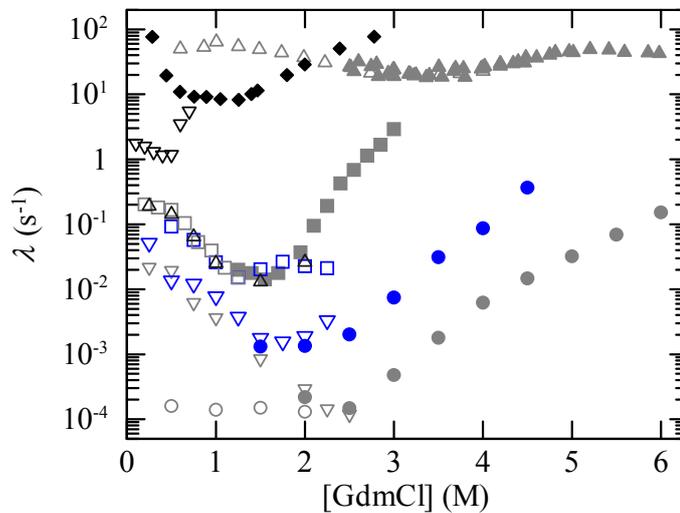


Abbildung 3.1.16. Faltungs- und Entfaltungsraten der Varianten fd G3P\* IIHY und fd G3P\* IIHY P213G. Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von fd G3P\* IIHY (graue Symbole) bzw. fd G3P\* IIHY P213G (blaue Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Bis auf die Raten der isolierten N2 wurden alle Daten den Publikationen<sup>120</sup> und<sup>122</sup> entnommen. Die Entfaltungs- (●, ●) und Rückfaltungsraten (□, ▽; ▽, △) von N2 des jeweiligen G3P\* nach manueller Mischung wurden anhand der Änderung der Tyrosinfluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Gezeigt ist außerdem die schnelle Rückfaltung der N1-Domäne des fd G3P\* IIHY (△) sowie deren Entfaltung aus dem ungedockten Zustand (▲), die über Doppelmischexperimente ermittelt wurde. Die Entfaltung der N2-Domäne des fd G3P\* IIHY aus dem lose-assoziierten Zustand wurde nach Rückfaltung über einen Zeitraum von 180 s in 0,5 M GdmCl und erneutem Sprung in Entfaltungsbedingungen (■) nach manueller Mischung ermittelt. Die konformationelle Faltung von N2 ergab sich über die Rückfaltung für 0,5 s in 0,5 M GdmCl und weitere Verdünnung in niedrigen GdmCl-Konzentrationen (□) nach schneller Mischung. Die Bildung von nativem fd G3P\* IIHY und damit die Rate der Domänenassoziation wurde wie Referenz<sup>122</sup> beschrieben anhand eines Zweischritt-Entfaltungstests für native Moleküle ermittelt (○). Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind außerdem die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne Q129H (◆, ▼).

Dass die Rückfaltung und vor allem die Einnahme des lose-assoziierten Zustandes des stabilisierten G3P\* tatsächlich nicht mehr von der Änderung der Konformation des Pro161 abhängig ist, ergibt sich auch aus den Rückfaltungsexperimenten der drei Varianten fd G3P\* IIHY, fd G3P\* IIHY P213G und fd G3P\* IIHY P161A in Gegenwart von TolAC-AEDANS (Abbildung 3.1.17). Der Angleich an die Daten ist zwar aufgrund fehlender Informationen über den Reaktionsverlauf zu Beginn der Messung stark fehlerbehaftet, aber dennoch zeigt sich, dass nach manueller Mischung die erste detektierbare Rückfaltungsphase auch des fd G3P\* IIHY P161A über 80 % der Gesamtamplitude besitzt. Die Zeitkonstanten dieser Reaktion im fd G3P\* IIHY bzw. fd G3P\* IIHY P213G entsprechen mit 27 bzw. 25 s nicht nur denen der jeweiligen langsamen Rückfaltungsreaktionen (Abbildung 3.1.16), sondern befinden sich genau wie die Zeitkonstante von fd G3P\* IIHY P161A ( $\tau = 24$  s) im Zeitbereich der Isomerisierung von Peptidylprolylbindungen.<sup>106</sup> Die nachgelagerte Reaktion spiegelt die Einnahme des gedockten Zustandes wider, die durch den Austausch von Pro213 gegen Glycin deutlich beschleunigt wird. Die Zeitkonstante von 168 s entspricht dabei relativ

gut der Zeitkonstante der Domänenassoziation, die mit Hilfe eines Zweischritt-Entfaltungstestes für native Moleküle bestimmt worden war ( $\tau = 240$  s).<sup>120</sup>

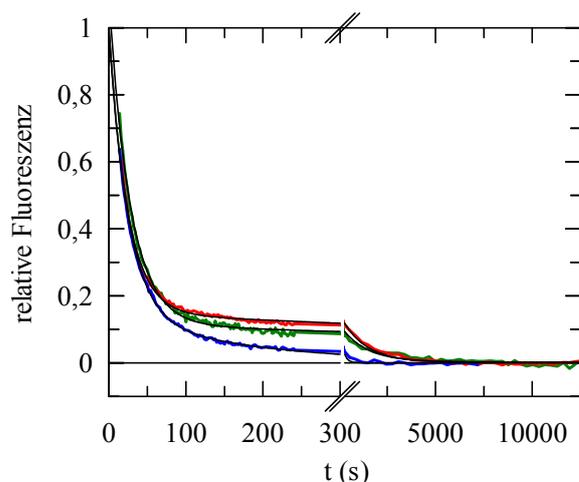


Abbildung 3.1.17: Freisetzung von TolAC-AEDANS durch Faltung der stabilisierten G3P\*-Varianten. Gezeigt sind die normierten Kinetiken der Verdrängung von TolAC-AEDANS während der Rückfaltung von fd G3P\* IIHY (grün), fd G3P\* IIHY P161A (rot) bzw. fd G3P\* IIHY P213G (blau). Die Reaktionen wurden nach elfacher Verdünnung des jeweiligen denaturierten Proteins (11  $\mu$ M in 5,5 M GdmCl) in Gegenwart von 1  $\mu$ M TolAC-AEDANS anhand der AEDANS-Fluoreszenz bei 490 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die schwarzen Linien stellen den Angleich biexponentieller Funktionen an die Daten mit folgenden Zeitkonstanten da:  $\tau_1$ (IIHY) = 27 s,  $\tau_2$ (IIHY) = 1357 s;  $\tau_1$ (P161A) = 24 s,  $\tau_2$ (P161A) = 1263 s und  $\tau_1$ (P213G) = 25 s,  $\tau_2$ (P213G) = 168 s. Die Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, 0,5 M GdmCl, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

Es stellte sich daher die Frage, inwieweit sich die Isomerisierung des Pro161 in der stabilisierten Variante auf den Faltungsmechanismus und die Stabilität auswirkt. Der Übergangsmittelpunkt des thermischen Überganges der N2-Domäne ist ähnlich wie im WT fd G3P\* durch die Alaninsubstitution an Position 161 nur geringfügig von 61,4 auf 59,6 °C verringert, während die Stabilität der N1-Domäne 65,7 °C unverändert ist.<sup>79</sup> Dies deckt sich auch mit den Daten aus der GdmCl-induzierten Entfaltung (Tabelle 3.1.4). Während sich durch den Austausch des Pro213 gegen Glycin eine deutliche Verschiebung des Übergangsmittelpunktes der N2-Domäne zu niedrigeren Denaturierungsmittelkonzentrationen ergibt<sup>79</sup>, ist die N2-Domäne in fd G3P\* IIHY P161A nur leicht gegenüber fd G3P\* IIHY destabilisiert.

Tabelle 3.1.4: Stabilitätsdaten von fd G3P\* IIHY und der Varianten fd G3P\* IIHY P161A und fd G3P\* IIHY P213G aus GdmCl-induzierter Entfaltung

Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
	[GdmCl] <sub>m</sub> (M)	<i>m</i> (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{25\text{ °C}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	[GdmCl] <sub>m</sub> (M)	<i>m</i> (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{25\text{ °C}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
fd G3P* IIHY	2,5	15,9	39,3	3,2	8,9	28,6
fd G3P* IIHY P161A	2,3	16,9	38,8	3,3	8,1	26,7
fd G3P* IIHY P213G	1,7	19,8	34,3	3,2	8,1	26,3

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte [GdmCl]<sub>m</sub>, die Kooperativitätsparameter *m* sowie die auf 0 M GdmCl extrapolierten freien Enthalpien der Entfaltung  $\Delta G$  bei 25 °C. Der Übergang der N2-Domäne wurde nach Anregung bei 280 nm anhand der Fluoreszenz bei 310 nm gemessen, der der N1-Domäne bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Für beide Domänen erfolgte die Analyse der Daten nach einem Zweizustandsmodell. Die Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Die Daten für fd G3P\* IIHY und fd G3P\* IIHY P213G wurden der Arbeit<sup>79</sup> entnommen.

Erwartungsgemäß stimmen daher die Entfaltungsraten der N2-Domäne ausgehend von nativem fd G3P\* IIHY P161A (●, Abbildung 3.1.18a) mit denen von fd G3P\* IIHY überein (●, Abbildung 3.1.18a). Die schnelle Rückfaltung der N1-Domäne ist ebenfalls identisch mit der von fd G3P\* IIHY (△;△, Abbildung 3.1.18a).

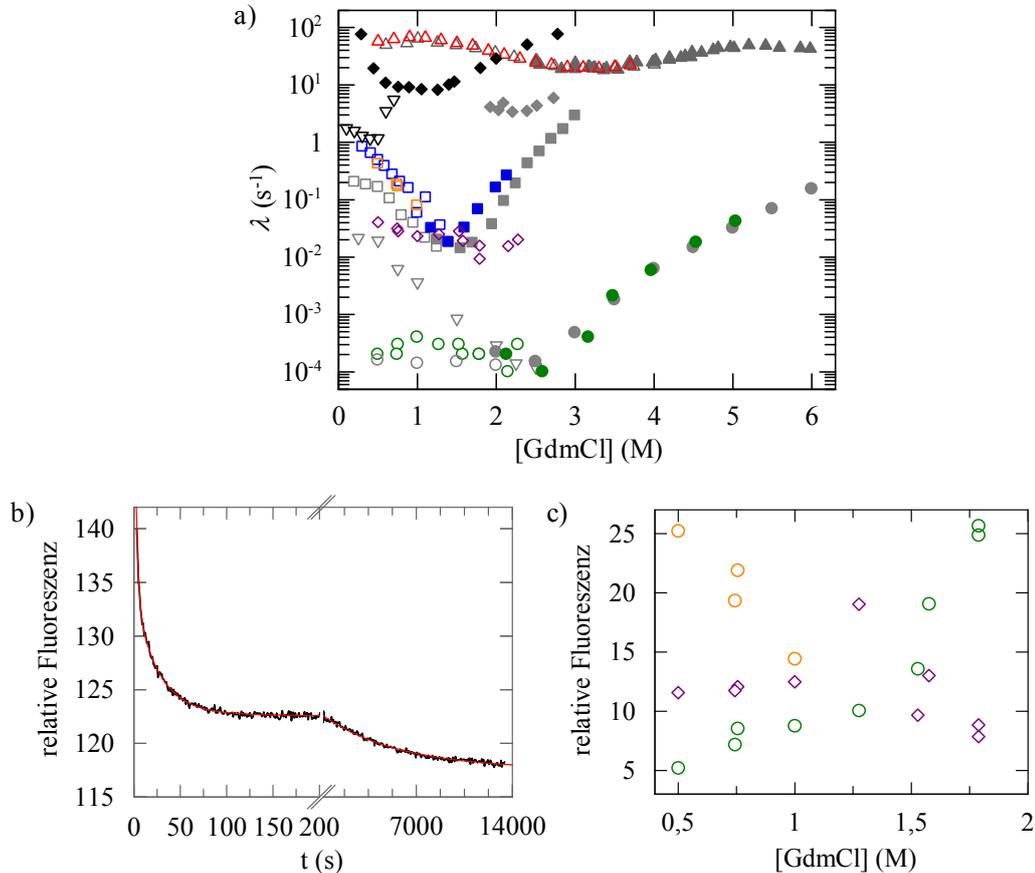


Abbildung 3.1.18: Der Faltungsmechanismus des fd G3P\* IIHY P161A.

a) Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von fd G3P\* IIHY (graue Symbole) bzw. fd G3P\* IIHY P161A (farbige Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Entfaltungs- (●;●) und Rückfaltungsraten (◇;○;○;▽) von N2 des jeweiligen G3P\* nach manueller Mischung gemessen. Die schnelle Rückfaltung der N2-Domäne ausgehend von vollständig entfaltetem fd G3P\* IIHY P161A wurde zusätzlich an einer *stopped-flow*-Apparatur untersucht (□). Gezeigt ist außerdem die Rückfaltung der N1-Domänen (△;△) sowie deren Entfaltung aus dem ungedockten Zustand des fd G3P\* IIHY (▲), die über Doppelmischexperimente ermittelt wurde. Die konformationelle Faltung von N2 des fd G3P\* IIHY wurde nach Rückfaltung für 0,5 s in 0,5 M GdmCl durch Verdünnung in niedrige GdmCl-Konzentrationen (□) gemessen. Die Entfaltung der N2-Domäne aus dem nicht assoziierten Zustand von fd G3P\* IIHY ergab sich durch einen zweiten Sprung in Entfaltungsbedingungen (◆). Die Entfaltung der N2-Domäne aus dem lose-assozierten Zustand wurde nach einer Rückfaltungsdauer von 180 s in 0,5 M GdmCl und erneutem Sprung in Entfaltungsbedingungen über manuelle Mischung erhalten (■;■). Die Rate der Domänenassoziation von fd G3P\* IIHY wurde, wie in Referenz<sup>122</sup> beschrieben, anhand eines Zweischnitt-Entfaltungstests für native Moleküle ermittelt (○). Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind außerdem die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne Q129H (◆;▽). Bis auf die Entfaltungsraten von N2 aus dem nicht assoziierten Zustand wurden die Daten von fd G3P\* IIHY der Publikation<sup>122</sup> entnommen. Die Reaktionen der N1-Domäne wurden anhand der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt, die der N2-Domäne oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm. Die Faltungsraten der N2-Domäne nach manueller Mischung wurden über die Messung der Fluoreszenz bei 310 nm erhalten. b) Rückfaltungskinetik der N2-Domäne in 0,5 M GdmCl ausgehend von vollständig entfaltetem fd G3P\* IIHY P161A. Die Reaktion wurde bei 310 nm (Anregung 280 nm) gemessen. Die rote Linie stellt den Angleich einer triexponentiellen Funktion an die Daten mit Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 2,4$  s,  $\tau_2 = 24,7$  s und  $\tau_3 = 5640$  s da. c) Auftragung der Fluoreszenzamplituden der Tyrosinfluoreszenz der schnellen (○), intermediären (◇) und langsamen Rückfaltung (○) der N2-Domäne in fd G3P\* IIHY P161A als Funktion der GdmCl-Konzentration. Die Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 1  $\mu$ M Protein bei 25 °C durchgeführt.

Während der Rückfaltung nach manueller Mischung sind drei Phasen detektierbar ( $\diamond$ ;  $\circ$ ;  $\circ$ , Abbildung 3.1.18). Mit einer Zeitkonstante von 5640 s (in 0,5 M GdmCl) spiegelt die langsame Phase die Faltung von N2 durch die Pro213-limitierte Einnahme des gedockten Zustandes wider ( $\circ$ , Abbildung 3.1.18b). Im Gegensatz zu fd G3P\* IIHY ist diese Reaktion jedoch auch bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen beobachtbar, allerdings nur mit einer geringen Amplitude ( $\circ$ , Abbildung 3.1.18c). Dies zeigt, dass hier ein kleiner Teil der  $U^{trans}$ -Spezies während der Faltung nicht die native Konformation einnehmen kann. Ab 1,5 M GdmCl ergibt sich eine deutliche Zunahme der Amplitude, da die N2-Domäne bei diesen Denaturierungskonzentrationen nur noch durch die Einnahme des gedockten Zustandes ausreichend stabilisiert wird ( $\circ$ , Abbildung 3.1.18c). Auffällig ist zudem, dass die Raten über den gesamten untersuchten Bereich unabhängig von der GdmCl-Konzentration sind. Die scheinbare Beschleunigung der langsamen Rückfaltung von fd G3P\* IIHY bei geringen GdmCl-Konzentrationen kann demnach zum Teil auf die Isomerisierung von Pro161 und die damit verbundene Bildung der stabileren *cis*-Spezies zurückgeführt werden.

Während der Rückfaltung des fd G3P\* IIHY P161A ist noch eine weitere GdmCl-unabhängige Phase beobachtbar, deren Zeitkonstante mit 24,7 s in 0,5 M GdmCl der schnellen Verdrängung von TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit N1 während der Rückfaltung des Proteins entspricht ( $\tau = 24$  s, Abbildung 3.1.17,  $\diamond$ ). Wie bereits erwähnt ist die Denaturierungsmittelunabhängigkeit ein Anzeichen dafür, dass die Geschwindigkeit der entsprechenden Reaktion durch Prolylisomerisierungen limitiert ist.<sup>106; 153</sup> Um dies zu überprüfen wurde die Katalysierbarkeit der Phase durch die Prolylisomerase hFKBP12+IF untersucht (Abbildung 3.1.19).

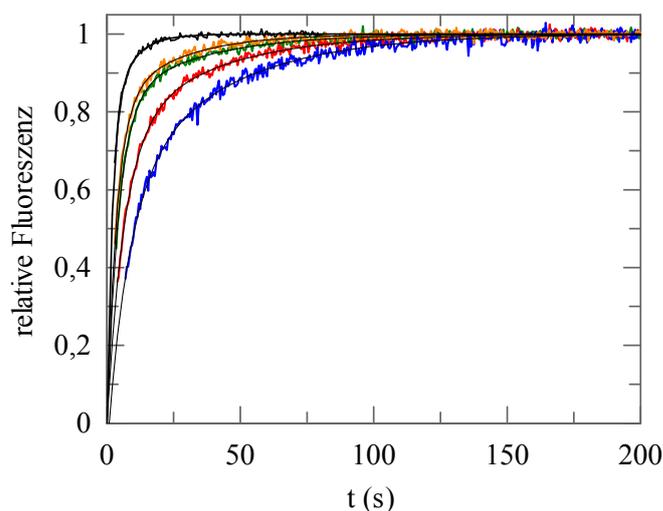


Abbildung 3.1.19: Katalyse der Rückfaltung von fd G3P\* IIHY P161A durch den Faltungshelfer hFKBP12+IF. Gezeigt sind die Rückfaltungskinetiken von 1  $\mu$ M entfaltetem fd G3P\* IIHY P161A in 0,6 M GdmCl in Abwesenheit (blau) bzw. Anwesenheit von 50 nM (rot), 200 nM (grün), 300 nM (orange) bzw. 1  $\mu$ M (schwarz) des Faltungshelfers hFKBP12+IF. Die durchgezogenen Linien stellen den Angleich von biexponentiellen Gleichungen an die Daten mit folgenden Zeitkonstanten dar:  $\tau_1(\text{ohne}) = 8,0$  s,  $\tau_2(\text{ohne}) = 38,5$  s;  $\tau_1(50 \text{ nM}) = 6,5$  s,  $\tau_2(50 \text{ nM}) = 34,8$  s;  $\tau_1(200 \text{ nM}) = 4,4$  s,  $\tau_2(200 \text{ nM}) = 30,8$  s;  $\tau_1(300 \text{ nM}) = 3,7$  s,  $\tau_2(300 \text{ nM}) = 23,5$  s;  $\tau_1(1 \mu\text{M}) = 2,0$  s,  $\tau_2(1 \mu\text{M}) = 8,0$  s. Die Reaktionen wurden bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 bei 25 °C gemessen.

Tatsächlich wird nicht nur die intermediäre Phase ( $\tau = 38,5$  s) durch die Prolylisomerase beschleunigt sondern auch die etwas schnellere Reaktion ( $\tau = 8,0$  s). Letztere spiegelt einen Teil der konformationellen Faltung der N2-Domäne wider, welche ebenfalls mehrere Prolinreste beinhaltet (○, Abbildung 3.1.18). Da Pro161 durch Alanin ersetzt wurde, stellt sich die Frage, welche Proline die langsame Reaktion verursachen. Bereits während der Rückfaltung von fd G3P\* P161A war bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen eine Reaktion mit ähnlicher Zeitkonstante und vergleichbar geringer Amplitude beobachtet worden (Abbildung 3.1.18), welche der bereits erwähnten, nachgelagerten *cis*→*trans*-Isomerisierung von Prolinresten in der N2-Domäne zugeordnet wurde. Im Gegensatz zur stabilisierten Variante wird dadurch die Bindungsfähigkeit von TolAC-AEDANS an N1 kaum beeinflusst (Abbildung 3.1.14), da in diesem Protein der lose-assoziierte Zustand nicht populiert wird.

Möglicherweise ist für die Einnahme der lose-assoziierten Form in den stabilisierten G3P\*-Varianten die Konformationsänderung von einem oder mehreren Prolinresten in der Gelenkregion notwendig. Dieser Bereich des G3P\* enthält neben Pro213 sechs weitere Proline. Die Analyse der Kristallstrukturen des WT fd G3P\* und der hyperstabilen Variante 0SS-G3P\*-stab<sup>161</sup>, die neben weiteren Substitutionen auch die vier stabilisierenden Austausche enthält, zeigt, dass im gedockten Zustand des G3P\* nur die Prolinreste 161 und 213 in *cis*-Konformation vorliegen. Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters ist die Aktivierungsenergie für die Rotation um die Peptidbindung sehr hoch.<sup>162</sup> Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass während der Bildung des lose-assoziierten Intermediates zunächst ein Prolinrest in die *cis*-Form isomerisiert, um bei der abschließenden Assoziationsreaktion erneut die Konformation zu wechseln. Denkbar ist jedoch, dass die intermediäre Phase die nachgelagerte Isomerisierung von Prolinresten in der Gelenkregion widerspiegelt, die im entfalteten Zustand teilweise auch in der nicht nativen *cis*-Form vorkommen.<sup>153</sup>

In diesem Fall ist jedoch, entgegen früherer Vermutungen<sup>122</sup>, die Einnahme des langlebigen Intermediates keine sequenziell auf die Faltung des globulären Teils der N2-Domäne folgende Reaktion. Vielmehr geht bereits während der schnellen Rückfaltungsphase ein großer Teil der *U<sup>trans</sup>*-Spezies durch die gleichzeitig stattfindende partielle Strukturierung der Gelenkregion direkt in den lose-assoziierten Zustand über. Bekräftigt wird diese Annahme durch den Verlauf der entsprechenden Faltungsraten im stabilisierten Hintergrund. Bei allen drei hier gezeigten Varianten geht der Rückfaltungsast in den Entfaltungsast der lose-assoziierten Spezies über, der nach Rückfaltung für 180 s in 0,5 M GdmCl und erneutem Sprung in Entfaltungsbedingungen ermittelt wurde (Abbildung 3.1.17 bzw. 3.1.18). Im Vergleich zur isolierten N2-Domäne Q129H ist in den Proteinen dadurch nicht nur der Übergangsmittelpunkt von N2 um mehr als 1 M zu höheren GdmCl-Konzentrationen verschoben sondern auch die Entfaltung der Domäne fast tausendfach verlangsamt (Abbildung 3.1.18). Zwar ist die N2-Domäne im geöffneten WT fd G3P\* ebenfalls leicht gegenüber der isolierten Domäne stabilisiert, der Unterschied fällt jedoch deutlich geringer aus (Abbildung 3.1.3).

Um den Zeitverlauf der Bildung des lose-assoziierten Zustandes zu ermitteln, wurden analog zu fd G3P\* P213G Doppelmischexperimente durchgeführt, indem zunächst durch Verdünnung von entfaltetem fd G3P\* IIHY bzw. fd G3P\* IIHY P161A die Rückfaltung in 0,5 M GdmCl initiiert wurde. Nach variablen Zeitspannen wurde durch einen weiteren Sprung in 2,45 M GdmCl die Entfaltung der Moleküle anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm an einer *stopped-flow*-Apparatur verfolgt. Für beide Proteine wurden biexponentielle Kinetiken mit Zeitkonstanten von  $\tau_1(\text{IIHY}) = 0,18 \text{ s}$  und  $\tau_2(\text{IIHY}) = 1,1 \text{ s}$  bzw.  $\tau_1(\text{P161A}) = 0,25 \text{ s}$  und  $\tau_2(\text{P161A}) = 1 \text{ s}$  erhalten, deren Amplituden in Abbildung 3.1.20 in Abhängigkeit von der Rückfaltungsdauer aufgetragen sind (◆;○). Die schnellere der beiden Phasen spiegelt vermutlich die Entfaltung der N2-Domäne aus dem nicht assoziierten Intermediat wider. Die Zeitkonstanten der zweiten Entfaltungsreaktionen stimmen mit denen der jeweiligen N2-Domäne aus dem lose-assoziierten Zustand überein, die aus Doppelmischexperimenten nach einer Rückfaltungsdauer von 180 s erhalten wurden (■;■, Abbildung 3.1.18)

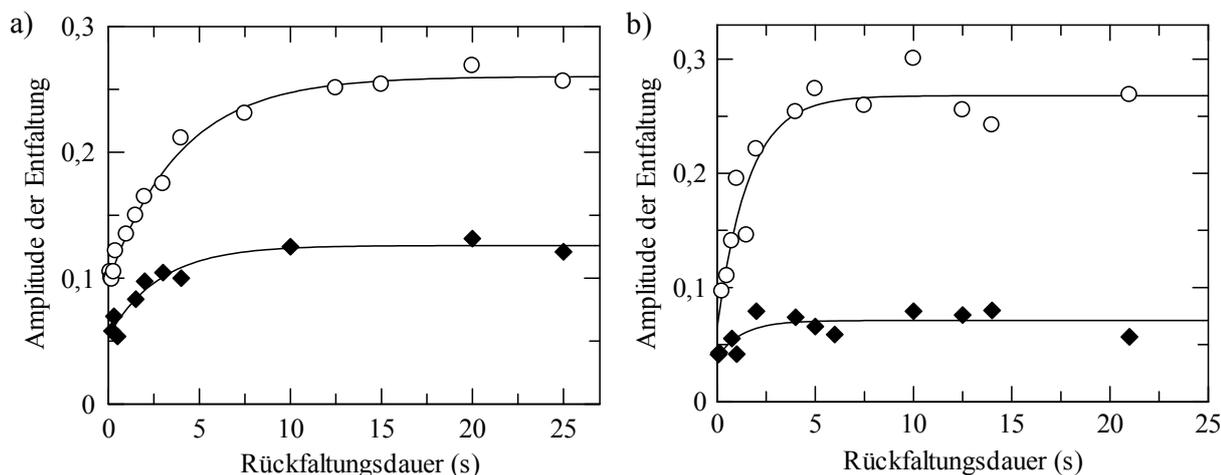


Abbildung 3.1.20: Zeitverlauf der Rückfaltung von N2 im fd G3P\* IIHY bzw. fd G3P\* IIHY P161A. Aufgetragen sind die Amplituden der schnellen (◆) und langsamen (○) Entfaltungsphase von a) fd G3P\* IIHY und b) fd G3P\* IIHY P161A in 2,45 M GdmCl nach *stopped-flow*-Mischung in Abhängigkeit der Rückfaltungsdauer in 0,5 M GdmCl. Die Reaktionen wurden anhand der Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm mit 1  $\mu\text{M}$  Protein in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 bei 25 °C verfolgt. In 5,5 M GdmCl denaturiertes G3P\* wurde dazu durch elffache Verdünnung in 0,5 M GdmCl über verschiedene Zeiten rückgefaltet und danach in 2,45 M GdmCl erneut entfaltet. Die durchgezogenen Linien stellen den Angleich biexponentieller Funktionen an die Daten dar. Für die Verläufe der Amplituden ergeben sich Zeitkonstanten von  $\tau_1(\text{IIHY}) = 2,8 \text{ s}$  und  $\tau_2(\text{IIHY}) = 3,9 \text{ s}$  bzw.  $\tau_1(\text{P161A}) = 1,3 \text{ s}$ ,  $\tau_2(\text{P161A}) = 1,6 \text{ s}$ .

Die schnellere Phase hat zwar nur eine sehr geringe Amplitude (◆, Abbildung 3.1.20), sie zeigt jedoch an, dass, analog zum WT fd G3P\*, auch in beiden stabilisierten Varianten im geringen Maße ein nicht assoziierter Zustand populierte wird. Zumindest für fd G3P\* IIHY ergaben sich nach kurzer Rückfaltung in 0,5 M GdmCl und erneutem Sprung in Entfaltungsbedingungen die Raten des entsprechenden Entfaltungsastes (◆, Abbildung 3.1.18). Im fd G3P\* IIHY P161A konnte dagegen dieser Verlauf aufgrund der geringen Signaländerung nicht aufgelöst werden.

Der Verlauf der in Abbildung 3.1.20 gezeigten Amplituden macht deutlich, dass sowohl die nicht assoziierte als auch die lose-assozierte Form mit etwa der gleichen Zeitkonstante gebildet wird. Die Zeitkonstanten liegen mit  $\tau_1(\text{IIHY}) = 2,8 \text{ s}$  und  $\tau_2(\text{IIHY}) = 3,9 \text{ s}$  bzw.  $\tau_1(\text{P161A}) = 1,3 \text{ s}$ ,  $\tau_2(\text{P161A}) = 1,6 \text{ s}$  jeweils im Bereich der entsprechenden schnellen Rückfaltungsreaktionen der N2-Domänen von fd G3P\* IIHY und fd G3P\* IIHY P161A. Wie bereits in den Rückfaltungsexperimenten ausgehend von nativem Protein beobachtet, ist auch hier die Faltung von N2 in fd G3P\* IIHY P161A leicht beschleunigt. Die Ursache der im Vergleich zum fd G3P\* IIHY verringerten Signaländerung der schnell entfaltenden Form im Zweischritt-Entfaltungstest (Abbildung 3.1.20) liegt vermutlich am Fehlen der stabileren *cis*-Spezies, die im Gegensatz zur *trans*-Form in 0,5 M GdmCl vollständig in den nativen Zustand übergeht. Die Raten und Amplituden der schnellen Entfaltungsphase von fd G3P\* IIHY P161A sind daher sehr stark fehlerbehaftet und können lediglich als Anhaltspunkte betrachtet werden.

Das Auftreten der nicht assoziierten Spezies deckt sich mit der Beobachtung, dass ein kleiner Teil der Moleküle des fd G3P\* IIHY P161A in 0,5 M GdmCl erst durch die nachgelagerte Isomerisierung von Prolinresten in der Gelenkregion in den stabileren lose-assozierten Zustand übergehen und damit TolAC-AEDANS verdrängen kann. Die Stabilität der isolierten N2 Q129H zeigt dabei an, dass die Domäne unter diesen Bedingungen auch ohne zusätzliche günstige Wechselwirkungen mit N1 zumindest teilweise falten kann. Ob die lose-assozierte Form in Verlauf des weiteren Faltungsvorganges vollständig eingenommen wird, konnte anhand des Doppelmischexperimentes nicht aufgelöst werden. Sowohl die auch bei geringen Denaturierungsmittelkonzentrationen detektierbare Pro213-limitierte Faltungsreaktion der P161A-substituierten Variante als auch der Verlauf der langsamen Rückfaltung von fd G3P\* IIHY lassen jedoch schlussfolgern, dass zumindest ein geringer Anteil der Population nicht als stabilisiertes Intermediat vorliegt.

### 3.2 Aktivierung des fd Phagen G3P\* durch Prolin-gekoppelte Entfaltung

Die Rückfaltungsexperimente der verschiedenen G3P\*-Varianten in Gegenwart von TolAC-AEDANS haben deutlich gemacht, dass die Wechselwirkung der N1-Domäne mit dem sekundären Rezeptor TolAC sehr stark vom Faltungszustand und damit von der Stabilität der N2-Domäne abhängt. Tatsächlich konnte bereits Barbara Eckert unter anderem anhand der Infektion von sowohl pilushaltigen als auch pilusfreien *E. coli* Zellen durch Phagen mit unterschiedlich stabilen G3P\*-Varianten zeigen, dass die Faltung und Stabilität des Proteins auf die Funktion *in vivo* abgestimmt ist.<sup>79; 96; 97</sup> Sie schlussfolgerte, dass stabilisierte Phagen gegenüber dem Wildtyp-Phagen im Nachteil sind, da in ihrem G3P\* die Aktivierung durch Domänendissoziation und Entfaltung der Gelenkregion aufgrund der stabilisierenden Substitutionen erschwert ist. Die Ergebnisse des vorangegangenen Kapitels bekräftigen diese Vermutungen. Entgegen früherer Annahmen liegt das langlebige Intermediat von WT fd G3P\* mit *trans*-Pro213 nämlich offen, und nicht wie die stabilisierte Variante bereits in lose-assoziiierter Form vor, wodurch die Interaktionsfläche für TolAC auf der N1-Domäne des Wildtyp-Protein in diesem Zustand besser zugänglich ist.

Im Vergleich zur offenen Form ist die Interaktionsfähigkeit der gedockten Form des G3P\* gegenüber TolAC deutlich herabgesetzt. Im Folgenden sollte zunächst durch Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) quantifiziert werden, wie sich die verschiedenen Faltungszustände des G3P\* in ihrer Affinität für die C-terminale Domäne von TolA unterscheiden und welchen Einfluss dabei die vier stabilisierenden Substitutionen des fd G3P\* IIHY in der Gelenkregion bzw. in den beiden Domänen auf die Wechselwirkung zwischen dem G3P\* und TolAC haben.

#### 3.2.1 Die Population des aktiven Intermediates erhöht die Affinität der N1-Domäne des G3P\* für TolAC

Zur Ermittlung der  $K_D$ -Werte der Komplexe aus TolAC und WT fd G3P\*, fd G3P\* IIHY, ihren Faltungsintermediaten sowie der jeweiligen isolierten N1-Domäne wurde das in Kapitel 3.1.7 beschriebene Energietransfersystem verwendet. Nach Anregung der Tyrosin- bzw. Tryptophanreste des G3P\* bei 280 nm diente die Änderung der Fluoreszenz der AEDANS-Gruppe als Sonde der Interaktion. Entsprechende Gleichgewichtstitrationen, bei denen die Konzentration des Donors variiert worden war, hatten bereits verdeutlicht, dass die isolierte N1-Domäne mit der stabilisierenden Substitution T13I eine sehr hohe Affinität zu TolAC-AEDANS hat ( $K_D = 0,49 \mu\text{M}$ ). Der zunächst für das native WT fd G3P\* erhaltene Wert war mit  $3,9 \mu\text{M}$  achtfach schlechter.<sup>79</sup> Anhand einer Verdrängungstitration mit unmarkiertem TolAC zur Freisetzung von TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit N1 konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Modifikation mit dem Fluorophor AEDANS die Affinität von TolAC gegenüber der N1-Domäne nur geringfügig beeinflusst.<sup>79</sup>

In weiterführenden Experimenten stellte sich heraus, dass geringe Verunreinigungen mit freiem AEDANS das Fluoreszenzsignal stark beeinflussen (Daten nicht aufgeführt). Die

Komplexbildung zwischen  $0,2 \mu\text{M}$  TolAC-AEDANS und zunehmenden Donorkonzentrationen in Bereich von 0 bis  $15 \mu\text{M}$  wurde deshalb nach *stopped-flow*-Mischung in ihrem Zeitverlauf analysiert. Wie bereits für die isolierte Domäne N1 T13I und die Deletionsvariante G3P\* IIHY  $\Delta\beta 6$  gezeigt, ergeben sich dabei nach geeigneter Mischung der Bindungspartner für die Fluoreszenz oberhalb von  $460 \text{ nm}$  nach Anregung bei  $280 \text{ nm}$  Reaktionsverläufe pseudo-erster Ordnung.<sup>79; 80</sup>

Da die Bindung des TolAC-Proteins an die N1-Domäne von deren Zugänglichkeit und damit der spontanen Dissoziation der Domänen des G3P\* abhängt, können bereits mit geringen Konzentrationen an isolierter und damit frei zugänglicher N1- bzw. N1 T13I-Domäne Assoziationskinetiken detektiert werden (Abbildung 3.2.1). Natives WT fd G3P\* liegt dagegen fast ausschließlich im gedockten Zustand vor, weshalb deutlich höhere Proteinkonzentrationen benötigt werden, um die Bindung an TolAC-AEDANS verfolgen zu können (Abbildung 3.2.1b). In fd G3P\* IIHY ist der  $T_M$ -Wert der N2-Domäne, der gleichzeitig auch die Domänen dissoziation und die Entfaltung der Gelenkregion reflektiert, deutlich von  $48,0$  auf  $61,2 \text{ }^\circ\text{C}$  erhöht.<sup>121</sup> Die Stabilisierung des assoziierten Zustandes führt dazu, dass selbst in Gegenwart von  $15 \mu\text{M}$  fd G3P\* IIHY keine Bindungskinetik beobachtbar ist (Abbildung 3.2.1b).

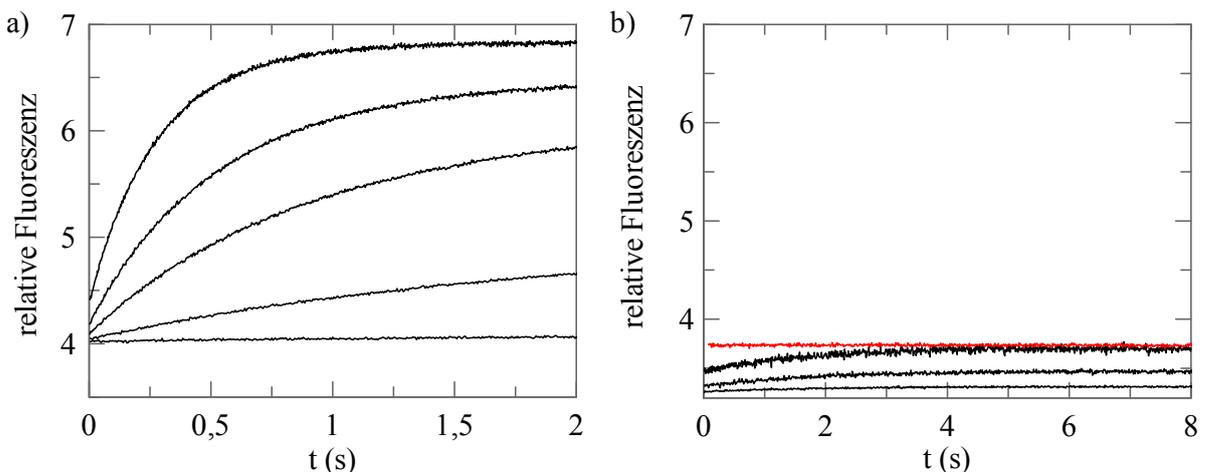


Abbildung 3.2.1: Interaktion von TolAC-AEDANS mit der N1-Domäne verschiedenen G3P\*-Varianten. Assoziationsreaktionen von  $0,2 \mu\text{M}$  TolAC-AEDANS mit a) ansteigenden Konzentrationen (0; 0,2; 0,8; 1,5 bzw.  $3 \mu\text{M}$ ) an isolierter N1 T13I und b) 2,5; 7,5  $\mu\text{M}$  bzw.  $15 \mu\text{M}$  WT fd G3P\* (schwarz) sowie  $15 \mu\text{M}$  fd G3P\* IIHY (rot). Die Bindung wurde jeweils nach Förster-Resonanz-Energie-Transfer von den in N1 enthaltenen Trp-Resten auf TolAC-AEDANS anhand der AEDANS-Fluoreszenz oberhalb von  $460 \text{ nm}$  nach Anregung bei  $280 \text{ nm}$  verfolgt. Die Messungen erfolgten bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  nach schneller Mischung an einer *stopped-flow*-Apparatur in  $0,1 \text{ M}$  KP-Puffer,  $\text{pH } 7,0$ ,  $0,1 \text{ M}$  GdmCl.

Durch Angleich monoexponentieller Funktionen an die Kinetiken lassen sich die jeweilige Amplitude und Rate in Abhängigkeit der Donorkonzentration bestimmen (Abbildung 3.2.2). Über den Verlauf der unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung erhaltenen apparenten Raten kann nach linearer Regression die Dissoziationskonstante ermittelt werden. Der Achsenabschnitt der aus dem Verlauf der Raten resultierenden Gerade entspricht der mikroskopischen Rate der Dissoziation ( $k_{\text{off}}$ ), die Steigung der Assoziationsrate ( $k_{\text{on}}$ ). Der Quotient von  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  ergibt  $K_D$  (Gleichung 34). Dieser kann zudem unabhängig davon aus

der Auswertung des Verlaufes der Amplituden unter Verwendung von Gleichung 43 ermittelt werden (Abbildung 3.2.2, Tabelle 3.2.1).

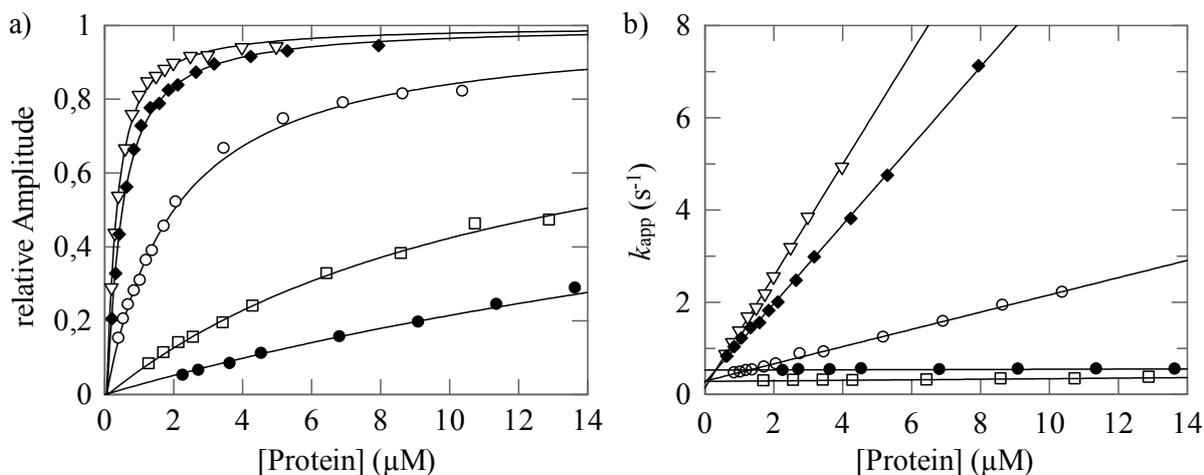


Abbildung 3.2.2: Bindung der G3P\*-Varianten an den sekundären Rezeptor TolAC-AEDANS. Auftragung der normierten Fluoreszenzamplituden (a) bzw. apparenten Assoziationsraten (b) in Abhängigkeit der Konzentration an isolierter N1 (◆), N1 T13I (▽), WT fd G3P\* (●) sowie den langlebigen Intermediaten von WT fd G3P\* (○) bzw. fd G3P\* IIHY (□). Sowohl die Raten als auch die Amplituden wurden aus dem Angleich monoexponentieller Gleichungen an die Assoziationskinetiken erhalten. Die in a) gezeigten Linien stellen einen Angleich an die Amplituden gemäß Gleichung 43 dar. Die mikroskopischen Raten der Dissoziation ( $k_{off}$ ) und Assoziation ( $k_{on}$ ) ergaben sich nach linearer Regression der in b) aufgetragenen Daten aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse bzw. der Geradensteigung. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde jeweils aus dem Quotienten von  $k_{off}$  und  $k_{on}$  berechnet. Die entsprechenden Assoziationskinetiken wurden nach Anregung bei 280 nm anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz oberhalb von 460 nm in *stopped-flow*-Mischexperimenten verfolgt. Zur Population der aktiven Intermediate wurde entfaltetes Protein für 450 s in 0,2 M GdmCl rückgefaltet und anschließend auf Eis aufbewahrt, um die abschließende Einnahme des gedockten Zustandes zu verlangsamen. Alle Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0, 0,1 M GdmCl durchgeführt. Die erhaltenen  $K_D$ -Werte und mikroskopischen Raten sind in Tabelle 3.2.1 aufgelistet.

Tabelle 3.2.1: Interaktion von TolAC-AEDANS mit isolierter N1-Domäne bzw. verschiedenen G3P\*-Varianten.

Variante	$k_{on}$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{off}/k_{on}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
Isolierte N1	$0,86 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,03$	0,30	$0,31 \pm 0,02$
Isolierte N1 T13I	$1,21 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,03$	0,13	$0,19 \pm 0,01$
WT fd G3P* nativ	$0,003 \pm 0,001$	$0,51 \pm 0,01$	171	$22,1 \pm 6,6$
WT fd G3P* - Intermediat	$0,19 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$	1,54	$1,85 \pm 0,12$
fd G3P* IIHY - Intermediat	$0,006 \pm 0,001$	$0,28 \pm 0,01$	48	$13,6 \pm 1,8$
fd G3P* IIHY nativ	keine Assoziationskinetiken detektierbar			

Angegeben ist der aus der Analyse der Amplituden erhaltene  $K_D$ -Wert sowie die mikroskopischen Raten  $k_{off}$  und  $k_{on}$  aus der Auswertung der apparenten Assoziationsraten. Deren Quotient ergibt ebenfalls die Dissoziationskonstante des Komplexes aus dem jeweiligen G3P\* und 0,2 µM TolAC-AEDANS. Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3.2.2 beschriebenen Bedingungen.

Die Affinität der isolierten N1 bzw. N1 T13I für TolAC-AEDANS liegen mit 0,3 bzw. 0,19 µM im Bereich des über die Gleichgewichtstitration von N1 T13I erhaltenen Wertes von 0,49 µM.<sup>79</sup> Im Vergleich dazu bindet natives WT fd G3P\* deutlich schlechter, wodurch im untersuchten Konzentrationsbereich keine Sättigung der Komplexbildung erreicht wird. Der für das Wildtyp-Protein über die Amplituden erhaltenen  $K_D$ -Wert weicht folglich stark von dem anhand der Raten ermittelten Wert ab. Die Tendenzen sind jedoch eindeutig. Wie bereits

anhand des Verlaufes der Assoziationskinetiken vermutet, ist die Dissoziationskonstante des WT fd G3P\* relativ zu denen der isolierten Domänen deutlich um mehr als das Hundertfache erhöht. Die stark verringerte Assoziationsrate zeigt dabei an, dass die Bindungsfähigkeit vor allem durch die schlechte Zugänglichkeit der N1-Domäne im gedockten Zustand herabgesetzt wird. Im Vergleich zu fd G3P\* IIHY befindet sich jedoch unter den Messbedingungen (0,1 M KP-Puffer, pH 7,0, 0,1 M GdmCl, 25 °C) zumindest ein kleiner Teil der Moleküle des Wildtyp-Proteins in einer Form, in der die Domänen nicht assoziiert sind und daher die Interaktionsfläche auf N1 für TolAC-AEDANS exponiert ist.

Die gezeigten Daten wurden in Gegenwart von 0,1 M GdmCl gemessen, da sie dadurch mit den Affinitäten der langlebigen Intermediate von WT fd G3P\* und fd G3P\* IIHY verglichen werden können. Die aktiven Zustände dieser Proteine wurden durch Rückfaltung von vollständig entfaltetem Protein für 450 s in 0,2 M GdmCl bei Raumtemperatur populiert und die Rückfaltungsansätze anschließend auf Eis aufbewahrt, um die durch die Isomerisierung von Pro213 limitierte Einnahme des gedockten Zustandes zu verlangsamen. Die Kinetik der Assoziation von TolAC-AEDANS mit den Varianten im geöffneten Zustand wurde analog zu den nativen Proteinen nach schneller Mischung erhalten. Die resultierenden Amplituden- und Ratenverläufe sind ebenfalls in Abbildung 3.2.2 aufgetragen.

Beide Intermediate weisen sehr viel höhere Affinitäten gegenüber TolAC auf als ihre entsprechenden nativen Formen (Tabelle 3.2.1). Die Dissoziationskonstante der nicht assoziierten Form des Wildtyp-Proteins ist hundertmal kleiner als die der nativen Form. Mit 1,54  $\mu\text{M}$  ist der  $K_D$ -Wert von geöffnetem WT fd G3P\* jedoch noch um Faktor sechs gegenüber der isolierten N1-Domäne verschlechtert. Dies deckt sich mit dem Befund der Rückfaltungsexperimente in Gegenwart von TolAC (Kapitel 3.1.7). Danach wirkt sich bereits das Vorhandensein der strukturierten N2-Domäne ungünstig auf die Wechselwirkung zwischen N1 und TolAC aus. Zudem liegt, wie bereits erwähnt, im entfaltetem Zustand ein geringer Teil des Pro213 in *cis*-Konformation vor. Während der Faltung gehen diese Moleküle direkt in den assoziierten Zustand über wodurch die Interaktionsfläche verborgen wird.

Die Affinität des Intermediates von fd G3P\* IIHY ist relativ zum Intermediat des WT fd G3P\* noch einmal um mehr als das Zehnfache verringert. Wie in Kapitel 3.1.8 gezeigt, nehmen die Domänen aufgrund der zusätzlichen stabilisierenden Substitutionen in der Gelenkregion schon während der Faltung von N2 einen sehr stabilen lose-assozierten Zustand ein, in dem die Wechselwirkungen zwischen N1 und N2 schon sehr stark sind. Die Wechselwirkung von N1 mit TolAC-AEDANS wird dadurch zusätzlich erschwert, was sich in der sehr niedrigen Assoziationsrate widerspiegelt (Tabelle 3.2.1). Die Geschwindigkeit der Dissoziation wird dagegen anscheinend nicht durch die Anwesenheit der N2-Domäne beeinflusst.

### 3.2.2 Im aktiven Intermediat des WT fd G3P\* liegen die beiden Domänen N1 und N2 unabhängig voneinander vor

Die langsame Isomerisierung der Gln212-Pro213-Bindung in der Gelenkregion führt dazu, dass die ungedockte Spezies mit *trans*-Pro213 sehr langlebig ist. In der Vergangenheit wurde diese Eigenschaft genutzt, um die Stabilität und Struktur des Intermediatzustandes von fd G3P\* IIHY auf der Ebene einzelner Reste zu untersuchen. Ulrich Weininger in der Gruppe von Prof. Dr. Jochen Balbach konnte dabei anhand von 2D Echtzeit-NMR- bzw. Amidprotonenaustauschexperimenten nachweisen, dass ein kleiner Teil der Gelenkregion bereits in der lose-assoziierten Form strukturiert vorliegt.<sup>62</sup> Die vollständige Faltung dieses Bereiches und die stark stabilisierenden Interaktionen zwischen den Domänen werden jedoch erst durch die Konformationsänderung des Pro213 ermöglicht. Im nativen Zustand sind die Rückgratamidprotonen der Reste der kooperativen Einheit bestehend aus N1, N2 und der Gelenkregion sehr gut geschützt. Die Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen Resten der N1-Domäne und den  $\beta$ -Faltblättern der Gelenkregion nach der *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro213 bildet dabei wahrscheinlich die strukturelle und vor allem energetische Grundlage für das Erreichen des geschlossenen Zustandes.<sup>62</sup>

Im ungedockten fd G3P\* IIHY wird N2 durch die lose Assoziation mit N1 deutlich stabilisiert (Kapitel 3.1.8). Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der NMR-Experimente wider. Die chemischen Verschiebungen der Reste des globulären Teils der N2-Domäne im Intermediat entsprechen fast vollständig denen der nativen Form. Die hohe Stabilität von N2 wurde dabei auf einen entropischen Effekt zurückgeführt, denn bereits im Intermediat von fd G3P\* IIHY werden die Enden ihres globulären Teils durch das antiparallele Faltblatt der flankierenden Gelenkregion zusammengehalten.<sup>62</sup>

Zwar zeigt die N2-Domäne in nicht assoziiertem WT fd G3P\* gegenüber der isolierten Form ebenfalls eine leicht erhöhte Stabilität, der Effekt ist jedoch aufgrund des Fehlens der Substitutionen T101I und D209Y nicht stark ausgeprägt (Kapitel 3.1.1). Im Folgenden wurde daher von Ulrich Weininger untersucht, wie sich das Faltungsintermediat und der native Zustand des Wildtyp-Proteins in den chemischen Verschiebungen unterscheiden.

Analog zur stabilisierten Variante fd G3P\* IIHY wurde <sup>15</sup>N-markiertes WT fd G3P\* hergestellt und entfaltet. Durch vierfache Verdünnung in 1 M GdmCl für 30 min wurde die Rückfaltung initiiert und anschließend über einen Zeitraum von je acht Stunden nacheinander zwei <sup>15</sup>N-TROSY-HSQC-Spektren aufgenommen. Um die Differenzen in den Signalen zu erhalten, wurde das erste (kinetische) Spektrum vom zweiten der vollständig gefalteten Form abgezogen. Die Signale für Reste mit in beiden Zuständen nativen Konformationen ihrer Amidprotonen heben sich dabei auf. Befindet sich das Signal eines Restes im Intermediatzustand nicht an der Position, die es in der nativen Form einnimmt, dann ergibt sich nach Subtraktion an der Position der nativen chemischen Verschiebung ein positives aber reduziertes Signal. Entsprechend dieser Analyse sind in Abbildung 3.2.3a Reste mit identischen <sup>1</sup>H bzw. <sup>15</sup>N chemischen Verschiebungen in beiden Konformationen blau

gekennzeichnet. Die AS, deren Signale sich durch die abschließende Assoziationsreaktion noch verändern, sind in rot dargestellt.

Während der 30-minütigen Totzeit des Experimentes ist die konformationelle Faltung der N2-Domäne, welche in 1 M GdmCl vor allem von der Isomerisierung des Pro161 in die stabilere *cis*-Konformation abhängt, abgeschlossen (Kapitel 3.1.3, Abbildung 3.1.4). Wie bereits für die stabilisierte Variante beobachtet, besitzen daher die Reste im globulären Teil von N2 des WT fd G3P\* bereits im Faltungsintermediat, das der aktiven Form entspricht, ihre native Konformation (Abbildung 3.2.3a). Der oberhalb der Gelenkregion lokalisierte Teil von N1 sowie die verknüpfenden Sequenzen weisen dagegen relativ zum vollständig gefalteten Zustand deutliche Unterschiede in ihren chemischen Verschiebungen auf. Das bedeutet zum einen, dass die Wechselwirkungen zwischen den Domänen im gedockten G3P\* hauptsächlich über die Reste dieser Region vermittelt werden. Analog zu fd G3P\* IIHY ist zum anderen die Gelenkregion mit *trans*-Pro213 aufgrund fehlender Wechselwirkungen mit N1 zum großen Teil unstrukturiert.

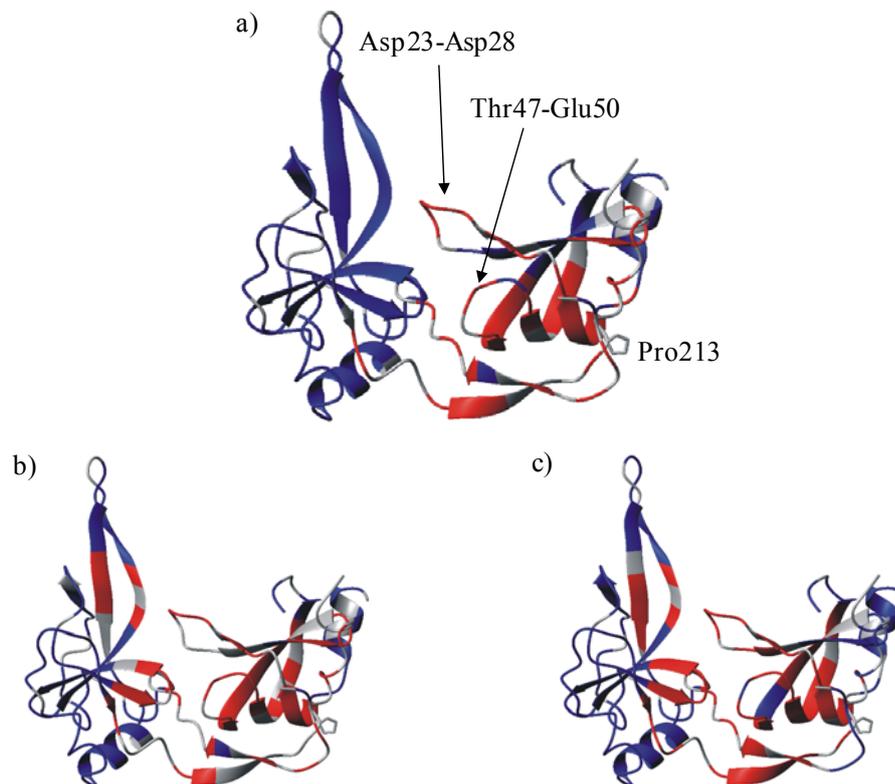


Abbildung 3.2.3: Analyse der chemischen Verschiebungen der Reste im aktiven Intermediat des WT fd G3P\*. In der Struktur des N1N2-Fragmentes von WT fd G3P\* (PDB-Struktur: 2G3P<sup>60</sup>; Programm zur Darstellung: Pymol<sup>123</sup>) sind in blau jeweils die AS markiert, deren chemische Verschiebung der Amidprotonen im Intermediatzustand mit der im nativen G3P\* übereinstimmt. Rot gekennzeichnete Reste besitzen im Intermediat noch nicht ihre nativ-ähnliche Konformation. Über in grau gezeigte AS liegen keine Informationen vor. Zur Bestimmung der chemischen Verschiebungen wurden <sup>15</sup>N-TROSY-HSQC-Spektren von WT fd G3P\* nach 30-minütiger Rückfaltung a) ohne TolAC und b) in Gegenwart eines vierfachen Überschusses an unmarkiertem TolAC aufgenommen und mit dem Spektrum des nativen WT fd G3P\* verglichen. Zur Population der aktiven Form wurde vollständig gefaltetes WT fd G3P\* mit TolAC bis zu einem Verhältnis von 1:12 titriert (c). Die Messungen erfolgten in 50 mM NaP, pH 7,0, 1 M GdmCl bzw. im Fall von c) ohne GdmCl bei 25 °C. Sowohl die Untersuchungen als auch die Auswertung der Daten wurden von Dr. Ulrich Weininger durchgeführt.

Die Bindungsexperimente (Tabelle 3.2.1) haben gezeigt, dass die geöffnete Form des WT fd G3P\* eine deutlich höhere Affinität zu TolAC-AEDANS hat als das native Protein. Um zu analysieren, wie sich die Interaktion mit TolAC auf die chemischen Verschiebungen auswirkt, wurde das NMR-Experiment in Gegenwart eines vierfachen Überschusses an unmarkiertem TolAC wiederholt, um so die Einnahme des gedockten Zustandes zu verhindern. In einem weiteren Ansatz wurde natives WT fd G3P\* mit TolAC titriert, um das Protein durch Bindung an den sekundären Rezeptor in seine aktive Form zu überführen. Als Referenz diente im ersten Fall ein unter identischen Bedingungen aufgenommenes Spektrum des vollständig gefalteten Proteins, im zweiten das Spektrum des nativen G3P\* in Abwesenheit von TolAC. Die daraus erhaltenen Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der einzelnen Reste sind in den Abbildungen 3.2.3b und c gezeigt.

Wie schon im einfachen Rückfaltungsexperiment beobachtet, besitzen ein Großteil der AS von N1 und der Gelenkregion in der aktiven Form keine nativ-ähnliche Struktur. Durch den Überschuss an TolAC kann demnach der geöffnete Zustand populierte werden, was bestätigt, dass ein großer Teil der Interaktionsfläche von N1 und N2 mit der von N1 und TolAC übereinstimmt.

Große Unterschiede ergeben sich dagegen für die N2-Domäne. Während sich in Abwesenheit von TolAC die chemischen Verschiebungen der labileren Domäne im langlebigen Faltungsintermediat nicht von denen der nativen Form unterscheiden, führt die Gegenwart von TolAC zu einer strukturellen Veränderung von Resten in N2, die direkt gegenüber der N1-Domäne lokalisiert sind. Die genaue Ursache dafür ist nicht bekannt. Sowohl Reste des entsprechenden AS-Bereiches Thr47-Glu50 als auch die Schleifensequenz Asp23-Asp28 von N1 interagieren mit TolAC.<sup>83</sup> Die Vermutung liegt nahe, dass durch die Wechselwirkung dieser AS mit dem TolAC stabilisierende Interaktionen zu N2 nicht mehr ausgebildet werden können, die für die optimale Orientierung der Domänen zueinander sorgen.

Wie sich durch die Population der aktiven Form des G3P\* die lokalen Stabilitäten verändern, wurde ebenfalls von Ulrich Weininger analog zu fd G3P\* IIHY mittels Gleichgewichts- bzw. zeitaufgelöster Amidprotonenaustauschexperimente analysiert. Nach Verdünnung von protoniertem, gefaltetem G3P\* in D<sub>2</sub>O wurden über einen Zeitraum von 120 Stunden 60 2D <sup>15</sup>N TROSY-HSQC-Spektren in Ab- bzw. Anwesenheit eines vierfachen Überschusses an TolAC bei pH 7,0 aufgenommen, und darüber die H/D-Austauschraten der einzelnen Amidprotonen ermittelt.

Je weniger die Amidprotonen der Reste dem Lösungsmittel zugänglich sind, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie im untersuchten Zeitraum gegen Deuteriumionen ausgetauscht werden. Die Austauschraten von im Inneren des Proteins verborgenen Amidprotonen bzw. solchen, die eine Wasserstoffbrücke ausbilden, sind demnach um mehrere Größenordnungen kleiner als die der lösungsmittlexponierten Reste.<sup>163</sup> Unter der Voraussetzung, dass die Austauschrate langsam ist gegenüber der konformationellen Schließrate (EX2-Mechanismus), können lokale bzw. globale Entfaltungsreaktionen aufgelöst

werden. Aus dem Quotienten der intrinsischen Austauschrate, die über Peptidmodelle bestimmt wurde<sup>164</sup>, und der experimentell ermittelten Austauschrate ergibt sich dabei für jede der AS ein Schutzfaktor (Abbildung 3.2.4a).<sup>62</sup>

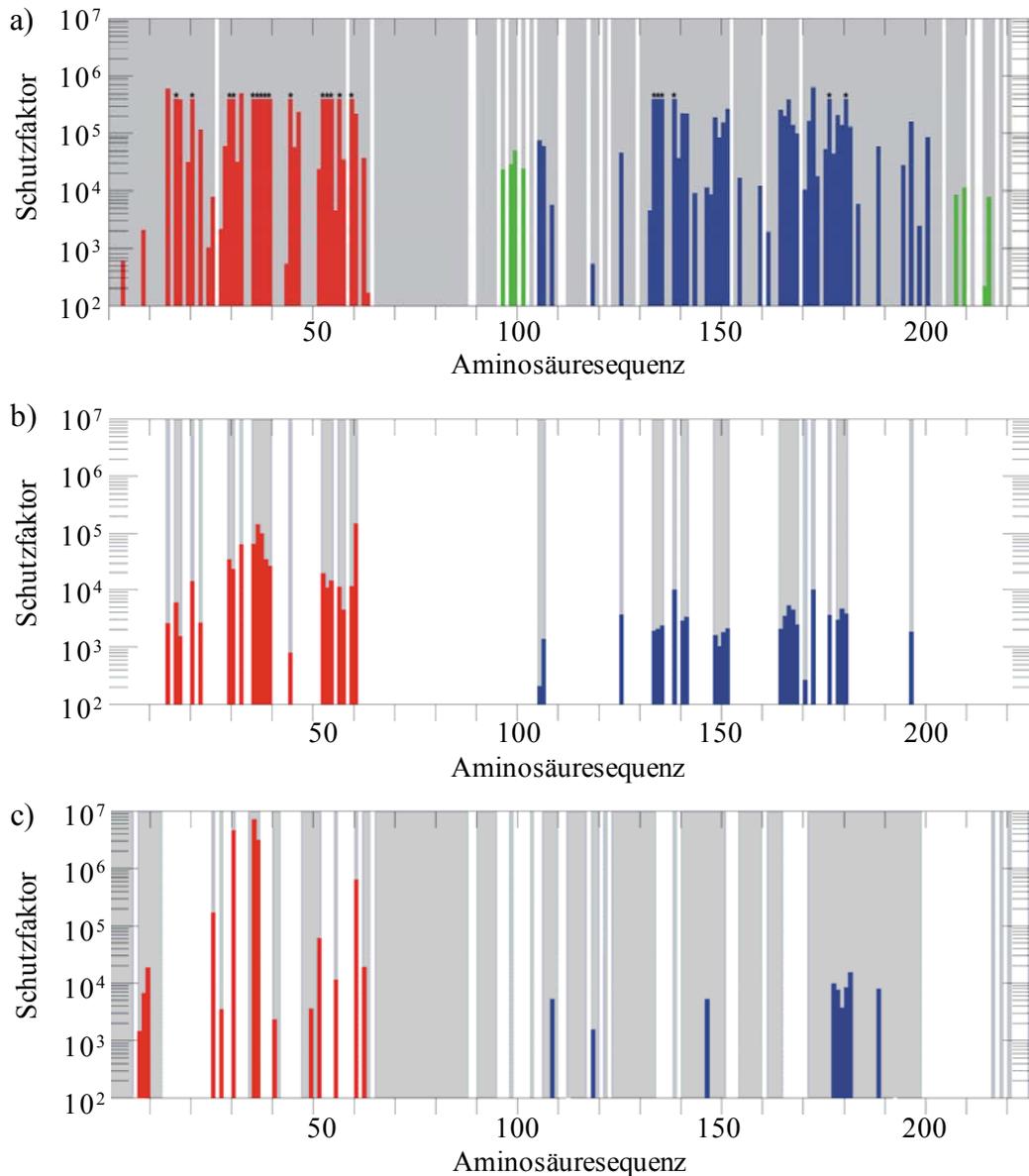


Abbildung 3.2.4. Stabilität der einzelnen Reste in nativem WT fd G3P\* bzw. seinem aktiven Intermediat. Auftragung der Amidprotonenschutzfaktoren in Abhängigkeit der AS-Sequenz von a) nativem WT fd G3P\*, b) seiner nicht assoziierten Form bzw. c) WT fd G3P\* im Komplex mit TolAC. Der Bereich der N1-Domäne ist in rot, der globuläre Teil von N2 in blau und die Gelenkregion grün gekennzeichnet. Grau hinterlegt sind die AS, deren Amidprotonen analysiert werden konnten. Zur Untersuchung des H/D-Austausches im nativen Protein wurden nach dessen Verdünnung in  $D_2O$  über einen Zeitraum von 120 h 60  $^{15}N$ -TROSY-HSQC-Spektren aufgenommen. Für die in c) gezeigten Daten wurde die Messung in Gegenwart eines vierfachen Überschusses an TolAC wiederholt, wobei über 91 h 46  $^{15}N$ -TROSY-HSQC-Spektren aufgezeichnet wurden. Die Schutzfaktoren des aktiven Intermediates (b) wurden über die Konkurrenz zwischen Amidprotonenaustausch und Rückfaltung bestimmt. Denaturiertes WT fd G3P\* wurde dazu in  $D_2O$ -Puffer ohne GdmCl überführt und nach Inkubation für 10 h bei RT ein  $^{15}N$ -TROSY-HSQC-Spektrum über 8 h aufgenommen. Als Referenz wurde ein Spektrum des nativen G3P\* unter den gleichen Bedingungen gemessen. Die Amidprotonen der mit einem Stern markierten Reste zeigten während der Detektionszeit von 120 h keinen signifikanten Austausch. Die Messungen erfolgten in 50 mM NaP, pH 7,0 bei 25 °C. Sowohl die Untersuchungen als auch die Auswertung der Daten wurden von Dr. Ulrich Weininger durchgeführt.

Die Schutzfaktoren der Reste im aktiven Zustand wurden anhand der Konkurrenz zwischen Faltung und H/D-Austausch ermittelt, indem entfaltetes WT fd G3P\* zunächst in 1 M GdmCl und 100 % H<sub>2</sub>O für 5 min rückgefaltet wurde. Nach der Überführung in D<sub>2</sub>O-haltigen Puffer wurde nach 10 Stunden ein <sup>15</sup>N TROSY-HSQC-Spektrum aufgenommen. Als Referenz diente ein unter den gleichen Bedingungen gemessenes Spektrum des nativen G3P\*. Über den Vergleich der Intensitäten der verbleibenden NH-Kreuzsignale wurden, wie in Referenz<sup>62</sup> beschrieben, die Schutzfaktoren berechnet (Abbildung 3.2.4b).

In der vollständig gefalteten und damit gedockten Form bilden die Domänen eine kooperative Einheit, weshalb N1 und N2 vergleichbar hohe Schutzfaktoren aufweisen (Abbildung 3.2.4a). Im Gegensatz zur stabilisierten Variante fd G3P\* IIHY<sup>62</sup> sind jedoch die Werte für die am stärksten geschützten Amidprotonen um eine Größenordnung verringert, was einer Abnahme der freien Enthalpie um 5,7 kJ mol<sup>-1</sup> entspricht. Zudem wird im WT fd G3P\* die Gelenkregion durch die *cis*-Pro213 bedingte Interaktion der N-terminalen Domänen nicht so deutlich stabilisiert wie in fd G3P\* IIHY.

Der Stabilitätsunterschied der Reste im aktiven Intermediatzustand fällt noch deutlicher aus. Während in der stabilisierten Variante durch die lose Assoziation von N1 und N2 ein großer Teil der AS beider Domänen noch immer ähnlich gut geschützt ist, sind im Ausgangsprotein vor allem die Schutzfaktoren der Amidprotonen von N2 deutlich reduziert (Abbildung 3.2.4b). Die Werte für den globulären Teil sind dabei um Faktor zehn verringert, über die Schutzfaktoren der Reste der Gelenkregion liegen aufgrund der stark verringerten Stabilität keine Informationen vor.<sup>62</sup>

Ein ähnliches Ergebnis ergibt sich für WT fd G3P\* in Gegenwart eines vierfachen Überschusses an TolAC (Abbildung 3.2.4c). Die Interaktion von N1 mit TolAC führt zur Dissoziation der Domänen und damit zur Population des geöffneten Zustandes, weshalb die AS der Gelenkregion wiederum vollkommen ungeschützt sind. Die Schutzfaktoren von N2 befinden sich mit Werten unter 100 ebenfalls im Bereich derer der nicht assoziierten Form. Einzig die Reste der N1-Domäne weisen zum Teil erhöhte Werte auf, was vermutlich indirekt bedingt wird durch die Wechselwirkung mit TolAC.

### 3.2.3 Sequenzvariationen um den Prolinschalter führen zur Dissoziation der N-terminalen Domänen

Die Übereinstimmung der Schutzfaktoren des langlebigen Rückfaltungsintermediates von WT fd G3P\* mit denen seiner nativen Form in Gegenwart von TolAC zeigt, dass durch die Bindung von TolAC die stark stabilisierende Domänenassemblierung aufgelöst werden kann. Die unterschiedlichen Affinitäten des WT fd G3P\* und der stabilisierten Variante in diesem Zustand (Tabelle 3.2.1) weisen gleichzeitig darauf hin, dass unter anderem auch die Stabilität der Gelenkregion über die Interaktionsfähigkeit entscheidet. Um zu untersuchen, wie sich die Veränderung der Stabilität und des Faltungsmechanismus auf die Funktionalität des G3P auswirken, wurde die lokale Sequenz um Pro213 variiert (Abbildung 3.2.5). In der Variante fd G3P\* APA wurden dazu von Johanna Koch die zu Pro213 benachbarten Reste Gln212 und

Pro214 gegen Alaninreste ausgetauscht. Die Variante fd G3P\* AGA, die von Roman Jakob hergestellt wurde, enthält zusätzlich dazu die P213G-Substitution.

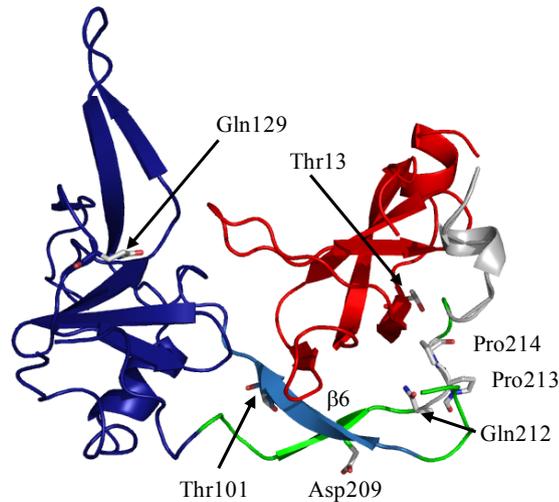


Abbildung 3.2.5: Tertiärstruktur des N1N2-Fragments von WT fd G3P\*.

Die Reste der Schalterregion Gln212, Pro213 und Pro214 sowie die Positionen der stabilisierenden Substitutionen im fd G3P\* IIHY sind als Stäbchen-Modelle gezeigt. Die N1-Domäne ist in rot, der globuläre Teil von N2 in dunkelblau und die Gelenkregion in grün dargestellt. Der in der Variante fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta_6$  deletierte Faltblattstrang der Gelenkregion ist in hellblau gezeigt. Die Abbildung wurde anhand der PDB-Struktur 2G3P<sup>60</sup> mit dem Programm Pymol<sup>123</sup> erstellt.

Der Austausch von Gln212 bzw. Pro214 gegen Alanin führt jeweils zu einer zwei- bzw. dreifachen Beschleunigung der Isomerisierungsreaktion an Pro213. Durch die Q212A-Substitution wird außerdem das im assoziierten Zustand gebildete Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen der Gelenkregion und der N1-Domäne geschwächt, da die Seitengruppe des Gln212 gleich zwei Wasserstoffbrücken zu Gln52 in der N1-Domäne ausbildet, wenn Pro213 in *cis*-Konformation vorliegt.<sup>120</sup>

Die Kombination der beiden Substitutionen hat auf WT fd G3P\* und fd G3P\* IIHY sehr unterschiedliche Auswirkungen. Während in fd G3P\* IIHY APA trotz der starken Destabilisierung von N2 beide Domänen weiterhin in gedockter Konformation vorliegen (Tabelle 3.2.2)<sup>126</sup>, entfaltet die N1-Domäne im fd G3P\* APA unabhängig von N2 (Johanna Koch, persönliche Mitteilung). In letzterem Fall ist nicht nur der Übergangsmittelpunkt der labileren Domäne deutlich von 48,0 °C auf 36,8 °C verringert sondern auch die Enthalpie der Entfaltung. Mit 331 kJ mol<sup>-1</sup> liegt  $\Delta H$  im Bereich der Enthalpie der isolierten N2-Domäne (304 kJ mol<sup>-1</sup>), was bestätigt, dass zwischen den N-terminalen Domänen des nativen fd G3P\* APA kaum noch Interaktionen vorhanden sind. Eine vollständige Entkopplung der Domänen wie bei der Variante fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta_6$ , in der durch die Deletion des in der Gelenkregion gelegenen sechsten  $\beta$ -Faltblattstranges (Abbildung 3.2.5) die Stabilität der N2-Domäne auf das Niveau von isolierter N2 Q129H herabgesetzt ist (Tabelle 3.2.2), liegt jedoch nicht vor.<sup>151</sup> Gegenüber der isolierten N2-Domäne ist der  $T_M$ -Wert der N2-Domäne des fd G3P\* APA jedoch nur um 2 °C erhöht.

Die zusätzliche Substitution des Pro213 durch Glycin in fd G3P\* AGA wirkt sich im Vergleich dazu leicht stabilisierend aus, wobei auch die Enthalpie mit  $470 \text{ kJ mol}^{-1}$  deutlich erhöht ist. Der  $T_M$ -Wert von fd G3P\* AGA ähnelt mit  $37,9 \text{ }^\circ\text{C}$  dem  $T_M$ -Wert der Variante fd G3P\* P213G (Tabelle 3.2.2), die teilweise in geöffneter Form vorkommt. Dies ist deshalb bemerkenswert, da durch die drei Substitutionen die gesamte Schaltersequenz entfernt ist. Die destabilisierenden Effekte der drei Austausche an den Positionen Gln212-Pro214 sind demnach nicht additiv. Die P213G-Substitution alleine führte zu einer deutlichen Verringerung der Stabilität, nicht nur im Wildtyp-Protein sondern auch in der stabilisierten Variante IIHY.<sup>79</sup> Die Auswirkung der Substitution der zu Pro213 benachbarten Reste ist demnach enorm vom Kontext abhängig.

Tabelle 3.2.2: Thermische Stabilitätsdaten von WT fd G3P\* und verschiedenen G3P\*-Varianten

Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
	$T_M$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta H$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta G^{55^\circ\text{C}}$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$T_M$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta H$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta G^{65^\circ\text{C}}$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
isolierte N1	-	-	-	62,3	234	-1,9
isolierte N1 T13I	-	-	-	67,5	235	1,7
isolierte N2	34,6	304	-25,4	-	-	-
isolierte N2 Q129H	38,8	344	-21,2	-	-	-
WT fd G3P*	48,0	612	-14,1	60,2	230	-3,3
fd G3P* APA	36,8	331	-24,6	59,9	227	-3,5
fd G3P* AGA	37,9	470	-30,4	58,6	189	-3,7
fd G3P* P213G	37,8	442	-29,1	60,2	225	-3,3
fd G3P* IIHY	61,2	644	11,4	66,0	228	0,7
fd G3P* IIHY APA	53,5	453	-2,1	67,0	228	1,3
fd G3P* IIHY $\Delta\beta 6$	36,7	285	-21,1	64,1	202	-0,5

Angegeben sind für die G3P\*-Varianten bzw. isolierten Domänen die Schmelztemperaturen  $T_M$ , die Enthalpien der jeweiligen Entfaltungsreaktion am  $T_M$  ( $\Delta H$ ) und die freien Enthalpien der Entfaltung  $\Delta G^{55^\circ\text{C}}$  und  $\Delta G^{65^\circ\text{C}}$  bei  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  bzw.  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Übergänge der N2-Domänen (isoliert oder im G3P\*), welche über die Änderung des CD-Signals bei  $210 \text{ nm}$  verfolgt wurden, wurden gemäß eines Zweizustandsmodells analysiert. Die Daten für die N1-Domänen in den G3P\*-Varianten wurden nach Auswertung des biphasischen Entfaltungsübergangs, der anhand des CD-Signals bei  $230 \text{ nm}$  gemessen wurde, gemäß eines Dreizustandsmodells erhalten. Der erste Übergang spiegelt die Entfaltung der N2-Domäne sowie die Dissoziation der Domänen wider, der zweite Übergang die Denaturierung der N1-Domäne. Der Übergang der isolierten N1-Domänen wurde über die Änderung des CD-Signals bei  $230 \text{ nm}$  gemessen und gemäß eines Zweizustandsmodells ausgewertet. Zur Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde für die G3P\*-Varianten eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von  $10000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  für N2 und für N1  $1000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  angenommen, für die isolierten N2-Domänen wurden  $\Delta C_p$ -Werte von  $8000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  und für die isolierten N1-Domänen  $1000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  verwendet. Die Daten für WT fd G3P\*, isolierte N1 T13I und fd G3P\* IIHY wurden der Referenz<sup>121</sup> entnommen. Die Stabilitätsparameter von fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta 6$  bzw. isolierter N1-Domäne wurden aus den Arbeiten<sup>80</sup> bzw.<sup>152</sup> erhalten. Die Werte für die Domänen des fd G3P\* IIHY APA bzw. N1 der Variante fd G3P\* P213G entstammen den Referenzen<sup>126</sup> und<sup>79</sup>. Die Daten von isolierter N2 Q129H wurden der Referenz<sup>151</sup> entnommen, die Werte für die Varianten fd G3P\* APA und fd G3P\* AGA sind persönliche Mitteilungen von Johanna Koch bzw. Roman Jakob. Die Übergänge von  $4 \mu\text{M}$  Protein ( $1 \mu\text{M}$  bei  $210 \text{ nm}$ ) wurden in  $0,1 \text{ M}$  KP-Puffer,  $\text{pH } 7,0$  mit einer Schichtdicke von  $1 \text{ cm}$ , einer Heizrate von  $60 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$  und einer Dämpfung von  $8 \text{ s}$  gemessen.

Die während der Rückfaltung der Variante fd G3P\* P213G beobachtete Domänenassoziationsreaktion war der Isomerisierung von Prolinresten wie Pro214 in der

Gelenkregion zugeschrieben worden. Ob trotz des Ersatzes dieses Restes eine entsprechende Assoziationsreaktion während der Strukturierung von fd G3P\* AGA detektierbar ist, wurde anhand der Ent- und Rückfaltungskinetiken dieser Variante näher untersucht (Abbildung 3.2.6a). Die schnelle Rückfaltung von N1 und des globulären Teils von N2 sind durch den Austausch der Schaltersequenz nicht beeinflusst ( $\Delta$ ;  $\square$ ;  $\diamond$ , Abbildung 3.2.6a). Wie jedoch schon für die Variante fd G3P\* P213G beobachtet, ist nach manueller Mischung die durch die Isomerisierung von Pro161 limitierte Entfaltung auch ausgehend von nativem Protein detektierbar ( $\blacklozenge$ , Abbildung 3.2.6a). Die dieser Reaktion nachgelagerte Phase mit geringer Amplitude besitzt eine GdmCl-unabhängige Zeitkonstante im Bereich von 1000 s ( $\bullet$ , Abbildung 3.2.6a). Ihre Raten gehen demnach bei höheren Denaturierungsmittelkonzentrationen nicht in den Entfaltungsast der N1-Domäne über ( $\blacktriangle$ , Abbildung 3.2.6a). Die Entfaltung der N2-Domäne im fd G3P\* AGA oberhalb von 1 M GdmCl ist vielmehr bereits nach schneller Mischung auflösbar, wobei der entsprechende Ast geringfügig zu höheren GdmCl-Konzentrationen verschoben ist ( $\blacksquare$ , Abbildung 3.2.6a). Dies deckt sich mit dem Befund, dass die Entfaltungsraten von N1 im fd G3P\* AGA mit denen der isolierten N1-Domäne übereinstimmen und N1 damit von N2 entkoppelt ist ( $\blacktriangle$ , Abbildung 3.2.6a).

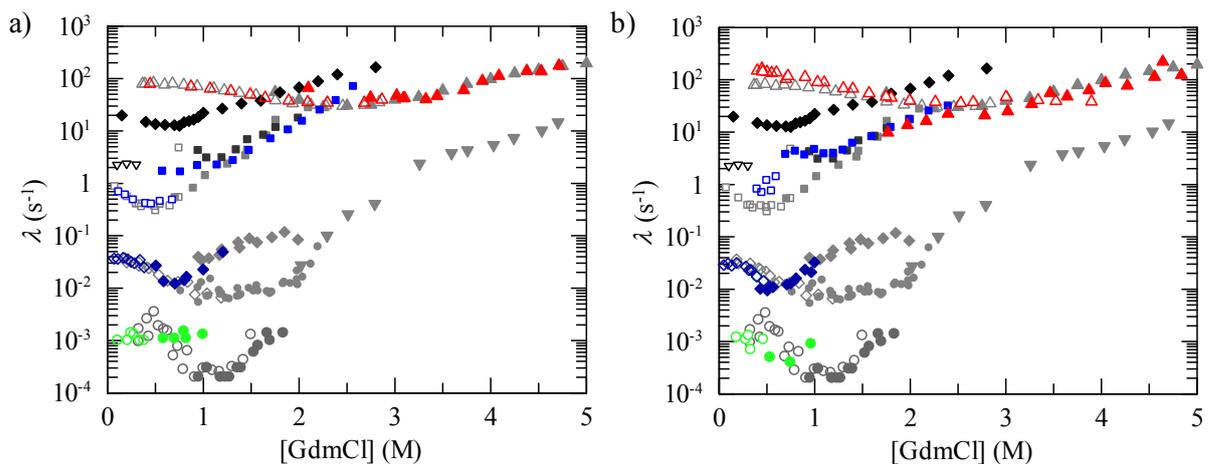


Abbildung 3.2.6: Analyse der Faltungs- und Entfaltungsraten des fd G3P\* AGA und fd G3P\* APA. Auftragung der apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von a) fd G3P\* AGA bzw. b) fd G3P\* APA (jeweils farbige Symbole) sowie jeweils der entsprechenden Raten des WT fd G3P\* (graue Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Entfaltungs- ( $\bullet$ ;  $\blacklozenge$ ;  $\bullet$ ;  $\bullet$ ) und Rückfaltungsraten ( $\diamond$ ;  $\circ$ ;  $\diamond$ ;  $\circ$ ) der N2-Domäne des jeweiligen G3P\* wurden nach manueller Mischung gemessen. Gezeigt sind außerdem die schnelle Rückfaltung der N1-Domänen ( $\Delta$ ;  $\triangle$ ), die konformationelle Faltung der jeweiligen  $U^{trans}$ -Spezies ( $\square$ ;  $\square$ ) ausgehend von entfaltetem Protein sowie die Entfaltung von N1 aus dem nativen Zustand ( $\blacktriangle$ ;  $\blacktriangledown$ ) nach *stopped-flow*-Mischung. Die Entfaltung der  $N_{cis}$ -Spezies aus dem nicht assoziierten Zustand ( $\blacksquare$ ) konnte bereits in Einzelmischexperimenten nach schneller Mischung detektiert werden. Im WT fd G3P\* sind diese Raten dagegen erst nach Rückfaltung für 20 bzw. 150 s in 0,5 M GdmCl und erneuter Überführung in Entfaltungsbedingungen beobachtbar ( $\blacksquare$ ;  $\blacksquare$ ). Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind außerdem die Entfaltungsraten der N1-Domäne ( $\blacktriangle$ ) im ungedockten WT fd G3P\* sowie die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne ( $\blacklozenge$ ;  $\blacktriangledown$ ). Einige der Daten des WT fd G3P\* wurden, wie in Abbildung 3.1.2 beschrieben, der Diplomarbeit von Roman Jakob<sup>150</sup> entnommen. Die Reaktionen der N1-Domäne nach schneller Mischung wurden anhand der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt, die der N2-Domäne oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm. Die Faltungsraten der N2-Domäne nach manueller Mischung wurden über die Messung der Fluoreszenz bei 310 nm erhalten. Die Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 1  $\mu$ M Protein bei 25 °C durchgeführt.

Durch die nach manueller Mischung zusätzlich detektierbare Faltungsreaktion von fd G3P\* AGA wird N2 nur leicht stabilisiert. Im Gegensatz zu fd G3P\* P213G liegt hier jedoch keine Mischung aus offener und stabilisierter, gedockter Spezies vor. Demnach beeinflusst Pro214 in Abwesenheit des ursprünglichen Schalters Pro213 tatsächlich die Faltung hin zum assoziierten Zustand. Durch die zusätzliche Substitution der Reste, die Pro213 flankieren, wird auch Pro214 entfernt. Dadurch erhöht sich die Flexibilität der Gelenkregion, und fd G3P\* AGA kann eine gegenüber der offenen Spezies des WT fd G3P\* stabilisierte Konformation einnehmen.

Die Kombination der Substitutionen Q212A und P214A hat einen noch gravierenderen Effekt auf den Faltungsmechanismus des WT fd G3P\*. Die während der Rückfaltung transient gebildete *trans*-Pro213-Spezies ist deutlich instabiler als die des fd G3P\* AGA bzw. WT fd G3P\* (□, Abbildung 3.2.6b). Das bedeutet, dass während der Faltung günstige Interaktionen zu N1 bzw. Resten der Gelenkregion nicht ausgebildet werden können. Ursache ist vermutlich die Kombination aus beschleunigter Einnahme der *cis*-Konformation des Pro213 und dessen Starrheit, wodurch die für Umstrukturierungen wie im fd G3P\* AGA während der frühen Faltungsphase notwendige Flexibilität nicht gegeben ist.

Wie bei fd G3P\* AGA sind im fd G3P\* APA nach manueller Mischung wieder die Isomerisierungsreaktion von Pro161 und die nachgelagerte Rückfaltungsphase mit einer Zeitkonstante im Bereich von 1000 s detektierbar (◇;○, Abbildung 3.2.6b). Beide führen zu einer Stabilisierung der N2-Domäne, allerdings nicht so stark wie bei der N2-Domäne im fd G3P\* AGA. Die Entfaltungsraten von N2 stimmen vielmehr mit denen des *cis*-Konformers des Wildtyp-Proteins überein (■, Abbildung 3.2.6b). Wie anhand der NMR-Experimente gezeigt, sind die Domänen in diesem Zustand fast vollständig unabhängig voneinander. Die molekulare Ursache für die langsame Rückfaltungsreaktion mit einer Zeitkonstante von 1000 s ist für beide Proteine nicht bekannt (○, Abbildung 3.2.6). Möglicherweise sind Prolinreste in der Gelenkregion dafür verantwortlich.

### 3.2.4 Die Substitution der Schaltersequenz hat gravierende Auswirkungen auf die Interaktion mit TolAC-AEDANS

Die Unterschiede in den Faltungsmechanismen von fd G3P\* APA und fd G3P\* AGA spiegeln sich auch in ihrer Rückfaltung in Gegenwart von TolAC-AEDANS wider (Abbildung 3.2.7). Da die Substitutionen in der Gelenkregion lokalisiert sind, ist ihr Einfluss auf die Stabilität von N1 sehr gering (Tabelle 3.2.2). Die Affinität der Proteine zu TolAC-AEDANS ist demzufolge auch hier abhängig von der Population an nicht assoziierten Molekülen, in denen die Interaktionsfläche auf N1 für TolAC exponiert ist.

In vollständig gefaltetem fd G3P\* APA sind zwischen den Domänen fast keine Interaktionen vorhanden. Während der Strukturierung dieser Variante kommt es daher lediglich zu einer geringfügigen Verdrängung von TolAC-AEDANS innerhalb der ersten 300 s (Abbildung 3.2.7). Weder die Strukturierung von N2 durch die Bildung der stabileren Spezies mit *cis*-Pro161 noch die Konformationsänderung während der nachgelagerten

Faltungsreaktion führen demnach zu einer signifikanten Verdrängung von TolAC und damit der Abnahme des Fluoreszenzsignals der AEDANS-Gruppe.

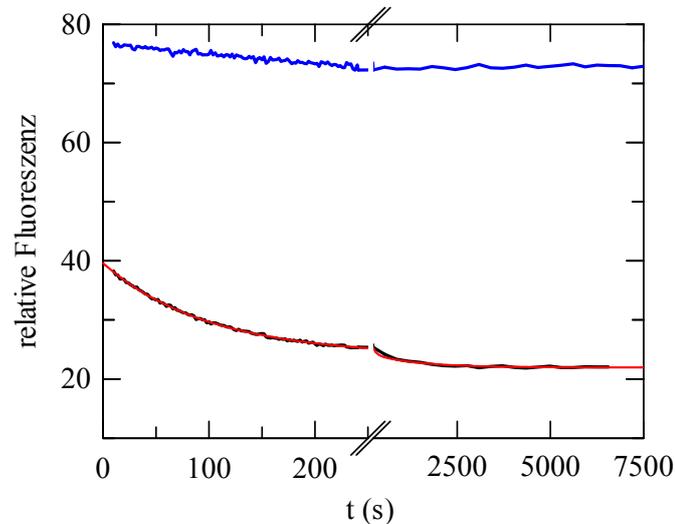


Abbildung 3.2.7: Freisetzung von TolAC-AEDANS bei der Faltung von fd G3P\* AGA bzw. fd G3P\* APA. Gezeigt sind die Kinetiken der Verdrängung von TolAC-AEDANS während der Rückfaltung von fd G3P\* AGA (schwarz) und fd G3P\* APA (blau). Die Reaktionen wurden nach elfacher Verdünnung des jeweiligen denaturierten Proteins (11  $\mu\text{M}$  in 5,5 M GdmCl) in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  TolAC-AEDANS anhand der AEDANS-Fluoreszenz bei 490 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die rote Linie stellt den Angleich biexponentieller Funktionen an die Daten des fd G3P\* AGA mit Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 96$  s und  $\tau_2 = 1250$  s dar. Die Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, 0,5 M GdmCl, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

Die Freisetzung von TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit N1 der Variante fd G3P\* AGA erfolgt dagegen in zwei Phasen, wobei die erste Reaktion die Hauptamplitude besitzt (Abbildung 3.2.7). Die Zeitkonstante dieser schnellen Phase entspricht mit 96 s der Isomerisierungsreaktion von Pro161. Die nachgelagerte Signaländerung ist zwar deutlich geringer, sie bestätigt jedoch, dass die Moleküle des fd G3P\* AGA in einen stärker assoziierten Zustand übergehen, wodurch TolAC-AEDANS verdrängt wird. Die Zeitkonstante der Reaktion liegt mit 1250 s (in 0,5 M GdmCl) im Bereich der Assoziationsreaktion von fd G3P\* P213G (752 s; Kapitel 3.1.7, Tabelle 3.1.3). Dies weist darauf hin, dass in den P213G-substituierten Varianten nicht ausschließlich Pro214 für die Einnahme zumindest einer leicht assoziierten Form verantwortlich ist.

Wie in Kapitel 3.1.7 angedeutet, können aus den Amplituden der Reaktionsverläufe keine direkten Rückschlüsse auf die Affinitäten der Varianten für TolAC gezogen werden, da zum Teil bereits durch die Strukturierung von N2 in der Totzeit des Experimentes die Bindung von TolAC-AEDANS an N1 beeinträchtigt wird. Aus diesem Grund wurden analog zum WT fd G3P\* und fd G3P\* IIHY über die Messung der Assoziationskinetiken die  $K_D$ -Werte der im Bereich des Pro213 substituierten Proteine bestimmt (Tabelle 3.2.3).

Tabelle 3.2.3: Interaktion von TolAC-AEDANS mit den verschiedenen G3P\*-Varianten.

Variante	$k_{on}$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{off}/k_{on}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
isolierte N1	$0,86 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,03$	0,30	$0,31 \pm 0,02$
isolierte N1 T13I	$1,21 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,03$	0,13	$0,19 \pm 0,01$
WT fd G3P*	$0,003 \pm 0,001$	$0,51 \pm 0,01$	171	$22,1 \pm 6,6$
fd G3P* APA	$0,65 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,01$	0,57	$0,44 \pm 0,02$
fd G3P* AGA	$0,19 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	1,68	$1,26 \pm 0,05$
fd G3P* IIHY APA	n. d.	n. d.	n. d.	$31 \pm 21$
WT fd G3P* - Intermediat	$0,19 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$	1,54	$1,85 \pm 0,12$
fd G3P* IIHY - Intermediat	$0,006 \pm 0,001$	$0,28 \pm 0,01$	48	$13,6 \pm 1,8$
fd G3P* IIHY	keine Assoziationskinetiken detektierbar			

Angegeben ist jeweils der aus der Analyse der Amplituden nach Gleichung 43 erhaltene  $K_D$ -Wert sowie die mikroskopischen Raten  $k_{off}$  und  $k_{on}$  aus der Auswertung der Auftragung der apparenten Assoziationsraten. Deren Quotient ergibt ebenfalls die Dissoziationskonstante des Komplexes aus dem jeweiligen G3P\* und  $0,2 \mu\text{M}$  TolAC-AEDANS. Die entsprechenden Assoziationskinetiken wurden nach Anregung bei 280 nm anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz oberhalb von 460 nm in *stopped-flow*-Mischexperimenten verfolgt. (n. d.: keine Auswertung möglich). Alle Messungen wurden bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $0,1 \text{ M}$  KP-Puffer, pH 7,0,  $0,1 \text{ M}$  GdmCl durchgeführt.

Beide Proteine, fd G3P\* AGA und fd G3P\* APA, besitzen relativ zu nativem WT fd G3P\* eine deutlich höhere Affinität für TolAC-AEDANS, was hauptsächlich auf höhere Assoziationsraten zurückgeführt werden kann. Die Dissoziationskonstante der dreifachsubstituierten Variante fd G3P\* AGA liegt dabei mit  $1,68 \mu\text{M}$  im Bereich des  $K_D$ -Wertes des lose assoziierten WT fd G3P\* ( $1,85 \mu\text{M}$ ). Relativ zur isolierten N1-Domäne ist die Bindungsfähigkeit der Variante nur sechsfach verringert. Demnach sind die zusätzlichen stabilisierenden Wechselwirkungen im fd G3P\* AGA über den nicht assoziierten Zustand hinaus relativ schwach. Die Variante fd G3P\* APA bindet noch besser an TolAC-AEDANS. Im Vergleich zur isolierten N1-Domäne ist die Dissoziationskonstante nur unwesentlich von  $0,31 \mu\text{M}$  auf  $0,44 \mu\text{M}$  erhöht (Tabelle 3.2.3), was noch einmal bestätigt, dass die Domänen in dieser Variante im Wesentlichen unabhängig voneinander vorliegen.

Im fd G3P\* IIHY führen die Substitutionen der beiden zu Pro213 benachbarten Reste dazu, dass im untersuchten Konzentrationsbereich zumindest Kinetiken der Assoziation von TolAC-AEDANS und fd G3P\* IIHY APA detektiert werden können. Der aus den Amplituden ermittelte  $K_D$ -Wert von  $31 \mu\text{M}$  ist zwar sehr stark fehlerbehaftet, er bekräftigt jedoch, dass auch in dieser Variante die Stärke der Domänenassoziation durch die beiden Alanin-Substitutionen stark herabgesetzt wird. Im Gegensatz zum WT fd G3P\* können die ebenfalls enthaltenen Substitutionen T101I und D209Y in der Gelenkregion die destabilisierende Wirkung der Austausch Q212A und P214A jedoch zumindest soweit kompensieren, dass der gedockte Zustand eingenommen wird.

### 3.2.5 Durch den Austausch der zu Pro213 benachbarten Reste liegt der entsprechende Phage permanent in der geöffneten Form vor

Die Modulation des Prolinschalters hat *in vitro* einen großen Einfluss auf die Stabilität und damit auch die Affinität des G3P\* für TolAC. Über *in vivo* Experimente sollte im Folgenden untersucht werden, wie sich die Substitutionen um Pro213 auf die Infektiosität des fd Phagen auswirken. Im ersten Schritt der Infektion pilushaltiger ( $F^+$ ) *E. coli* Zellen interagiert die N2-Domäne des G3P\* mit der Spitze des F-Pilus, wodurch vermutlich der Pilus zurückgezogen wird und so der Phage an die Zelloberfläche gelangt.<sup>11; 69</sup> Ob N2 während der folgenden Infektionsschritte am Pilus gebunden bleibt ist nicht bekannt. Die Wechselwirkung mit dem Pilus führt jedoch zur Isomerisierung von Pro213 in die *trans*-Konformation und die Dissoziation der Domänen, wodurch die Interaktionsfläche für TolAC auf der N1-Domäne exponiert wird.<sup>60; 72</sup> Vereinfacht betrachtet spiegelt demnach die Infektiosität des fd Phagen gegenüber  $F^+$ -Zellen die Affinität seines G3P\* im aktiven Intermediatzustand gegenüber TolAC wider.

Anhand von Infektionsstudien mit pilushaltigen *E. coli* Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass Phagen mit stabilisierenden Substitutionen in der Gelenkregion des G3P einen leichten Nachteil gegenüber dem natürlichen fd Phagen haben.<sup>79</sup> Ursache dafür sind vermutlich die zusätzlichen günstigen Interaktionen zwischen der Gelenkregion und N1, welche zur Ausbildung der lose-assoziierten Form führen, in der die Bindung von TolAC beeinträchtigt ist. Die in dieser Arbeit näher untersuchten Austausche der zu Pro213 benachbarten AS haben dagegen zum Teil eine drastische Verringerung der Domäneninteraktionen und damit Destabilisierung von N2 zur Folge. Ein entsprechend positiver Effekt auf die Funktionalität der Phagen mit aktiviertem G3P ist jedoch nicht beobachtbar. Relativ zum Phagen fd G3P IIHY ist die Infektiosität des Phagen fd G3P IIHY APA gegenüber  $F^+$ -Zellen unverändert (Abbildung 3.2.8). Dass sich die Substitutionen Q212A und P214A selektiv nur auf das assoziierte G3P auswirken, ist unwahrscheinlich. Vielmehr geht unter anderem aus den Faltungskinetiken des fd G3P\* IIHY APA<sup>126</sup> sowie dessen Rückfaltung in Gegenwart von TolAC-AEDANS hervor, dass zwar der Intermediatzustand deutlich destabilisiert und damit N1 besser exponiert ist, dafür jedoch das Protein viel schneller seine native, gedockte Form einnimmt (Daten nicht gezeigt). Die Beschleunigung der Öffnungs- und Schließreaktion des Pro213 führt vermutlich zur Störung der Interaktion zwischen N1 und TolAC.

Interessanterweise hat auch der Phage fd G3P APA bei der Infektion von pilushaltigen Zellen keinen Vorteil gegenüber dem WT fd Phagen (Abbildung 3.2.8), obwohl sein G3P selbst in der nativen Form fast vollständig geöffnet vorliegt. Ein möglicher Grund für die verringerte Infektiosität dieser Variante und auch fd G3P IIHY  $\Delta\beta 6$  ist die geringe Stabilität ihrer N2-Domänen. Die Infektionsexperimente selbst wurden unter Bedingungen durchgeführt, bei denen N2 jeweils gefaltet vorlag. Die zur Isolierung der Phagen verwendeten Übernachtskulturen (ÜNK) wurden jedoch bei 37 °C inkubiert, was im Bereich

des Übergangsmittelpunktes der N2-Domäne der Varianten liegt. Es ist daher nicht auszuschließen, dass aufgrund der Aggregation eines Teils der partiell entfalteten Proteine die Anzahl an infektiösen Phagenpartikeln verringert wurde.

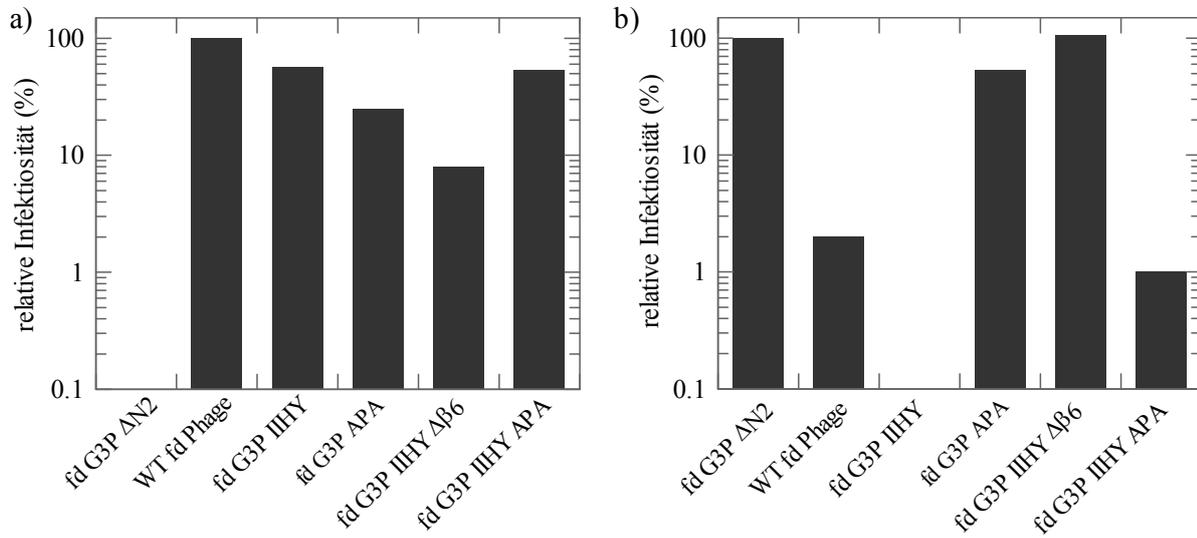


Abbildung 3.2.8: Infektion von pilusfreien bzw. pilushaltigen *E. coli* Zellen durch die fd Phagenvarianten. Aufgetragen sind die Infektiositäten verschiedener fd Phagen gegenüber a)  $F^+$  *E. coli* TG1 Zellen und b)  $F^-$  *E. coli* HB2156 Zellen in Gegenwart von 50 mM  $CaCl_2$  in a) relativ zu WT fd Phagen bzw. in b) relativ zu fd G3P  $\Delta N2$  Phagen. Die koloniebildenden Einheiten (*c.f.u.*) der infizierten Zellen wurden nach Inkubation für 30 min bei 25 °C anhand von Verdünnungsreihen auf Chloramphenicol- (Cm-)haltigen dYT-Nährböden bestimmt.

Für die Infektion von  $F^+$ -Zellen ist die Anwesenheit der N2-Domäne essentiell, da durch deren Interaktion mit dem Pilus der geöffnete, aktive Zustand erzeugt wird. Pilusfreie  $F^-$  *E. coli* Zellen können in Gegenwart von 50 mM  $CaCl_2$  ebenfalls infiziert werden.<sup>124</sup> Die Effizienz ist allerdings um mehr als drei Zehnerpotenzen herabgesetzt, da durch die fehlende Wechselwirkung mit dem Pilus keine Anreicherung der Phagen auf der Oberfläche stattfindet. Es wird vielmehr vermutet, dass die zusätzlich enthaltenen Calciumionen entweder durch Präzipitation der Phagen auf der Oberfläche oder über die Störung der Membranintegrität der Zelle und damit Verbesserung der Zugänglichkeit von TolAC die Infektiosität erhöhen.

Die Gegenwart der N2-Domäne wirkt sich demnach hier hinderlich auf den Infektionsprozess aus, da sie durch die Wechselwirkung mit der N1-Domäne die Interaktionsfläche für TolAC blockiert. Die Phagenvarianten, deren G3P\* aufgrund zusätzlicher Substitutionen entweder deutlich schwächer oder gar nicht in assoziierter Form vorliegt, haben demnach einen deutlichen Vorteil. Erwartungsgemäß zeigen der Deletionsphage fd G3P  $\Delta N2$  und der Phage fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta_6$ , in dessen G3P die beiden Domänen unabhängig voneinander agieren, die höchste Infektiosität (Abbildung 3.2.8b). Die Infektiosität des Phagen fd G3P APA ist dem gegenüber jedoch nur zweifach verringert. Dies deckt sich mit den aus den Bindungsexperimenten erhaltenen  $K_D$ -Werten und zeigt gleichzeitig an, dass der Verlust an aktiven fd G3P APA Phagenpartikeln durch Aggregationsprozesse während der Inkubation der ÜNK bei 37 °C gering ist.

Dass die Infektiosität von der spontanen Dissoziation der Domänen und damit auch der Stabilität der N2-Domäne abhängt, zeigt sich in den Werten der drei übrigen Varianten. Während analog zum *in vitro* Experiment die Anzahl an durch den Phagen fd G3P IIHY infizierten Zellen unterhalb der Detektionsgrenze liegt, führt die beschleunigende Modifikation des Prolinschalters zu einer sichtbaren Verbesserung der Infektiosität gegenüber F<sup>-</sup>-Zellen. Sowohl der Übergangsmittelpunkt von N2 als auch der  $K_D$ -Wert des fd G3P\* IIHY APA sind nur leicht im Vergleich zu denen des WT fd G3P\* erhöht, weshalb die Infektiositäten der entsprechenden Phagen sehr ähnlich sind. Gegenüber dem Phagen fd G3P  $\Delta$ N2 mit vollständig zugänglicher N1-Domäne ergibt sich allerdings noch immer ein hundertfacher Unterschied, der mit den Differenzen in den Dissoziationskonstanten gut übereinstimmt. Die über den Energietransfer zwischen den gereinigten Proteinen erhaltenen Bindungsaffinitäten reflektieren demnach sehr gut die Stärke der Wechselwirkung der N1-Domäne des Phagen-G3P während der Infektion.

### 3.3 Der Einfluss der ersten Schleife von N1 auf die Assemblierung der N-terminalen Domänen des fd G3P\*

Während der Infektion von *E. coli* Zellen muss die N2-Domäne des Phagen-G3P\* durch Interaktion mit dem Pilus zumindest partiell entfaltet werden bzw. den gedockten Zustand verlassen, damit die N1-Domäne mit TolAC interagieren kann. Welche strukturellen Veränderungen genau durch die Wechselwirkung zwischen der N2-Domäne und Pilus verursacht werden, konnte bisher *in vitro* nicht untersucht werden, da es trotz vielfältiger Ansätze bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich war, die monomere Einheit des Pilus, das Pilin, in ausreichenden Mengen herzustellen. Durch die Arbeit von Deng und Perham<sup>68</sup> ist jedoch bekannt, dass für die Interaktion mit dem Pilus die Reste Trp181, Phe190 und Phe194 in der N2-Domäne eine wichtige Rolle spielen. Diese sind oberflächenexponiert und weit entfernt von der Gelenkregion bzw. von Pro161 (Abbildung 3.1.1a). Durch Austausch dieser AS gegen Alaninreste ist der fd Phage nicht mehr in der Lage, pilushaltige *E. coli* Zellen zu infizieren.<sup>97</sup> Die Infektiosität gegenüber pilusfreien Zellen ist dagegen im Vergleich zum Ausgangsphagen 40fach erhöht. Da die Stabilität der N2-Domäne des entsprechenden G3P\* zudem um ca. 5,5 °C verringert ist, wurde geschlussfolgert, dass diese Positionen einen direkten Einfluss auf die Stabilität und Faltung der N2-Domäne haben.

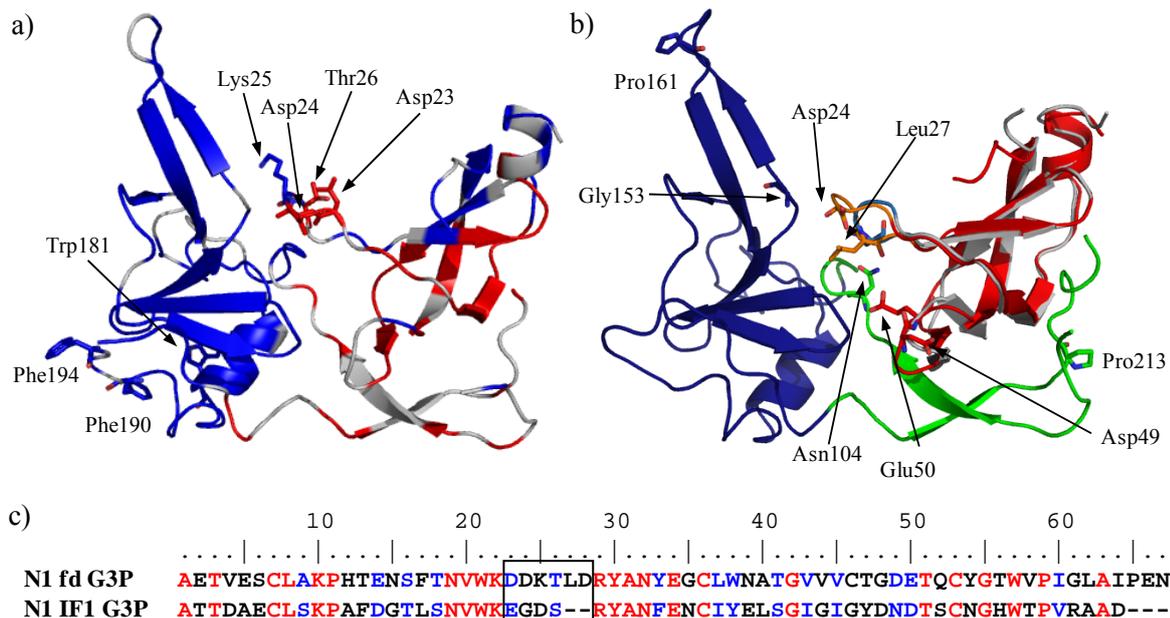


Abbildung 3.3.1: Vergleich der Strukturen und Sequenzen von N1 des fd G3P\* und N1 aus IF1 G3P\*.  
a) Verteilung der Amidprotonen mit einer nativ-ähnlichen (blau) oder nicht nativ-ähnlichen (rot) chemischen Verschiebung im langlebigen Faltungsintermediat (Kapitel 3.2.2). Über die in grau gezeigten Positionen liegen keine Informationen vor. Die AS Trp181, Phe190 und Phe194 sowie die AS 23-26 der Schleifenregion sind als Stäbchen-Modelle gezeigt. b) Überlagerung der Kristallstruktur der N1-Domäne des G3P des Phagen IF1 (grau) mit der Tertiärstruktur des N1N2-Fragments von WT fd G3P\* mit einer Abweichung der Rückgratotope von 0,623 Å. Die homologe Schleifenstruktur ist orange (fd G3P\*) bzw. hellblau (IF1-N1) eingefärbt. Als Stäbchen-Modelle dargestellt sind die im fd G3P\* enthaltenen Reste Asp24 und Leu27, welche Wasserstoffbrücken zu den AS Gly153 und Asn104 ausbilden, sowie die Reste Asp49, Glu50, Pro161 und Pro213. Die N1-Domäne des fd G3P\* ist in rot, der globuläre Teil von N2 in blau und die Gelenkregion in grün gezeigt. Die Abbildung wurde anhand der PDB-Strukturen 1G3P<sup>61</sup> und 2X9B<sup>91</sup> mit dem Programm Pymol<sup>123</sup> erstellt. c) AS-Sequenzvergleich der N1-Domänen des fd G3P und IF1 G3P. Identische Reste sind in rot, ähnliche AS in blau dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm BioEdit<sup>165</sup> erstellt.

Im nativen Zustand mit *cis*-Pro213 wird die Interaktion zwischen N1 und N2 durch das Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Resten der Gelenkregion und dem darüber lokalisierten Teil der N1-Domäne stabilisiert.<sup>62; 120</sup> Es wurde dabei bisher angenommen, dass diese Wechselwirkungen unmittelbar durch die Bindung von N2 an den Pilus unterbunden werden. Um näher zu untersuchen, ob noch weitere Bereiche des G3P\* einen Einfluss auf die Population des gedockten Zustandes haben und dadurch eventuell an der Weiterleitung des Signals von der Pilusbindungsstelle zur Gelenkregion beteiligt sind, wurden die über Echtzeit-NMR-Spektroskopie ermittelten chemischen Verschiebungen der einzelnen Reste im Faltungsintermediat des WT fd G3P\* genauer analysiert (Kapitel 3.2.2; Abbildung 3.3.1a). Es entspricht dem aktiven Zustand, der im Verlauf der Phageninfektion durch die Interaktion mit dem Pilus erzeugt wird.

Tatsächlich gehen neben den Resten der Gelenkregion auch die Schleifenreste Asp23-Thr26 der N1 Domäne erst durch die abschließende langsame Domänenassoziation in den nativen Zustand über (Abbildung 3.3.1a). Diese Bereiche sind räumlich gesehen weit von der Gelenkregion entfernt, wobei vermutet wurde, dass sie für lokale Wechselwirkungen zwischen den Domänen verantwortlich sind. Um dies zu überprüfen, wurde die Interaktionsfläche zwischen N1 und N2 im WT fd G3P\* mit Hilfe des Programmes PISA<sup>82</sup> analysiert. Dabei ergab sich, dass die in der Schleife 1 der N1-Domäne lokalisierten Reste Leu27 und Asp24 jeweils über die Carbonylsauerstoffatome ihres Rückgrates Wasserstoffbrücken zu den AS Asn104 bzw. Gly153 in N2 ausbilden (Abbildung 3.3.1b). Interessanterweise hat die Substitution des Gly153 durch Aspartat sowohl im WT fd G3P\* als auch im fd G3P\* IIHY einen ähnlichen destabilisierenden Effekt auf die N2-Domäne wie der Austausch P213G.<sup>79; 150</sup> Asn104 befindet sich im Übergangsbereich zwischen dem ersten  $\beta$ -Faltblatt der Gelenkregion und dem globulären Teil der N2-Domäne und könnte dadurch zusammen mit Gly153 und der Schleifenregion für die optimale Orientierung der Domänen im nativen Zustand sorgen (Abbildung 3.3.1b).

Die Wechselwirkung zwischen der ersten Schleife von N1 und der N2-Domäne wird nach den Berechnungen mittels PISA hauptsächlich durch die Orientierung des Rückgrates der sechs AS langen Sequenz (DDKTLD) und weniger durch die Eigenschaften der Seitenketten bestimmt. Im Folgenden sollte daher anhand einer G3P\*-Variante mit verkürzter Schleife der Einfluss der Interaktion auf die Stabilität und den Faltungsmechanismus des G3P\* analysiert werden. Um zu verhindern, dass durch die Verkürzung sterische Hinderungen auftreten, die zur Destabilisierung der N1-Domäne führen, wurde die ursprüngliche Sequenz gegen die AS-Abfolge EGDS ausgetauscht, so wie sie natürlicherweise in der N1-Domäne des G3P\* des filamentösen Phagen IF1 vorkommt (Abbildung 3.3.1c). Dieser Phage verwendet sogenannte I-Pili auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen als primäre Rezeptoren. Stefan Lorenz konnte anhand von Infektionsexperimenten zeigen, dass der Phage IF1 im Verlauf der Infektion ebenfalls seine N1-Domäne verwendet, um mit der C-terminalen Domäne des TolA-Proteins zu interagieren.<sup>91</sup> Die AS-Sequenzen der beiden N1-Domänen weisen eine Identität von 31 %

auf<sup>83</sup>, wobei allerdings die vier Reste, die die beiden Seiten der Schleife 1 flankieren, jeweils identisch sind (Abbildung 3.3.1c). Mit einer Abweichung der Rückgrat-atome von nur 0,623 Å zeigt zudem die Überlagerung der Struktur von N1 im WT fd G3P\* (PDB: 1G3P<sup>61</sup>, Kette B) mit der der isolierten N1-Domäne des IF1 G3P\* (PDB-Eintrag 2X9B<sup>91</sup>), dass die Domänen trotz zum Teil gravierender Sequenzunterschiede in den Bereichen geordneter Sekundärstrukturelemente gut übereinstimmen (Abbildung 3.3.1b).

### 3.3.1 Der Austausch der ersten Schleife in N1 stabilisiert diese Domäne, führt aber gleichzeitig auch zur starken Destabilisierung der N2-Domäne

Die kürzere AS-Abfolge EGDS wurde sowohl in fd G3P\* IIHY als auch in das WT fd G3P\* eingeführt, wobei als Referenzen zusätzlich die entsprechenden isolierten N1-Domänen mit dieser modifizierten Schleifensequenz hergestellt wurden. Die Variante WT fd G3P\* EGDS wurde von Anna Schneider im Rahmen eines von mir betreuten Forschungspraktikums fermentiert, gereinigt und teilweise charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass der anhand der Änderung des CD-Signals bei 210 nm bestimmte Übergangsmittelpunkt der N2-Domäne dieser substituierten Variante um ca. 10 °C gegenüber dem Ausgangsprotein verringert ist (Abbildung 3.3.2, Tabelle 3.3.1). Die ebenfalls reduzierte Enthalpie bestätigt, dass durch die Modifikation von N1 die Interaktion zwischen den Domänen stark gestört ist. Der Effekt ist dabei vergleichbar mit dem Austausch der Region um Pro213 (WT fd G3P\* AGA) bzw. der G153D-Substitution in der N2-Domäne (WT fd G3P\* G153D, Tabelle 3.3.2), die wahrscheinlich an der Ausbildung von Interaktionen zur Schleife 1 der N1-Domäne beteiligt ist. Die Vermutung liegt daher nahe, dass, genau wie in diesen Varianten, im fd G3P\* EGDS der gedockte Zustand nicht mehr richtig eingenommen werden kann.

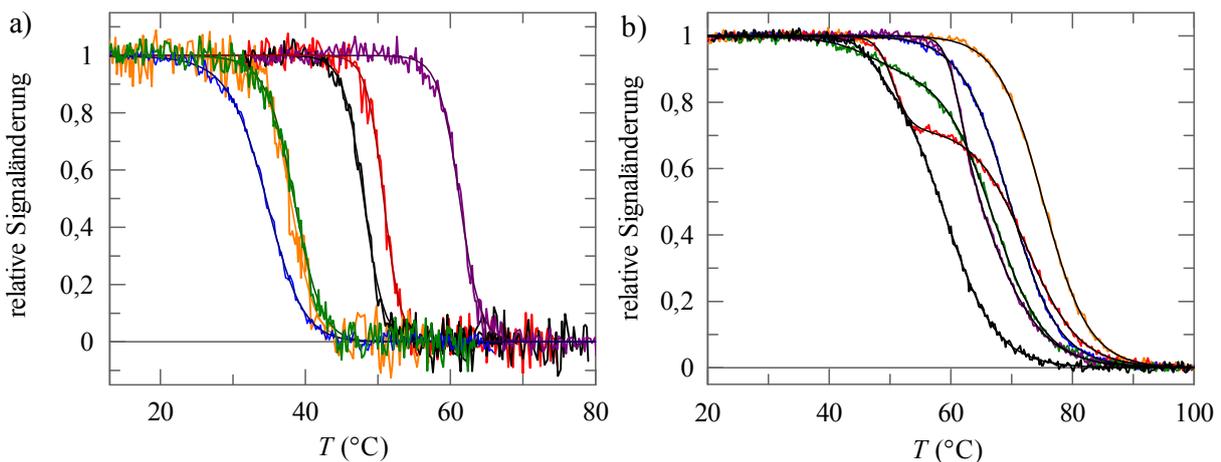


Abbildung 3.3.2: Vergleich der thermischen Stabilität der Proteine mit veränderter Schleifenregion.

a) Auftragung der relativen Änderung des CD-Signals bei 210 nm von WT fd G3P\* (schwarz), WT fd G3P\* EGDS (grün), fd G3P\* IIHY (violett), fd G3P\* IIHY EGDS (rot), WT fd G3P\* AGA (orange) sowie der isolierten N2-Domäne (dunkelblau) gegen die Temperatur. b) Gezeigt ist der Anteil an nativem WT fd G3P\* (schwarz), WT fd G3P\* EGDS (grün), fd G3P\* IIHY (violett), fd G3P\* IIHY EGDS (rot), der isolierten N1-Domäne T13I (dunkelblau) bzw. N1 T13I EGDS (orange) in Abhängigkeit der Temperatur. Die biphasischen Übergänge wurden anhand der Änderung des CD-Signals bei 230 nm verfolgt. Die durchgezogenen Linien stellen jeweils Angleiche an die Daten unter der Annahme eines Zweizustands- (a) bzw. b) Zwei- bzw. Dreizustandsmodells dar. Die Übergänge wurden wie in Tabelle 3.3.1 beschrieben gemessen. Dort sind auch die aus der Datenanalyse erhaltenen thermodynamischen Parameter aufgelistet.

Tabelle 3.3.1: Thermische Stabilitätsdaten der G3P\*-Varianten mit veränderter Schleife.

Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
	$T_M$ (°C)	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{45^\circ\text{C}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$T_M$ (°C)	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{60^\circ\text{C}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
Isolierte N1	-	-	-	62,3	234	1,6
Isolierte N1 EGDS	-	-	-	69,7	224	6,2
Isolierte N1 T13I	-	-	-	67,5	235	5,1
Isolierte N1 T13I EGDS	-	-	-	75,2	224	9,4
WT fd G3P*	48,0	612	5,6	60,2	230	0,1
fd G3P* EGDS	38,4	420	-9,6	67,0	225	4,6
fd G3P* IIHY	61,2	644	27,2	66,0	228	4,0
fd G3P* IIHY EGDS	50,8	734	12,6	72,5	229	8,0
Isolierte N2	34,6	304	-11,7	-	-	-
Isolierte N2 Q129H	38,8	344	-7,3	-	-	-
fd G3P* APA	36,8	331	-9,8	59,9	227	-0,1
fd G3P* AGA	37,9	470	-11,5	58,6	198	-0,8
fd G3P* G153D	38,2	523	-12,2	60,6	227	0,4
fd G3P* IIHY G153D	53,7	620	15,3	65,8	249	4,2

Angegeben sind für die G3P\*-Varianten bzw. isolierten Domänen die Schmelztemperaturen  $T_M$ , die Enthalpien der jeweiligen Entfaltungsreaktion am  $T_M$  ( $\Delta H$ ) und die freien Enthalpien der Entfaltung  $\Delta G^{55^\circ\text{C}}$  und  $\Delta G^{65^\circ\text{C}}$  bei 55 °C bzw. 65 °C. Die Übergänge der N2-Domänen (isoliert oder im G3P\*), welche über die Änderung des CD-Signals bei 210 nm verfolgt wurden, wurden gemäß eines Zweizustandsmodells analysiert. Die Daten für die N1-Domänen in den G3P\*-Varianten wurden nach Auswertung des biphasischen Entfaltungsübergangs, der anhand des CD-Signals bei 230 nm gemessen wurde, gemäß eines Dreizustandsmodells erhalten. Der erste Übergang spiegelt die Entfaltung der N2-Domäne sowie die Dissoziation der Domänen wider, der zweite Übergang die Denaturierung der N1-Domäne. Der Übergang der isolierten N1-Domänen wurde über die Änderung des CD-Signals bei 230 nm gemessen und gemäß eines Zweizustandsmodells ausgewertet. Zur Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde für die G3P\*-Varianten eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von 10000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> für N2 und für N1 1000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> angenommen, für die isolierten N2-Domänen wurden  $\Delta C_p$ -Werte von 8000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> und für die isolierten N1-Domänen 1000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> verwendet. Die Daten für WT fd G3P\*, isolierte N1 T13I und fd G3P\* IIHY wurden der Referenz<sup>121</sup> entnommen. Die Stabilitätsparameter von fd G3P\* IIHY G153D bzw. isolierter N1-Domäne wurden aus den Arbeiten<sup>150</sup> bzw. <sup>152</sup> erhalten. Die Daten von isolierter N2 Q129H wurden der Referenz<sup>151</sup> entnommen, die Werte für die Varianten fd G3P\* APA und fd G3P\* AGA sind persönliche Mitteilungen von Johanna Koch bzw. Roman Jakob, die Werte für die Variante fd G3P\* EGDS sind eine persönliche Mitteilung von Anna Schneider. Die Werte für die Domänen des fd G3P\* G153D entstammen der Referenz<sup>79</sup>. Die Übergänge von 4  $\mu\text{M}$  Protein (1  $\mu\text{M}$  bei 210 nm) wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm, einer Heizrate von 60 °C h<sup>-1</sup> und einer Dämpfung von 8 s gemessen.

Dass der Verlust der Interaktionen zwischen den Domänen und damit die starke Destabilisierung der N2-Domäne nicht durch eine Störung der N1-Domäne hervorgerufen wird, zeigt deren um ca. 7 °C erhöhte Stabilität (Abbildung 3.3.2b, Tabelle 3.3.1). Der Austausch der ersten Schleife wirkt sich dabei nicht nur auf N1 im G3P\* sondern auch auf die isolierte N1-Domäne günstig aus, deren  $T_M$ -Wert im Vergleich zu dem von N1 in fd G3P\* EGDS sogar um weitere 2 °C erhöht ist. Da die Enthalpien der Entfaltung der N1-Domänen unabhängig von der Sequenz der ersten Schleife sind (Tabelle 3.3.1), liegt die Ursache für die Stabilisierung vermutlich weniger in der kompakteren Faltung als der Verringerung der Anzahl negativ geladener Reste. Die Nettoladung der Schleifenregion bleibt durch den Ersatz der Sequenz DDKTLD durch EGDS gleich. Gerade dieser Bereich der N1-

Domäne weist jedoch unter anderem aufgrund der in der Nähe befindlichen Reste Asp49 und Glu50 (Abbildung 3.3.1b) eine hohe negative Oberflächenladungsdichte auf. Tatsächlich führt der Austausch des Glu50 gegen Glycin ebenfalls zur Stabilisierung der N1-Domäne um 2,6 °C.<sup>152</sup>

Im fd G3P\* IIHY EGDS verhalten sich die Stabilitätsbeiträge der günstigen Substitution der Schleife und von T13I additiv, wobei die Stabilität gegenüber der N1-Domäne aus fd G3P\* IIHY ebenfalls um etwa 7 °C erhöht ist. Der Übergangsmittelpunkt von N2 in fd G3P\* IIHY EGDS ist dagegen wiederum deutlich verringert. Im Gegensatz zu fd G3P\* EGDS liegt jedoch der  $\Delta H$ -Wert im Bereich des Ausgangsproteins, was andeutet, dass wie in der Variante fd G3P\* IIHY G153D (Tabelle 3.3.1) der gedockte Zustand eingenommen wird. Die Substitutionen T101I und D209Y in der Gelenkregion können demnach auch den Verlust an Interaktionen zwischen den oberen Bereichen der Domänen nach der Schleifenverkürzung zumindest teilweise kompensieren.

Die Unterschiede in den Stabilitäten der beiden Domänen, welche durch den Austausch der Schleifenregion hervorgerufen werden, spiegeln sich auch in der GdmCl-induzierten Entfaltung wider. Während die N2-Domänen der beiden substituierten G3P\*-Varianten gegenüber den entsprechenden Ausgangsproteinen destabilisiert sind, liegen die Übergangsmittelpunkte der N1-Domänen jeweils deutlich höher (Abbildung 3.3.3, Tabelle 3.3.2).

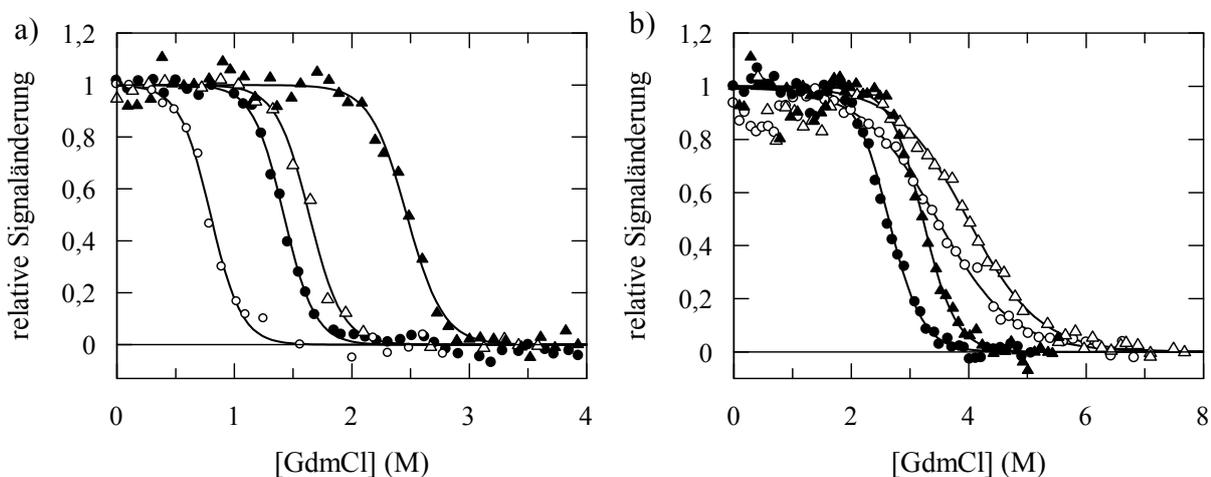


Abbildung 3.3.3: GdmCl-induzierte Entfaltung von WT fd G3P\* und den Varianten mit substituierter Schleife. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenzänderung von WT fd G3P\* (●), WT fd G3P\* EGDS (○), fd G3P\* IIHY (▲) bzw. fd G3P\* IIHY EGDS (△) als Funktion der GdmCl-Konzentration bei (a) 310 nm nach Anregung bei 280 nm zur Beobachtung der N2-Domäne anhand der Tyr-Fluoreszenz und bei (b) 360 nm nach Anregung bei 295 nm zur Detektion der Entfaltung der N1-Domäne anhand der Trp-Fluoreszenz. Die durchgezogenen Linien stellen Kurvenangleiche an die Messwerte unter Annahme eines Zweizustandsmodells dar. Die Daten für WT fd G3P und fd G3P\* IIHY wurden der Referenz<sup>121</sup> entnommen. Die Übergänge wurden bei 25 °C mit 0,5  $\mu$ M bzw. 1  $\mu$ M Protein in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die aus der Datenanalyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.3.2: Stabilitätsdaten von WT fd G3P\* und den G3P\*-Varianten aus GdmCl-induzierter Entfaltung.

Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
	[GdmCl] <sub>m</sub> (M)	<i>m</i> (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	Δ <i>G</i> (kJ mol <sup>-1</sup> )	[GdmCl] <sub>m</sub> (M)	<i>m</i> (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	Δ <i>G</i> (kJ mol <sup>-1</sup> )
Isolierte N1	-	-	-	2,5	6,1	15,3
N1 EGDS	-	-	-	3,5	5,9	20,6
N1 T13I	-	-	-	3,3	8,9	29,2
N1 T13I EGDS	-	-	-	4,1	4,6	18,9
WT fd G3P*	1,4	18,8	26,6	2,6	8,6	22,2
fd G3P* EGDS	0,8	18,8	15,0	3,5	3,8	13,3
fd G3P* APA	0,5	14,4	6,7	2,8	4,9	13,8
fd G3P* IIHY	2,5	14,9	37,2	3,2	8,9	28,6
fd G3P* IIHY EGDS	1,6	17,7	28,9	3,9	4,1	16,2

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte [GdmCl]<sub>m</sub>, die Kooperativitätsparameter *m* sowie die auf 0 M GdmCl extrapolierten freien Enthalpien der Entfaltung Δ*G* bei 25 °C. Der Übergang der N2-Domäne wurde nach Anregung bei 280 nm anhand der Fluoreszenz bei 310 nm gemessen, der der N1-Domäne bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Für beide Domänen erfolgte die Analyse der Daten nach einem Zweizustandsmodell. Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3.3.3 beschriebenen Bedingungen. Die Daten für WT fd G3P\*, isolierte N1 T13I und fd G3P\* IIHY wurden der Referenz<sup>121</sup> entnommen. Die Stabilitätsparameter von isolierter N1-Domäne wurden aus der Arbeit<sup>152</sup> erhalten. Die Werte für die Varianten fd G3P\* APA und fd G3P\* EGDS sind persönliche Mitteilungen von Johanna Koch bzw. Anna Schneider.

Auffällig ist, dass hier im Gegensatz zur thermischen Entfaltung die Kooperativität der Denaturierung von N1 durch den Austausch der Schleifensequenz stark verringert ist. Wie bereits erwähnt ist die zur Messung der Stabilität von N1 in fd G3P\* EGDS bzw. fd G3P\* IIHY EGDS verwendete Sonde nicht selektiv, weshalb die Basislinie des nativen Proteins festgelegt werden musste. Die Abnahme des *m*-Wertes zeigt sich jedoch auch für die substituierte isolierte Domäne mit der zusätzlichen Substitution T13I. Vermutlich ist der stabilisierende Effekt durch die Abschirmung der negativen Oberflächenladungen durch geringe Konzentrationen an Guanidiniumionen aufgrund der Schleifenverkürzung nicht mehr so stark ausgeprägt.

Um zu untersuchen ob die Ursache der Verringerung des *m*-Wertes auf der Seite des nativen Proteins liegt, wurde zunächst die Kinetik der Faltung der isolierten N1-Domänen nach schneller Mischung analysiert. Als Sonde wurde die Änderung der Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 295 nm verwendet (Abbildung 3.3.4). Die Ent- und Rückfaltung der N1-Domänen findet im Millisekundenbereich statt, wobei der Verlauf der Faltungsäste und die Steigungen der Entfaltungsäste jeweils sehr ähnlich sind. Unter der Annahme eines Zweizustandsmodells lassen sich über die apparenten Raten die auf 0 M GdmCl extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten der Ent- und Rückfaltung sowie die entsprechenden mikroskopischen *m*-Werte bestimmen (Tabelle 3.3.3). Die stabilisierenden Substitutionen haben danach hauptsächlich Einfluss auf die Entfaltungsgeschwindigkeit der Proteine. Durch den Austausch der Schleifensequenz wird diese vierfach verringert. Dies bedeutet, dass sich im Verlauf der Faltung von N1 die stabilisierende Wirkung des Schleifenaustausches erst nach dem Übergangszustand auswirkt.

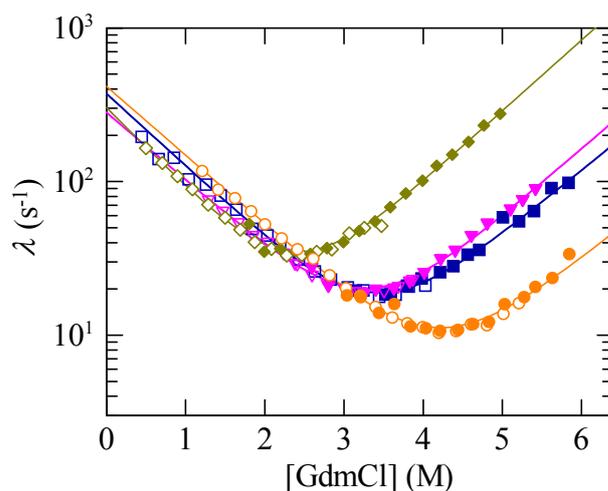


Abbildung 3.3.4: Chevron-Auftragung der Rück- und Entfaltungsraten der isolierten N1-Domänen. Gezeigt sind die apparenten Rückfaltungs- (offene Symbole) und Entfaltungsraten (geschlossene Symbole) von isolierter N1 ( $\diamond, \blacklozenge$ ), N1 T13I ( $\nabla, \blacktriangledown$ ), N1 EGDS ( $\square, \blacksquare$ ) und N1 T13I EGDS ( $\circ, \bullet$ ) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Anstieg gemäß eines Zweizustandsmodells an die Datenpunkte. Die daraus erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.3.3 aufgelistet. Die entsprechenden Kinetiken wurden nach *stopped-flow*-Mischung anhand der Änderung der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 330 nm nach Anregung bei 295 nm mit 1  $\mu\text{M}$  Protein verfolgt. Alle Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 bei 25 °C durchgeführt. Die Daten für isolierte N1 T13I wurden der Referenz<sup>122</sup> entnommen, die der isolierten N1-Domäne der Arbeit<sup>95</sup>.

Tabelle 3.3.3: Parameter der Analyse der Faltungsreaktionen der isolierten N1-Domänen.

Variante	$m_{\text{RF}}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$k_{\text{RF}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$m_{\text{EF}}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$k_{\text{EF}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$[\text{GdmCl}]_{\text{m}}$ (M)	$m$ ( $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
Isolierte N1	-1,205	302	1,062	1,421	2,4	5,6	13,3
N1 EGDS	-1,086	373	0,962	0,367	3,4	5,1	17,2
N1 T13I	-1,017	281	1,02	0,357	3,3	5,0	16,5
N1 T13I EGDS	-1,033	416	0,941	0,111	4,1	4,9	20,4

Aufgelistet sind die mikroskopischen Entfaltungs- ( $k_{\text{EF}}$ ) und Rückfaltungsraten ( $k_{\text{RF}}$ ) extrapoliert auf 0 M GdmCl sowie die entsprechenden kinetischen  $m$ -Werte nach Auswertung der in Abbildung 3.3.4 gezeigten Daten gemäß eines Zweizustandsmodells (Gleichung 28). Der Übergangsmittelpunkt  $[\text{GdmCl}]_{\text{m}}$ , die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G$  sowie Kooperativität  $m$  wurden über die Gleichung 29 bzw. 30 berechnet. Die kinetischen Daten wurden wie in Abbildung 3.3.4 beschrieben gemessen. Die Daten für isolierte N1 T13I wurden der Referenz<sup>122</sup> entnommen, die der isolierten N1-Domäne der Arbeit<sup>95</sup>.

Die kinetischen  $m$ -Werte der Ent- und Rückfaltung sind im Gegensatz zu den Ratenkonstanten kaum verändert. Die darüber ermittelbaren Kooperativitätsparameter liegen daher alle im Bereich von ca. 5  $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$ . Der  $m$ -Wert der isolierten N1 T13I ist damit deutlich geringer als der über den Gleichgewichtsübergang bestimmte Wert von 8,9  $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$ . Ein vergleichbarer Unterschied in den Kooperativitäten ergibt sich auch für N1 T13I in fd G3P\* IIHY (Tabelle 3.3.3). Bei dieser Variante wurde aufgrund des Abknickens des Rückfaltungsastes vermutet, dass während der Strukturierung in geringen GdmCl-Konzentrationen ein schnell faltendes N1-Intermediat populiert wird.<sup>122</sup> Die ebenfalls gute Übereinstimmung der aus den kinetischen Parametern erhaltenen  $[\text{GdmCl}]_{\text{m}}$ -Werte mit denen der Gleichgewichtsübergänge zeigt jedoch an, dass die Auswertung der kinetischen Daten anhand eines Zweizustandsmodells insgesamt gerechtfertigt ist.

### 3.3.2 Im fd G3P\* EGDS sind die Wechselwirkungen zwischen den N-terminalen Domänen drastisch vermindert

Die im Vergleich zu WT fd G3P\* deutlich verringerte Stabilität der N2-Domäne der Variante fd G3P\* EGDS lässt vermuten, dass hier der gedockte Zustand nicht mehr vollständig eingenommen werden kann. In diesem Fall sollte die Entfaltung der N1-Domäne ausgehend von nativem Protein deutlich beschleunigt sein, da hier die Denaturierung nicht durch die Domänenöffnung limitiert wird. Tatsächlich folgen die Entfaltungsraten von N1 in fd G3P\* EGDS dem Verlauf der Entfaltung der isolierten N1 EGDS (▲;◆, Abbildung 3.3.5). Der sich aus den Ent- und Rückfaltungsraten der N1-Domäne des fd G3P\* EGDS ergebende Übergangsmittelpunkt und der  $m$ -Wert stimmen dabei mit den Daten des Gleichgewichtsüberganges überein (Tabelle 10.1 im Anhang).

Bei hohen GdmCl-Konzentrationen ergeben sich monoexponentielle Kinetiken, die der vollständig von N2 entkoppelten Entfaltung der N1-Domäne zugeordnet werden können. Zwischen 3 und 4,4 M GdmCl ist eine zusätzliche schnellere Phase mit entgegengesetzter Amplitude detektierbar, welche die Entfaltung der N2-Domäne widerspiegelt. Unterhalb von 2,8 M GdmCl wird die Signaländerung von der Denaturierung der N2-Domäne dominiert (Abbildung 3.3.5b). Die Raten folgen jedoch nicht dem Verlauf der Entfaltung von N2 im nicht assoziierten Zustand des WT fd G3P\*. Der Chevronast ist vielmehr leicht zu höheren GdmCl-Konzentrationen verschoben (■, Abbildung 3.3.5). Die N2-Domäne wird demnach über zusätzliche Wechselwirkungen leicht stabilisiert.

Der Verlauf der Rückfaltung der  $U^{trans}$ -Spezies des fd G3P\* EGDS kann nicht aufgelöst werden (□, Abbildung 3.3.5). Die nach *stopped-flow*-Mischung gemessenen Kinetiken sind mit Zeitkonstanten von 0,67 s (in 0,2 M GdmCl) etwa dreifach gegenüber der Rückfaltung von N2 im WT fd G3P\* (1,82 s in 0,2 M GdmCl) beschleunigt, wobei das Chevronminimum zu niedrigeren GdmCl-Konzentrationen verschoben ist (□, Abbildung 3.3.5). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass im Wildtyp-Protein bereits während der Strukturierung von N2 zur Schleifenregion hin Interaktionen ausgebildet werden. Der Befund deckt sich auch mit den Ergebnissen der  $\phi$ -Wert-Analyse der isolierten N2-Domäne von Roman Jakob und Maximilian von Delbrück.<sup>157; 166</sup> Aus  $\phi$ -Werten können anhand des Vergleiches der Faltungsmechanismen des Ausgangsproteins und einer substituierten Variante Rückschlüsse auf die energetischen Wechselwirkungen der ursprünglichen AS in den verschiedenen Zuständen gezogen werden.<sup>167; 168</sup> Der mit Asp24 in der N1-Domäne interagierende Rest Gly153 von N2 befindet sich danach bereits im Übergangszustand in einer nativähnlichen Umgebung.<sup>157; 166</sup> Er kann also im G3P\* während der Faltung von N2 mit der schon gefalteten N1-Domäne Interaktionen eingehen, wodurch wiederum die Rückfaltung von N2 beeinflusst wird.

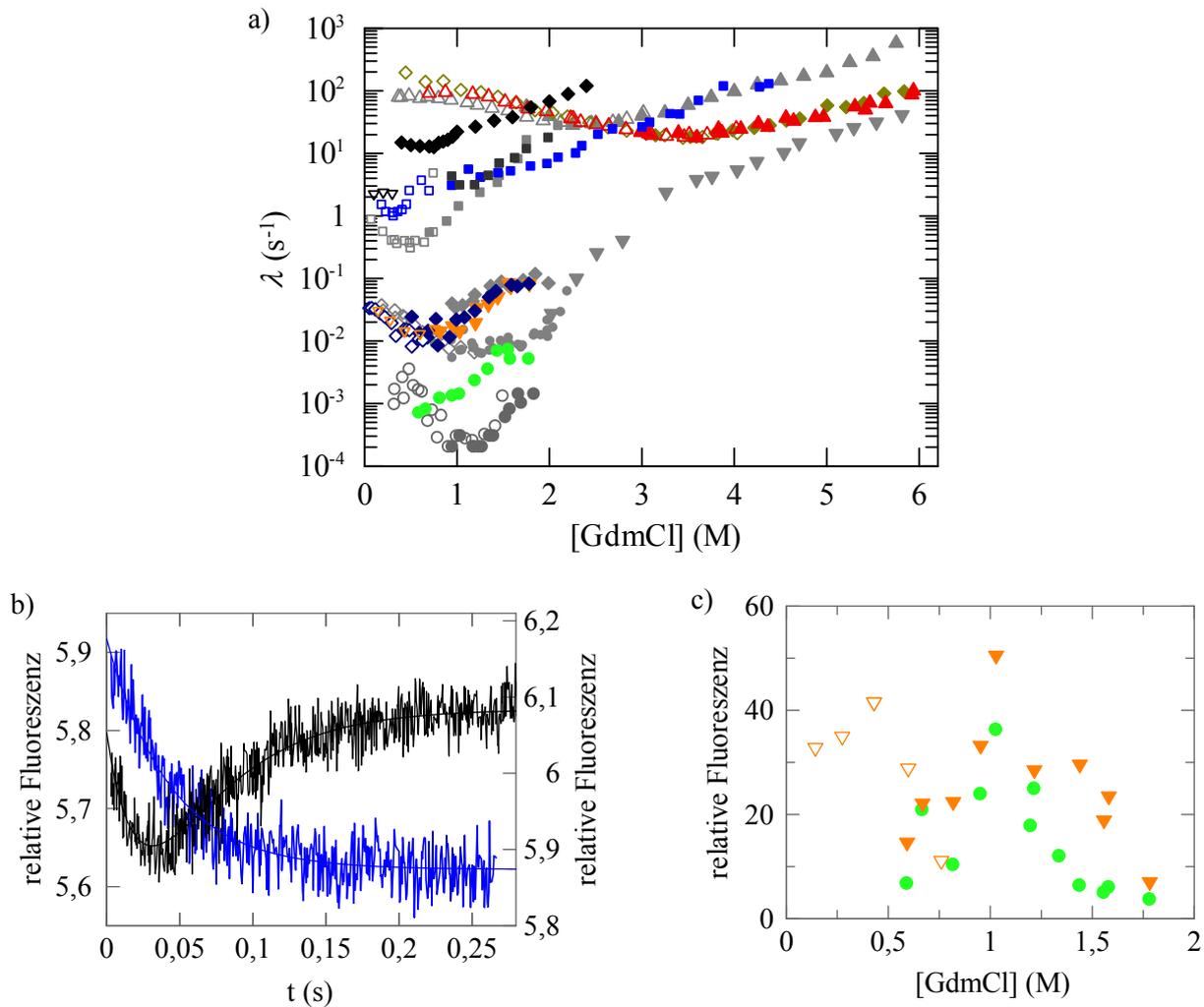


Abbildung 3.3.5: Analyse der Faltungs- und Entfaltungsraten des fd G3P\* EGDS.

a) Auftragung der apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von WT fd G3P\* (graue Symbole) bzw. fd G3P\* EGDS (farbige Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die langsamen Entfaltungs- (●;◆;▼;●;●) und Rückfaltungsreaktionen (◇;▽;◇;○) der N2-Domäne des jeweiligen G3P\* wurden nach manueller Mischung gemessen. Gezeigt sind außerdem die schnellen Rückfaltungsraten (△;△) der N1-Domänen sowie der isolierten N1 EGDS (◇) nach *stopped-flow*-Mischung. Aufgetragen sind zusätzlich die Raten der konformationellen Faltung der jeweiligen *U<sup>trans</sup>*-Spezies (□;□) ausgehend von entfaltetem Protein sowie die Entfaltung von N1 aus dem nativen Zustand (▼;▲;◆) nach *stopped-flow*-Mischung. Die Entfaltung von N2 aus dem nicht assoziierten Zustand (■) konnte bereits in Einzelmischexperimenten nach schneller Mischung detektiert werden. Im WT fd G3P\* sind diese Raten dagegen erst nach Rückfaltung für 20 bzw. 150 s in 0,5 M GdmCl und erneuter Überführung in Entfaltungsbedingungen beobachtbar (■;■). Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind außerdem die Entfaltungsraten der N1-Domäne (▲) im ungedockten WT fd G3P\* sowie die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne (◆;▽). Einige der Daten des WT fd G3P\* wurden der Diplomarbeit von Roman Jakob entnommen (siehe Abbildung 3.1.2).<sup>150</sup> Die Kinetiken des fd G3P\* EGDS wurden bis auf die mit den Symbolen ●;▽ und ▼ gekennzeichneten Daten von Anna Schneider gemessen, jedoch von mir noch einmal separat ausgewertet. Die Reaktionen der N1-Domäne nach schneller Mischung wurden anhand der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt, die der N2-Domäne oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm. Die Faltungsraten der N2-Domäne nach manueller Mischung wurden über die Messung der Fluoreszenz bei 310 nm erhalten. b) Gezeigt sind die Entfaltungskinetiken von nativem fd G3P\* EGDS nach schneller Mischung in 2,7 M GdmCl (blau) und 3,3 M GdmCl (schwarz, rechte Ordinate) mit Zeitkonstanten von  $\tau(2,7 \text{ M GdmCl}) = 43 \text{ ms}$  bzw.  $\tau_1(3,3 \text{ M GdmCl}) = 23 \text{ ms}$  und  $\tau_2(3,3 \text{ M GdmCl}) = 50 \text{ ms}$ . Die Reaktionen wurden oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. c) Auftragung der Fluoreszenzamplituden der schnellen (▽) Rückfaltungsphase sowie der schnelleren (▼) und langsamen Entfaltungsphase (●) der N2-Domäne im fd G3P\* EGDS als Funktion der GdmCl-Konzentration. Die Daten wurden nach manueller Mischung anhand der Tyrosinfluoreszenz bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm aufgenommen. Die Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 1  $\mu\text{M}$  Protein bei 25 °C durchgeführt.

Sowohl die Entfaltung der isolierten N2-Domäne als auch von N2 in nicht assoziiertem G3P\* sind normalerweise unabhängig von der Konformation des Pro161 (Kapitel 3.1.1).<sup>151</sup> Interessanterweise hat jedoch der Austausch der Schleifenregion einen Einfluss auf die Entfaltungsgeschwindigkeit der *cis*- bzw. *trans*-Form der N2-Domäne. Der Entfaltungssast der  $N^{trans}$ -Spezies des fd G3P\* EGDS, der sich nach Rückfaltung in 0,5 M GdmCl für 2 s und erneutem Sprung in Entfaltungsbedingungen ergibt (♦, Abbildung 3.3.6), ist im Vergleich zu dem der isolierten N2-Domäne ist zu höheren GdmCl-Konzentrationen verschoben (◆, Abbildung 3.3.6). Dies zeigt an, dass der globuläre Teil von N2 während der Faltung durch schwache Interaktionen z.B. durch den Zusammenhalt der Enden von N2 stabilisiert wird. Die Entfaltungsgeschwindigkeit der  $N^{trans}$ -Spezies ist allerdings geringfügig gegenüber der der stabileren N2-Domäne mit *cis*-Pro161 erhöht, die nach Rückfaltung in 0,5 M GdmCl für 600 s populiert wird. Die Entfaltungsraten der  $N^{cis}$ -Form liegen im Bereich derer von N2 des nicht assoziierten WT fd G3P\* (▼;■, Abbildung 3.3.6). Vermutlich haben die AS der unstrukturierten Gelenkregion einen ungünstigen Einfluss auf die Anordnung der Reste des globulären Teils von N2 mit *trans*-Pro161, der erst durch die nachgelagerte *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro161 und damit Stabilisierung von N2 kompensiert wird. Im WT fd G3P\* wird diese ungünstige Anordnung durch die bereits im frühen Stadium der Faltung der labileren N2-Domäne ausgebildete Interaktion mit der Schleifenregion verhindert.

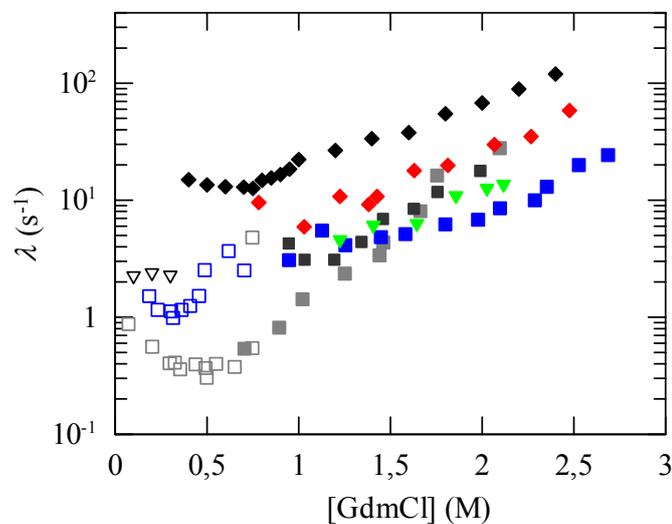


Abbildung 3.3.6: Analyse der Faltungs- und Entfaltungskinetiken der N2-Domäne fd G3P\* EGDS.

Auftragung der apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) der N2-Domäne von WT fd G3P\* (graue Symbole) bzw. fd G3P\* EGDS (farbige Symbole) nach schneller Mischung in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Gezeigt ist der Verlauf der Rückfaltung ausgehend von entfaltetem Protein (□;□) sowie die Entfaltung von nativem fd G3P\* EGDS (■), die von Anna Schneider gemessen wurde (Daten persönliche Mitteilung). Die Entfaltungsraten aus dem nicht assoziierten Zustand wurden über Doppelmischexperimente erhalten. Entfaltetes Protein wurde für 2 (♦) bzw. 600 s (▼) in 0,5 M GdmCl rückgefaltet und danach durch erneuten Sprung in höhere Denaturierungsmittelkonzentrationen entfaltet. Im WT fd G3P\* wurden entsprechende Raten nach Rückfaltung für 20 (■) bzw. 150 s (■) in 0,5 M GdmCl und erneuter Überführung in Entfaltungsbedingungen beobachtet. Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne (◆;▽). Einige der Daten des WT fd G3P\* wurden, wie in Abbildung 3.1.2 beschrieben, der Diplomarbeit von Roman Jakob entnommen.<sup>150</sup> Die Reaktionen der N2-Domäne nach schneller Mischung wurden anhand der Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 1  $\mu$ M Protein bei 25 °C durchgeführt.

Die Entfaltung der substituierten Variante nach manueller Mischung folgt einem biexponentiellen Verlauf. Mit einer Zeitkonstante von 51 s entspricht dabei die schnellere der beiden Phasen der Isomerisierung von Pro161 in die *trans*-Konformation (▼, Abbildung 3.3.5a). Demnach liegt im nativen fd G3P\* EGDS genau wie in fd G3P\* P213G ein Teil der Moleküle im nicht assoziierten Zustand vor. Die Zeitkonstante der langsameren Reaktion verringert sich zwischen 0,6 und 1,6 M GdmCl von 1430 auf 196 s, bleibt oberhalb dieser Denaturierungsmittelkonzentration jedoch konstant (●, Abbildung 3.3.5a). Die Raten befinden sich ungefähr im Bereich der Isomerisierung des Pro213, ihr Verlauf ist jedoch zu niedrigeren GdmCl-Konzentrationen verschoben, was die deutliche Destabilisierung von N2 im assoziierten Zustand des fd G3P\* EGDS reflektiert. Die Amplituden der beiden Phasen nehmen ebenfalls zu höheren GdmCl-Konzentrationen hin ab (●;▼, Abbildung 3.3.5c). Die mit der größten Signaländerung verbundene konformationelle Entfaltung aus dem offenen bzw. assoziierten Zustand findet, wie in den *stopped-flow*-Experimenten gezeigt, bereits in der Totzeit der Handmischung statt. Die detektierten Entfaltungsreaktionen stellen folglich die daran gekoppelten langsameren Isomerisierungen von Pro161 bzw. Pro213 dar, welche bereits für WT fd G3P\* beobachtet worden waren (Kapitel 3.1.2, Gleichung 44).

Während der Rückfaltung ist nach manueller Mischung lediglich eine Phase detektierbar, deren Zeitkonstante mit 122 s (in 0,5 M GdmCl) der der *trans*→*cis*-Isomerisierung des Prolin161 entspricht (▼, Abbildung 3.3.5a). Tatsächlich lässt sich die Geschwindigkeit dieser Rückfaltungsreaktion durch den Faltungshelfer hFKBP12+IF beschleunigen (Daten nicht gezeigt). Eine nachgelagerte Reaktion, die der Einnahme des assoziierten Zustandes durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro213 entspricht, ist dagegen spektroskopisch nicht sichtbar. Dies kann auf dessen geringe Stabilität im Vergleich zum WT fd G3P\* zurückgeführt werden, denn anhand der Freisetzung von TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit der N1-Domäne des fd G3P\* EGDS während der Rückfaltung in 0,5 M GdmCl lässt sich die Zeitkonstante der Assoziationsreaktion bestimmen (Abbildung 3.3.7). Sie liegt, wie bereits vermutet, mit 3390 s etwa im Zeitbereich der langsamen Isomerisierungsreaktion des Pro213. Der Prolinschalter ist demnach noch intakt. Die Erhöhung der Interaktionen zwischen den Domänen und damit die Stabilisierung der N2-Domäne sind jedoch durch die Verkürzung der Schleifenregion deutlich behindert. Ob dadurch auch die Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen der N1-Domäne und der Gelenkregion beeinflusst ist, kann an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden.

Während der Faltung von fd G3P\* EGDS wird deutlich weniger TolAC-AEDANS verdrängt als bei der Rückfaltung des Wildtyp-Proteins bzw. fd G3P\* P161A (Abbildung 3.3.7). Wie bereits anhand des Faltungsmechanismus der Variante mit substituiertes Schleife 1 geschlussfolgert, liegt ein Großteil der Moleküle aufgrund der nur schwach ausgeprägten Domäneninteraktionen in geöffneter Form vor. Auffällig ist zudem, dass die Amplitude der ersten Phase der Freisetzung von TolAC-AEDANS während der Rückfaltung von fd G3P\* EGDS wie in fd G3P\* P161A deutlich geringer ist als die der

zweiten Reaktion. Durch die Isomerisierung von Pro161, mit der in 0,5 M GdmCl hauptsächlich auch die Strukturierung des globulären Teils der N2-Domäne einhergeht, kann TolAC folglich nur zu einem sehr geringen Anteil verdrängt werden. Dies bestätigt noch einmal, dass die beiden Domänen im nicht assoziierten Zustand des fd G3P\* EGDS fast vollständig unabhängig voneinander sind und die N2-Domäne im Gegensatz zu WT fd G3P\* während ihrer Faltung nicht mit TolAC um die Wechselwirkung mit N1 kompetieren kann.

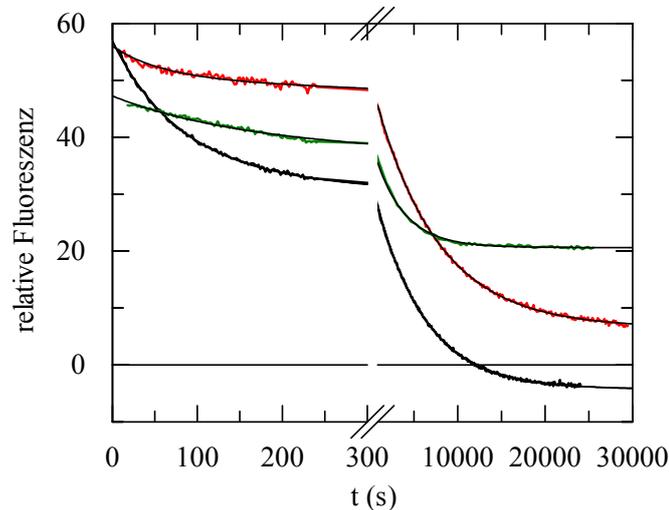


Abbildung 3.3.7: Verdrängung von TolAC aus dem Komplex mit N1 durch Faltung des fd G3P\* EGDS. Gezeigt sind die um den Pufferwert korrigierten Kinetiken der Freisetzung von TolAC-AEDANS während der Rückfaltung von WT fd G3P\* (schwarz), fd G3P\* P161A (rot) und fd G3P\* EGDS (grün). Die Reaktionen wurden nach zehnfacher Verdünnung des jeweiligen denaturierten Proteins (10  $\mu$ M in 5 M GdmCl) in Gegenwart von 1  $\mu$ M TolAC-AEDANS anhand der AEDANS-Fluoreszenz bei 490 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die schwarzen Linien stellen den Angleich biexponentieller Funktionen an die Daten mit folgenden Zeitkonstanten dar:  $\tau_1$ (WT) = 82 s,  $\tau_2$ (WT) = 5260 s;  $\tau_1$ (P161A) = 60 s,  $\tau_2$ (P161A) = 7190 s;  $\tau_1$ (EGDS) = 122 s,  $\tau_2$ (EGDS) = 3390 s. Die Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, 0,5 M GdmCl, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

### 3.3.3 Durch die Substitution der Schleifenregion wird das aktive Intermediat populiert

Eine Aussage darüber, wie groß der Anteil an geöffneten fd G3P\* EGDS Molekülen relativ zum Ausgangsprotein ist, kann nicht getroffen werden, da ein Vergleich der Gesamtamplituden aus den TolAC-Verdrängungsexperimenten der verschiedenen Varianten unzulässig ist. Die Interaktion zwischen N1 und TolAC wird hauptsächlich über Wasserstoffbrücken und Coulombwechselwirkungen vermittelt.<sup>81; 83</sup> Unter anderem bildet auch die Seitenkette des Asp28 der ursprünglichen Schleifensequenz von fd-N1 (DDKTLD<sub>28</sub>) mit dem am C-Terminus von TolAC lokalisierten Lys212 eine Salzbrücke aus. Die Bindungsfähigkeit der N1-Domäne von fd G3P\* EGDS ist daher vermutlich herabgesetzt.

Um herauszufinden, wie groß der Effekt der Substitution auf die Affinität ist, wurden analog zu Kapitel 3.2.1 anhand der Assoziationskinetiken die Dissoziationskonstanten der Komplexe aus TolAC-AEDANS und den verschiedenen Varianten in Abwesenheit von GdmCl bestimmt. Neben den apparenten Raten der Reaktionen wurde wieder der Verlauf der Amplituden ausgewertet (Abbildung 3.3.8). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.3.4 aufgelistet.

Wie erwartet führt der Austausch der Schleifenregion unabhängig vom zusätzlichen Substitutionshintergrund zu einer vierfachen Verringerung der Affinität der isolierten N1-Domäne. Interessanterweise sind Assoziation und Dissoziation gleichermaßen negativ beeinflusst. Das bedeutet, dass zwar bereits die vor allem auf elektrostatischer Anziehung basierende Bindung erschwert wird, gleichzeitig jedoch auch ungünstige Interaktionen den Komplex destabilisieren. Im Komplex von TolAC mit der N1-Domäne des Phagen IF1, nach deren Vorbild die Variante fd G3P\* EGDS konstruiert worden war, wird ebenfalls eine Salzbrücke ausgehend von Lys212 des TolAC-Proteins gebildet. Der korrespondierende Wechselwirkungspartner der IF1-N1-Domäne ist jedoch nicht Asp28 in der Schleifenregion sondern Glu37, welches im übernächsten Faltblattstrang lokalisiert ist.<sup>91</sup> In fd-N1 befindet sich an dieser Position Asn39 (Abbildung 3.3.1), das unter den Pufferbedingungen (pH 7,0) keine Salz- sondern lediglich Wasserstoffbrücken zu Lys212 ausbilden kann. Der Verlust des ursprünglichen Interaktionspartners Asp28 kann demnach nicht vollständig kompensiert werden.

Aus dem Vergleich der Dissoziationskonstanten von isolierter N1 EGDS und N1 T13I EGDS geht allerdings hervor, dass die Substitution T13I die Verringerung der Affinität durch die Veränderung der ersten Schleife teilweise ausgleicht (Tabelle 3.3.4). Im Hintergrund der stabilisierenden Substitution T13I wirken sich demnach der Austausch der Schleifenregion und der damit verbundene Verlust des für die Interaktion mit TolAC wichtigen Asp28 nur geringfügig auf die Affinität der N1-Domäne für TolAC aus.

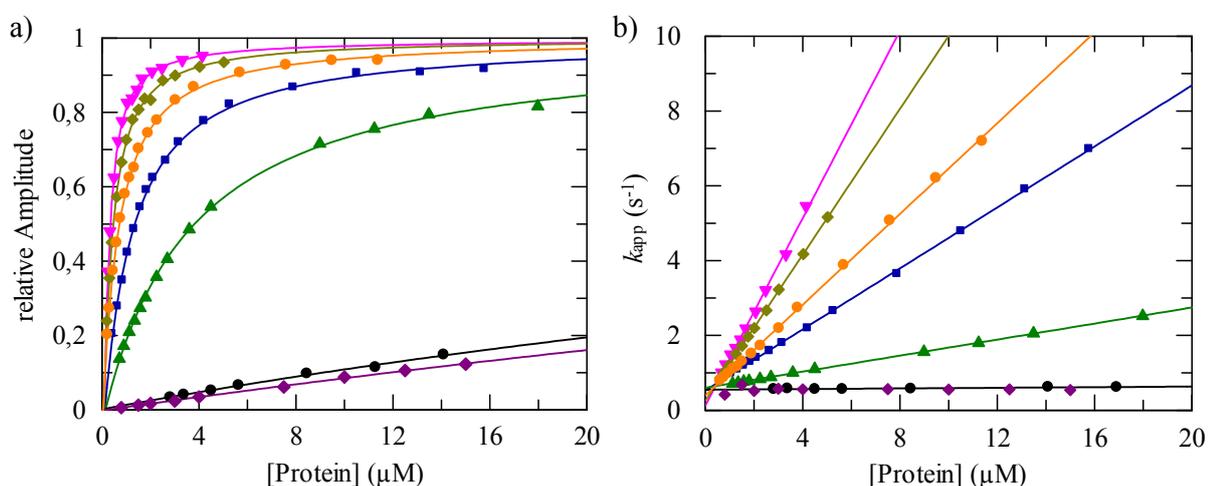


Abbildung 3.3.8: Bindung der G3P\*-Varianten mit veränderter Schleife an den Rezeptor TolAC-AEDANS. Auftragung der normierten Fluoreszenzamplituden (a) bzw. apparenten Assoziationsraten (b) in Abhängigkeit von der Konzentration an isolierter N1 (◆), N1 T13I (▼), N1 EGDS (■), N1 T13I EGDS (●), WT fd G3P\* (●), fd G3P\* EGDS (▲) bzw. fd G3P\* IIHY EGDS (◆). Sowohl die Raten als auch die Amplituden wurden aus dem Angleich monoexponentieller Gleichungen an die Assoziationskinetiken erhalten. Die in a) gezeigten Linien stellen einen Angleich an die Amplituden gemäß Gleichung 43 dar. Die mikroskopischen Raten der Dissoziation ( $k_{off}$ ) und Assoziation ( $k_{on}$ ) ergaben sich nach linearer Regression der in b) aufgetragenen Daten aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse bzw. der Geradensteigung. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde aus dem Quotienten der beiden mikroskopischen Raten berechnet (Gleichung 34). Die Assoziationskinetiken wurden nach Anregung bei 280 nm anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz oberhalb von 460 nm in *stopped-flow*-Mischexperimenten verfolgt. Alle Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 durchgeführt. Die erhaltenen  $K_D$ -Werte und mikroskopische Raten sind in Tabelle 3.3.4 aufgelistet.

Tabelle 3.3.4: Parameter der Interaktion von TolAC-AEDANS mit den verschiedenen G3P\*-Varianten.

Variante	$k_{on}$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{off}/k_{on}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
Isolierte N1	$0,97 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$	0,26	$0,28 \pm 0,02$
Isolierte N1 EGDS	$0,41 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,02$	1,3	$1,07 \pm 0,05$
Isolierte N1 T13I	$1,24 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,04$	0,13	$0,15 \pm 0,01$
Isolierte N1 T13I EGDS	$0,61 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,02$	0,65	$0,56 \pm 0,02$
WT fd G3P*	n.d.	n.d.	n.d.	$82 \pm 30$
fd G3P* EGDS	$0,11 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,01$	5,62	$3,45 \pm 0,16$
fd G3P* APA	$0,81 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$	0,44	$0,34 \pm 0,01$
fd G3P* G153D	$0,26 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,02$	1,51	$1,08 \pm 0,07$
fd G3P* IIHY	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
fd G3P* IIHY EGDS	n.d.	n.d.	n.d.	$107 \pm 40$

Angegeben ist der aus der Analyse der Amplituden erhaltene  $K_D$ -Wert sowie die mikroskopischen Raten  $k_{off}$  und  $k_{on}$  aus der Auswertung der apparenten Assoziationsraten. Deren Quotient ergibt ebenfalls die Dissoziationskonstante des Komplexes aus dem jeweiligen G3P\* und  $0,2 \mu\text{M}$  TolAC-AEDANS. (n. d.: keine Auswertung möglich). Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3.3.8 beschriebenen Bedingungen.

Die Affinität von fd G3P\* EGDS ist aufgrund des hohen Anteils an nicht assoziierter Spezies nicht nur deutlich gegenüber WT fd G3P\* erhöht, sondern außerdem nur vierfach gegenüber der Affinität der korrespondierenden isolierten N1 EGDS verringert. Verantwortlich für diesen verbleibenden Unterschied ist die niedrigere Assoziationsrate des G3P\* (Tabelle 3.3.4). Die TolAC-Bindungsdomäne der Variante ist demnach etwas schlechter zugänglich, was auf die Mischung aus geöffnetem und assoziiertem Zustand zurückgeführt werden kann. Unter der Annahme, dass im nicht assoziierten fd G3P\* EGDS zwischen N1 und N2 kaum Wechselwirkungen bestehen und N1 in der geschlossenen Form des G3P\* nicht an TolAC binden kann, lässt sich abschätzen, dass maximal 75 % des nativen Proteins im gedockten Zustand vorliegen.

Der Austausch G153D in N2 hat nicht nur einen zur Substitution der Schleifenregion ähnlichen Effekt auf die Stabilität der N2-Domäne sondern auch auf die Dissoziationskonstante (Tabelle 3.3.4). Die Bindung von fd G3P\* G153D an TolAC-AEDANS ist genau wie bei fd G3P\* EGDS nur vierfach schlechter als die Wechselwirkung zwischen TolAC und der korrespondierenden isolierten N1-Domäne. Grund dafür ist ebenfalls die verlangsamte Assoziationsreaktion. Die Affinität der gegenüber fd G3P\* EGDS leicht destabilisierten Variante fd G3P\* APA ist auch ohne das Denaturierungsmittel GdmCl fast so hoch wie die Affinität der isolierten N1-Domäne (Tabelle 3.3.4). Im nativen Zustand sind hier Interaktionen zwischen den Domänen nur sehr schwach ausgeprägt, weshalb die N1- und N2-Domäne fast vollständig unabhängig voneinander vorliegen.

In der Variante fd G3P\* IIHY EGDS gehen durch die zusätzlichen stabilisierenden Substitutionen in der Gelenkregion fast alle Moleküle in den gedockten Zustand über. Der  $K_D$ -Wert ist daher erwartungsgemäß sehr hoch. Die N2-Domäne des fd G3P\* IIHY EGDS ist jedoch vermutlich aufgrund fehlender Interaktionen leicht destabilisiert, weshalb im

Vergleich zu fd G3P\* IIHY die Assoziation detektiert werden kann, auch wenn sie sehr schwach ist und nur eine geringe Amplitude zeigt.

### 3.3.4 Der fd Phage geht durch den Austausch der Schleifenregion und den damit verbundenen Verlust der Domäneninteraktionen in den aktiven Zustand über

Die Affinität des jeweiligen G3P\* *in vivo* wurde wiederum über die Infektiosität der entsprechenden Phagen gegenüber pilusfreien Zellen untersucht. Die Anzahl der durch den Phagen fd G3P IIHY EGDS infizierten F<sup>-</sup> HB2156 *E. coli* Zellen liegt trotz der leicht verbesserten Bindungsfähigkeit unterhalb der Detektionsgrenze (Abbildung 3.3.9a). Die Infektiosität des Phagen fd G3P\* EGDS ist dagegen um fast eine Zehnerpotenz gegenüber der des Wildtyp-Phagen erhöht, da die Infektion dieser F<sup>-</sup>-Zellen von der Population an Phagen mit G3P im nicht assoziierten Zustand abhängt (Abbildung 3.3.9a). Wie in Kapitel 3.2.5 gezeigt, wird der F<sup>-</sup> HB2156 *E. coli* Stamm in Gegenwart von 50 mM CaCl<sub>2</sub> am effizientesten vom fd G3P ΔN2 Phagen infiziert, dessen G3P\* lediglich N1 und die C-terminale Domäne enthält, und daher die Bindungsstellen für TolAC permanent zugänglich sind. Die Infektiosität des fd G3P ΔN2 Phagen mit N1 EGDS ist dabei leicht gegenüber dem Phagen mit der ursprünglichen N1-Domäne herabgesetzt (Abbildung 3.3.9a), was im Rahmen des Fehlers dem Unterschied der über die *in vitro* Experimente ermittelten Affinitäten der isolierten N1-Domänen für TolAC-AEDANS entspricht (Tabelle 3.3.4).

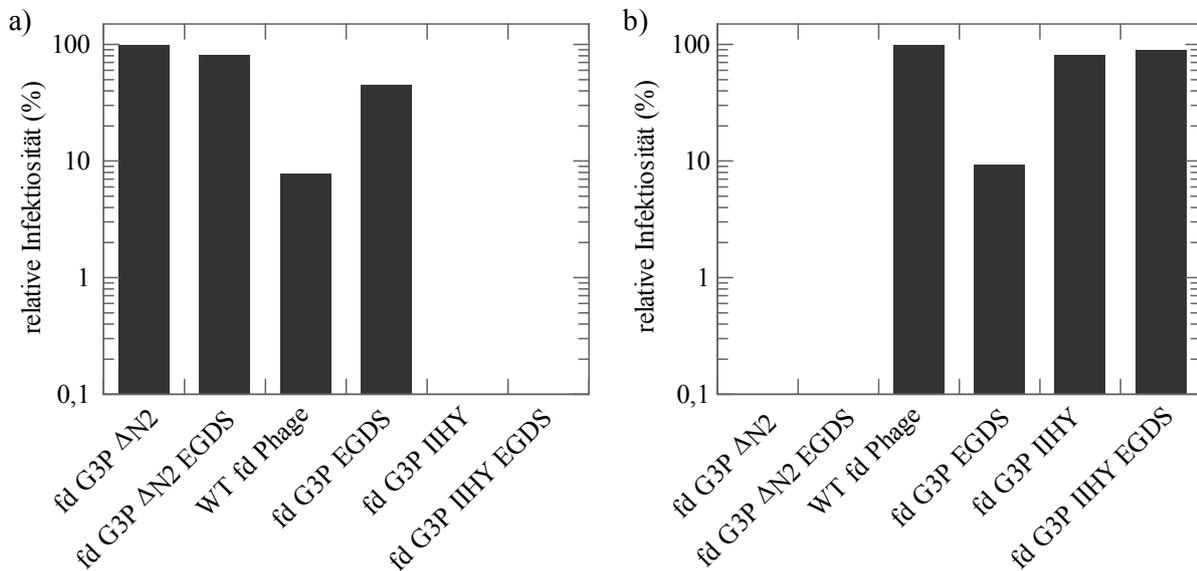


Abbildung 3.3.9: Infektion von pilusfreien bzw. pilushaltigen *E. coli* Zellen durch fd Phagenvarianten. Aufgetragen sind die Infektiositäten verschiedener fd Phagen gegenüber a) F<sup>-</sup> HB2156 *E. coli* Zellen in Gegenwart von 50 mM CaCl<sub>2</sub> und b) *E. coli* XL1 Blue Zellen in a) relativ zu fd G3P ΔN2 bzw. in b) relativ zu WT fd Phagen. Die koloniebildenden Einheiten (*c.f.u.*) der infizierten Zellen wurden nach Inkubation für 30 min bei 25 °C anhand von Verdünnungsreihen auf Cm-haltigen dYT-Nährböden bestimmt.

Pilushaltige *E. coli* Zellen werden durch die beiden Phagenvarianten ohne N2-Domäne nicht infiziert (Abbildung 3.3.9b). Erst durch die Bindung von N2 an den Pilus gelangt der Phage an die Zelloberfläche, wobei die Interaktion gleichzeitig für die Dissoziation der

Domänen sorgt. Dadurch wird die Bindungsstelle für TolAC auf der N1-Domäne exponiert, deren Affinität während der folgenden Infektionsschritte von entscheidender Bedeutung ist. Aus diesem Grund ist die Infektiosität der fd G3P EGDS Phagen im Vergleich zum Wildtyp-Phagen vermindert. Der Unterschied ist mit Faktor zehn sehr groß und wie bei den Phagen fd G3P IIHY  $\Delta\beta 6$  und fd G3P APA (Kapitel 3.2.5) vermutlich durch die verringerte Stabilität der N2-Domäne bedingt. Die hier ebenfalls hohe Infektiosität gegenüber pilusfreien Zellen zeigt jedoch wiederum an, dass der Verlust an aktiven fd G3P EGDS Phagen verhältnismäßig gering ist.

Der Phage fd G3P IIHY EGDS infiziert  $F^+$ -Zellen fast so gut wie der WT fd Phage. Neben der deutlich höheren Stabilität von N2 wird hier die durch die Substitution der Schleife bedingte Verringerung der Affinität aufgrund der zusätzlichen Substitution T13I teilweise ausgeglichen. Die Infektiosität dieses Phagen ist jedoch auch leicht gegenüber der seines Ausgangsphagen fd G3P IIHY erhöht. Im geöffneten Zustand, der durch die Wechselwirkung mit dem Pilus populiert wird, ist demnach die Zugänglichkeit der TolAC-Interaktionsfläche der N1-Domäne im G3P IIHY EGDS deutlich besser als im G3P IIHY. Dies zeigt sich auch in den Rückfaltungsexperimenten mit den entsprechenden Proteinvarianten in Gegenwart von TolAC-AEDANS (Abbildung 3.3.10).

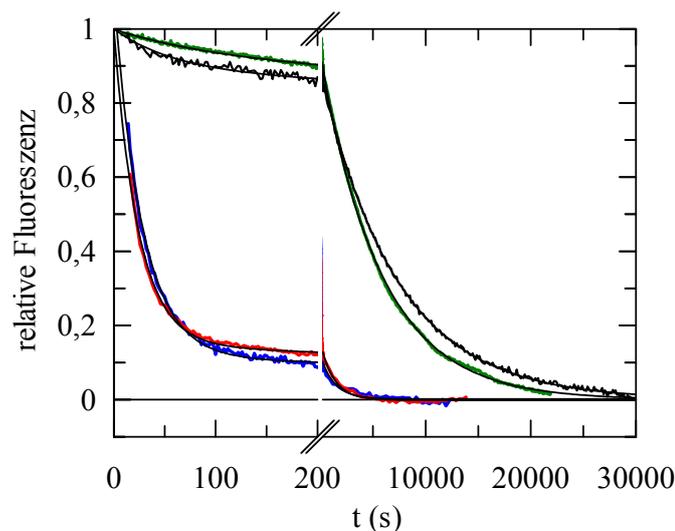


Abbildung 3.3.10: Freisetzung von TolAC-AEDANS im Verlauf der Faltung stabilisierter G3P\*-Varianten. Gezeigt sind die normierten Kinetiken der Verdrängung von TolAC-AEDANS während der Rückfaltung von fd G3P\* IIHY (blau), fd G3P\* IIHY P161A (rot), fd G3P\* P161A (schwarz) bzw. fd G3P\* IIHY EGDS (grün). Die Reaktionen wurden nach elfacher Verdünnung des jeweiligen denaturierten Proteins ( $11 \mu\text{M}$  in  $5,5 \text{ M GdmCl}$ ) in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  TolAC-AEDANS anhand der AEDANS-Fluoreszenz bei  $490 \text{ nm}$  nach Anregung bei  $280 \text{ nm}$  verfolgt. Die schwarzen Linien stellen den Angleich biexponentieller Funktionen an die Daten mit folgenden Zeitkonstanten dar:  $\tau_1(\text{IIHY}) = 27 \text{ s}$ ,  $\tau_2(\text{IIHY}) = 1357 \text{ s}$ ;  $\tau_1(\text{IIHY P161A}) = 24 \text{ s}$ ,  $\tau_2(\text{IIHY P161A}) = 1263 \text{ s}$ ;  $\tau_1(\text{EGDS}) = 99 \text{ s}$ ,  $\tau_2(\text{EGDS}) = 5670 \text{ s}$  und  $\tau_1(\text{P161A}) = 60 \text{ s}$ ,  $\tau_2(\text{P161A}) = 7190 \text{ s}$ . Die Messungen wurden bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $0,1 \text{ M KP-Puffer}$ ,  $0,5 \text{ M GdmCl}$ ,  $\text{pH } 7,0$  mit einer Schichtdicke von  $1 \text{ cm}$  durchgeführt.

In allen bisher untersuchten G3P\* IIHY Varianten wird TolAC-AEDANS bereits während der Einnahme des lose-assoziierten Zustandes aus dem Komplex mit der N1-Domäne freigesetzt (Abbildung 3.3.10). Während der Faltung von fd G3P\* IIHY EGDS ist dagegen, ähnlich wie im fd G3P\* P161A, für die Verdrängung des Bindungspartners hauptsächlich die

Pro213 limitierte Einnahme des gedockten Zustandes mit einer Zeitkonstanten von  $\tau = 5670$  s verantwortlich (Abbildung 3.3.10). Der Unterschied deutet darauf hin, dass im stabilisierten G3P\* mit substituierter Schleife der lose-assoziierte Zustand nicht mehr populiert wird, vermutlich, weil dafür die günstigen Wechselwirkungen zwischen N2 und der Schleife 1 von N1 essentiell sind. Um dies zu überprüfen wurde der Faltungsmechanismus dieser Variante ebenfalls genauer untersucht.

### 3.3.5 Der Austausch der ersten Schleife von N1 kompensiert die Verbesserung der Domäneninteraktion durch die zusätzlichen Substitutionen des fd G3P\* IIHY

Die im Millisekundenbereich ablaufende Rückfaltung der N1-Domäne von fd G3P\* IIHY EGDS ist genau wie bei fd G3P\* EGDS nicht durch die Substitution der ersten Schleife beeinflusst. Die Raten stimmen mit denen der entsprechenden isolierten Domäne überein (○;△, Abbildung 3.3.11a). Die Strukturierung der N2-Domäne ist hingegen wieder deutlich verlangsamt, wobei die Zeitkonstanten unterhalb von 0,8 M GdmCl mit 3 s (in 0,5 M GdmCl) denen von N2 aus fd G3P\* IIHY P161A (2 s in 0,5 M GdmCl) sehr ähnlich sind (□;□, Abbildung 3.3.11a). Im Gegensatz zu den bisher untersuchten G3P\*-Varianten mit stabilisierendem Substitutionshintergrund (IIHY) ist hier allerdings das Minimum des Chevrons der gebildeten Spezies deutlich zu niedrigeren Denaturierungsmittelkonzentrationen verschoben (□, Abbildung 3.3.11a).

Der Verlauf der Raten dieser Faltungsreaktion ist vergleichbar mit dem der Faltung der *U<sup>trans</sup>*-Form im WT fd G3P\*. Genau wie in diesem Fall wird N2 in fd G3P\* IIHY EGDS nicht zusätzlich durch die lose Assoziation der Domänen stabilisiert. Für die Vermittlung dieser frühen Stabilisierung ist demnach die Schleifenregion der N1-Domäne von entscheidender Bedeutung. Die N2-Domäne des gebildeten Intermediates ist trotzdem deutlich stabiler als die isolierte N2-Domäne. Grund dafür sind vermutlich die Substitutionen T101I und D209Y. Sie sorgen für eine teilweise Strukturierung der Gelenkregion, wodurch die Enden des globulären Teils von N2, die in die Gelenkregion übergehen, zusammengehalten werden.

Die Denaturierung der N1-Domäne ausgehend von nativem fd G3P\* IIHY EGDS, die über die Änderung der Trp-Fluoreszenz untersucht wurde, ist mehr als 3000fach gegenüber der Denaturierung der N1-Domäne im fd G3P\* IIHY beschleunigt und damit fast so schnell wie die Entfaltung der korrespondierenden isolierten N1-Domäne (●;▼, Abbildung 3.3.11a). Dass die Denaturierung von N1 im Gesamtprotein trotzdem weiterhin an die Entfaltung der N2-Domäne gekoppelt ist, zeigt sich in der Übereinstimmung der Raten der Entfaltungskinetiken, die selektiv für beide Domänen nach manueller Mischung bei intermediären GdmCl-Konzentrationen aufgenommen wurden (▲;▼, Abbildung 3.3.11a).

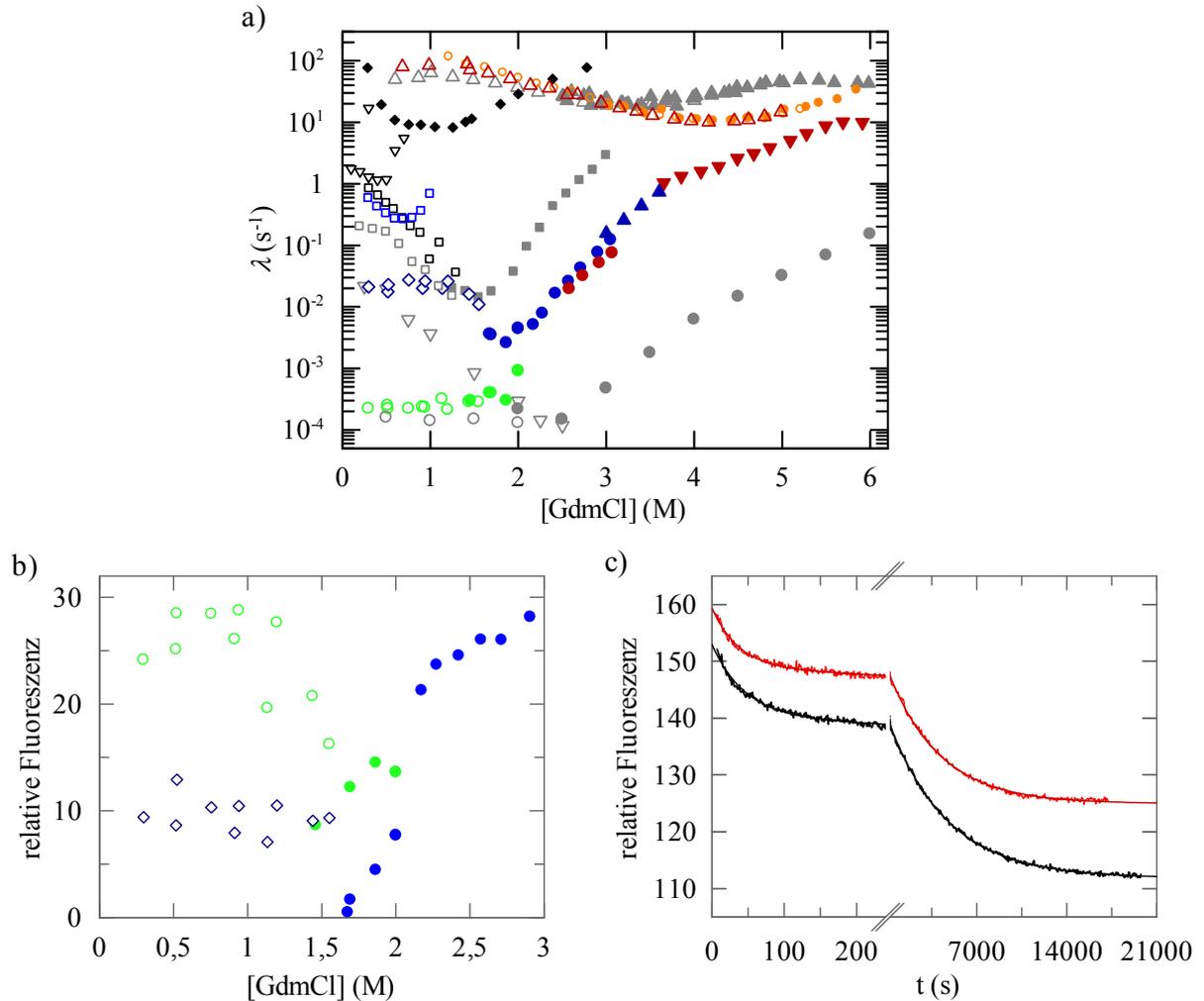


Abbildung 3.3.11: Analyse der Faltungs- und Entfaltungsraten des fd G3P\* IIHY EGDS.

a) Auftragung der apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von fd G3P\* IIHY (graue Symbole) bzw. fd G3P\* IIHY EGDS (farbige Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die langsamen Entfaltungs- (●;○;●) und Rückfaltungsreaktionen (◇;▽;□) der N2-Domäne des jeweiligen G3P\* wurden nach manueller Mischung gemessen. Zusätzlich wurde zwischen 2,5 und 3 M GdmCl über die Trp-Fluoreszenz (Anregung 295 nm, Emission 360 nm) die Entfaltung der N1-Domäne des fd G3P\* IIHY EGDS nach manueller Mischung untersucht (●). Gezeigt sind außerdem die schnelle Rückfaltung der N1-Domänen (△;△), die konformationelle Faltung der jeweiligen  $U^{trans}$ -Spezies (□;□) ausgehend von entfaltetem Protein, sowie die Entfaltung von N1 und N2 aus dem nativen Zustand (▲;▼) nach *stopped-flow*-Mischung. Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind außerdem die Entfaltungsraten der N1-Domäne aus dem ungedockten fd G3P\* IIHY (▲), die Ent- und Rückfaltungsraten isolierter N1 T13I EGDS (●;○), die Rückfaltung von N2 in fd G3P\* IIHY P161A nach *stopped-flow*-Mischung (□) sowie die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne Q129H (◆;▽). Die Entfaltung von N2 aus dem lose-assoziierten Intermediat von fd G3P\* IIHY ergab sich nach Rückfaltung in 0,5 M für 180 s und weiterem Sprung in Entfaltungsbedingungen (■). Wie in Abbildung 3.1.18 beschrieben wurden die Daten für fd G3P\* IIHY der Publikation<sup>122</sup> entnommen. Die Reaktionen der N1-Domäne nach schneller Mischung wurden anhand der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt, die der N2-Domäne oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm. Die Faltungsraten der N2-Domäne nach manueller Mischung wurden über die Messung der Fluoreszenz bei 310 nm erhalten. b) Auftragung der entsprechenden Amplituden der schnelleren (◇) und langsamen (○) Rückfaltungsphase sowie der schnelleren (●) und langsamen Entfaltungsphase (●) der N2-Domäne im fd G3P\* IIHY EGDS als Funktion der GdmCl-Konzentration, die nach manueller Mischung erhalten wurden. c) Gezeigt sind die Rückfaltungskinetiken von vollständig entfaltetem fd G3P\* IIHY EGDS nach manueller Mischung in 0,5 M (schwarz) bzw. 1,1 M GdmCl (rot). Die Reaktionen wurden bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm aufgenommen. Ein Angleich an die Kurvenverläufe ergibt Zeitkonstanten von  $\tau_1(0,5 \text{ M GdmCl}) = 45 \text{ s}$  und  $\tau_2(0,5 \text{ M GdmCl}) = 4564 \text{ s}$  bzw.  $\tau_1(1,1 \text{ M GdmCl}) = 37 \text{ s}$  und  $\tau_2(1,1 \text{ M GdmCl}) = 3992 \text{ s}$ . Alle Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 1  $\mu\text{M}$  Protein durchgeführt.

Im Übergangsbereich von N2 sind nach manueller Mischung während der Entfaltung bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm zwei Phasen detektierbar (●;●, Abbildung 3.3.11). Wie bereits für WT fd G3P\* beobachtet nimmt die Amplitude der schnelleren Reaktion mit steigender GdmCl-Konzentration zu, während die langsame oberhalb von 2 M GdmCl keine Amplitude mehr besitzt (Abbildung 3.3.11b). Die beiden Phasen spiegeln demnach die konformationelle Entfaltung aus dem gedockten Zustand und die daran gekoppelte, nachgelagerte Isomerisierung von Pro213 wider.

Die langsame Faltung (nach manueller Mischung gemessen) ist selbst bei niedrigen Denaturierungsmittelkonzentrationen ein zweiphasiger Prozess, dessen Raten GdmCl-unabhängig sind und im Bereich der Isomerisierung von Pro161 bzw. Pro213 liegen (Abbildung 3.3.11c). Über die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro161 wird normalerweise das Gleichgewicht von N2 auf die Seite der stabileren *cis*-Spezies verschoben, weshalb diese Reaktion bei geringen GdmCl-Konzentrationen einen großen Anteil an der Gesamtamplitude hat. Die Signaländerung der schnelleren der beiden Reaktionen (◇, Abbildung 3.3.11b) ist hier jedoch über den untersuchten GdmCl-Bereich deutlich geringer als die der langsamen Phase (○, Abbildung 3.3.11b). Das bedeutet, dass sogar in 0,5 M GdmCl und damit unter fast vollständig nativen Bedingungen ein großer Teil von N2 in fd G3P\* IIHY EGDS erst durch die abschließende Assoziationsreaktion in den gefalteten Zustand übergehen kann. Im stabilisierten G3P\* spielt die Schleifenregion demnach sowohl für die Bildung des lose-assoziierten Zustandes als auch für die Stabilisierung von N2 durch die Isomerisierung von Pro161 eine wichtige Rolle.

Bestätigt wird die Annahme durch den Verlauf der Entfaltung der N2-Domäne aus dem ungedockten Zustand des fd G3P\* IIHY EGDS, der über Doppelmischexperimente aufgelöst werden konnte. Nach kurzer Rückfaltungsdauer von 1 s in 0,5 M GdmCl ergeben sich Entfaltungsraten (■, Abbildung 3.3.12), die im Vergleich zu denen der nicht assoziierten Form des fd G3P\* IIHY beschleunigt sind (◆, Abbildung 3.3.12). Die Stabilität der während der Rückfaltung gebildeten *N<sup>trans</sup>*-Form des fd G3P\* IIHY EGDS und damit auch die Stärke der Domänenwechselwirkungen ist demnach gegenüber denen der Variante fd G3P\* IIHY verringert. Auch nach Verlängerung der Rückfaltungsdauer auf 30 s in 0,5 M GdmCl entfaltet die N2-Domäne des fd G3P\* IIHY EGDS mit der gleichen Geschwindigkeit (◆, Abbildung 3.3.12). Die Daten legen den Schluss nahe, dass zumindest während der Population des nicht assoziierten Zustandes Pro161 hauptsächlich in der *trans*-Konformation bleibt. Eine Aussage darüber, ob es während der Einnahme des assoziierten Zustandes zur Isomerisierung des Prolinrestes kommt, kann an dieser Stelle jedoch nicht getroffen werden.

Der Befund ist deshalb bemerkenswert, da anhand der  $\phi$ -Wert-Analyse der isolierten N2-Domäne gezeigt werden konnte, dass die Konformationsänderung des Pro161 lediglich von den Interaktionen der flankierenden  $\beta$ -Faltblattstränge und damit der lokalen Umgebung abhängt.<sup>156; 164</sup> Tatsächlich ist nicht nur in der isolierten N2-Domäne sondern auch im fd G3P\* EGDS die Isomerisierung von Pro161 in Abwesenheit der natürlichen

Schleifenregion möglich (Abbildung 3.3.5). Ausschlaggebend ist demnach wieder die Gelenkregion, deren zusätzliche Substitutionen vermutlich zu einer für die Isomerisierung des Pro161 ungünstigen Anordnung führen, da die optimale Orientierung durch die Wechselwirkung mit der Schleifenregion nicht möglich ist.

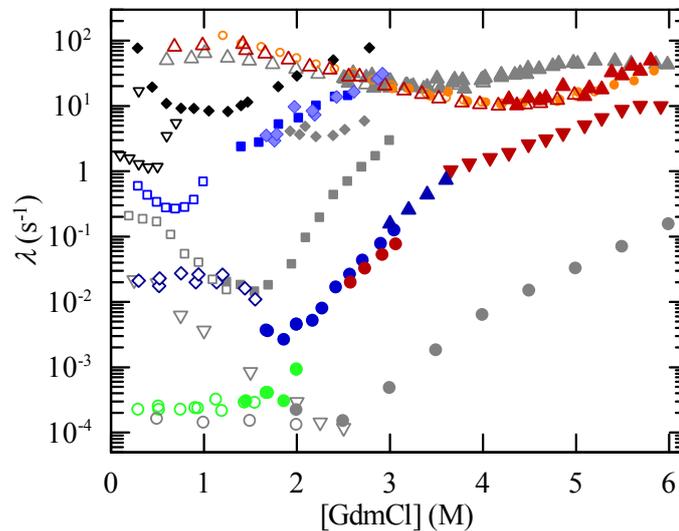


Abbildung 3.3.12: Doppelmischexperimente zur Analyse des Faltungsmechanismus des fd G3P\* IIHY EGDS. Auftragung der apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von fd G3P\* IIHY (graue Symbole) bzw. fd G3P\* IIHY EGDS (farbige Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Entfaltung der N2-Domäne im nicht assoziierten fd G3P\* IIHY EGDS wurde ausgehend von vollständig entfaltetem Protein nach Rückfaltung für 1 (■) bzw. 30 s (◆) in 0,5 M GdmCl und erneutem Sprung in Entfaltungsbedingungen gemessen. Durch Doppelmischexperimente nach schneller Mischung wurde außerdem die Denaturierung von N1 T13I EGDS im ungedockten G3P\* (Rückfaltung in 0,64 M GdmCl für 1 s) untersucht (▲). Die langsamen Entfaltungs- (●;●;●) und Rückfaltungsraten (◇;◇;◇;◇) der N2-Domäne des jeweiligen G3P\* wurden nach manueller Mischung gemessen. Zusätzlich wurde zwischen 2,5 und 3 M GdmCl über die Tryptophanfluoreszenz (Anregung 295 nm, Emission 360 nm) die Entfaltung der N1-Domäne des fd G3P\* IIHY EGDS nach manueller Mischung analysiert (●). Gezeigt sind außerdem die schnelle Rückfaltung der N1-Domänen der G3P\*-Varianten (△;△), die Ent- und Rückfaltungsraten isolierter N1 T13I EGDS (●;○), die konformationelle Faltung der jeweiligen  $U^{trans}$ -Spezies (□;□) ausgehend von entfaltetem Protein sowie die Entfaltung von N1 und N2 aus dem nativen Zustand (▲;▼) nach *stopped-flow*-Mischung. Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind außerdem die Entfaltungsraten der N1-Domäne im ungedockten fd G3P\* IIHY (▲), die Entfaltung von N2 ausgehend von für 0,5 s in 0,5 M GdmCl rückgefaltetem fd G3P\* IIHY nach *stopped-flow*-Mischung (□) sowie die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne Q129H (◆,▽). Die Entfaltung von N2 aus dem lose-assoziierten Intermediat von fd G3P\* IIHY ergab sich nach Rückfaltung in 0,5 M GdmCl für 180 s und weiterem Sprung in Entfaltungsbedingungen (■), die der nicht assoziierten Form nach Rückfaltung in 0,5 M GdmCl für 0,5 s (◆). Wie in Abbildung 3.1.18 beschrieben wurden die Daten von fd G3P\* IIHY der Publikation<sup>122</sup> entnommen. Die Reaktionen der N1-Domäne nach schneller Mischung wurden anhand der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt, die der N2-Domäne oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm. Die Faltungsraten der N2-Domäne nach manueller Mischung wurden über die Messung der Fluoreszenz bei 310 nm erhalten. Alle Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 1 μM Protein bei 25 °C durchgeführt.

Der Entfaltungsast der N1-Domäne aus dem ungedockten Zustand ist nach kurzer Rückfaltung von denaturiertem Protein für 1 s in 0,5 M GdmCl und weiterer Verdünnung zu hohen GdmCl-Konzentrationen bestimmbar (▲, Abbildung 3.3.12), wobei die Raten dem Entfaltungsast der entsprechenden isolierten N1-Domäne folgen. Analog zu den anderen G3P\*-Varianten ist die Entfaltung von N1 aus der nicht assoziierten Form nicht nur beschleunigt, sondern auch von der Denaturierung der N2-Domäne entkoppelt.

In der Variante fd G3P\* IIHY ist der Zusammenhalt der N-terminalen Domänen durch die stabilisierenden Substitutionen deutlich verbessert. Dies führt nicht nur dazu, dass die Entfaltungsgeschwindigkeit der Domänen im Vergleich zum Wildtyp-Protein tausendfach verlangsamt sondern auch im Übergangsbereich der N2-Domäne abhängig von der Isomerisierung des Pro213 ist (Kapitel 3.1.8). Dieser Effekt wird jedoch durch den Austausch der ersten Schleife in der N1-Domäne kompensiert. Die Entfaltungsraten der N2-Domäne ausgehend von nativem fd G3P\* IIHY EGDS befinden sich wiederum im Bereich derer des WT fd G3P\*. Im G3P des fd Phagen spielt diese Region demnach eine funktionell wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Domäneninteraktionen, was jedoch zu Lasten der Stabilität der N1-Domäne geht. Im IF1 Phagen liegen N1 und N2 dagegen permanent unabhängig voneinander vor, weshalb die Schleifenregion nicht für die Stabilisierung von Wechselwirkungen benötigt wird. Hier ist vielmehr die intrinsisch hohe Stabilität der beiden Domänen von entscheidender Bedeutung, die in N1 unter anderem durch die kürzere Schleifensequenz ermöglicht wird.

### 3.4 Austausch der TolAC-Bindedomäne im fd G3P\* durch die homologe N1-Domäne des filamentösen Phagen IF1

Der Austausch der Schleifenregion im WT fd G3P\* gegen die homologe Sequenz aus der N1-Domäne des filamentösen Phagen IF1 hat, wie gezeigt, weitreichende Folgen für die Assoziationsfähigkeit der Domänen und damit auch für die Stabilität der N2-Domäne. Im G3P des filamentösen Phagen IF1 wird diese Sequenz nicht benötigt, da die beiden N-terminalen Domänen nicht interagieren und auch im nativen Zustand unabhängig voneinander vorliegen.<sup>91</sup> Dies ist möglich, da die isolierte N2-Domäne des IF1 G3P ( $T_M = 53 \text{ °C}$ ) deutlich stabiler ist als N2 des fd G3P\* ( $T_M = 34,6 \text{ °C}$ ).

Anders als bei der N1- und der CT-Domäne ist die Sequenzidentität der N2-Domänen des fd G3P und IF1 G3P mit weniger als 10 % sehr gering, was zum einen den großen Stabilitätsunterschied und zum anderen die Wirtsspezifität erklärt.<sup>91</sup> Während der fd Phage mit seiner N2-Domäne an F-Pili bindet, interagiert die Pilusbindungsdomäne des Phagen IF1 mit dem I-Pilus. Durch Austausch dieser Domänen ist es jedoch möglich, die Pilusspezifität des fd Phagen zu verändern.<sup>91</sup>

Im weiteren Fortgang der Infektion wechselwirken beide Phagen über ihre N1-Domänen mit der C-terminalen Domäne von TolA, wobei die entsprechenden Interaktionsflächen auf TolAC sehr ähnlich sind.<sup>91</sup> Während jedoch im fd G3P der Bindungsbereich auf der N1-Domäne erst durch die Dissoziation von N1 und N2 exponiert wird, ist IF1-N1 permanent zugänglich. Aus den verschiedenen Infektionsmechanismen wurde daher geschlussfolgert, dass die Phagen zwar vom gleichen Vorfahren abstammen, sich jedoch durch die Veränderung ihrer N2-Domänen unterschiedliche ökologische Nischen gesucht haben.<sup>83</sup>

Wie Stefan Lorenz am Beispiel des Phagen fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta 6$  zeigen konnte, ist es möglich, durch die Deletion eines der beiden  $\beta$ -Faltblattstränge der Gelenkregion die Domäneninteraktion zu verhindern und so den Infektionsmechanismus des fd Phagen auf den des IF1 Phagen umzuprogrammieren.<sup>80</sup> Es stellte sich daher die Frage, ob die in Abbildung 3.4.1 gezeigte strukturelle und sequenzielle Ähnlichkeit der TolAC-Bindedomänen ausreicht, damit nach Substitution von fd-N1 durch IF1-N1 das fd G3P\* weiterhin in den gedockten Zustand übergeht.

Um dies zu untersuchen wurde eine entsprechende Chimäre hergestellt, indem ausgehend von fd G3P\* IIHY die Domäne N1 T13I durch N1 des IF1 G3P\* ersetzt wurde. Der stabilisierende Hintergrund wurde analog zur Konstruktion des fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta 6$  gewählt, damit die N2-Domäne leicht stabilisiert wird.<sup>80; 121</sup> Gleichzeitig begünstigen die zusätzlichen Substitutionen T101I und D209Y die Assoziation der Domänen (Kapitel 3.1.8). Aus den Ergebnissen des vorherigen Kapitels geht zudem hervor, dass für die Interaktion zwischen N1 und N2 die Schleifenregion Asp23-Asp28 eine wichtige Rolle spielt. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die in IF1-N1 enthaltene Sequenz EGDS durch die Abfolge DDKTLD aus fd-N1 ersetzt (Abbildung 3.4.1).

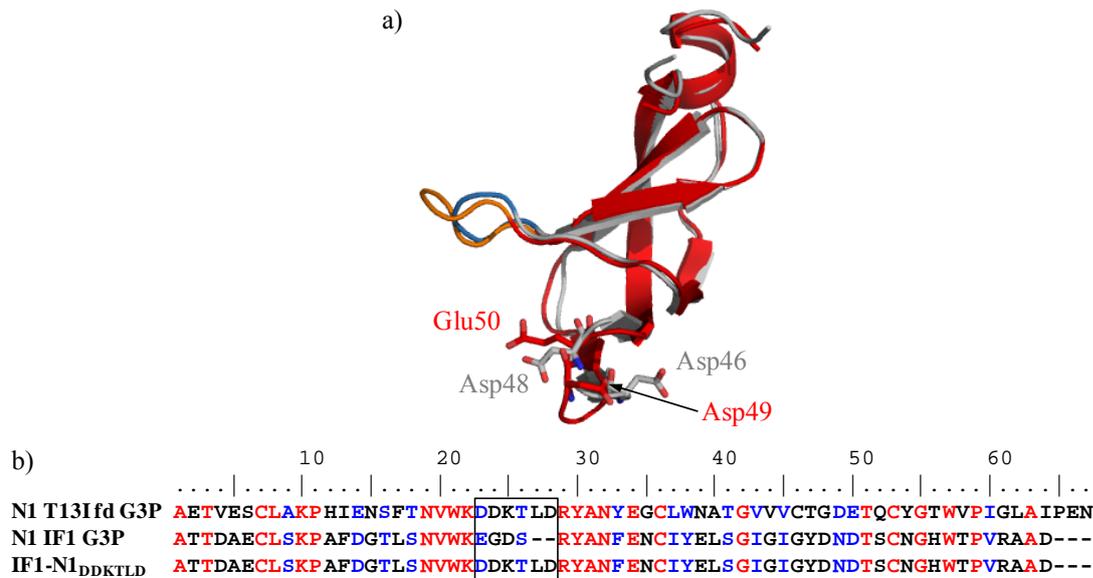


Abbildung 3.4.1: Vergleich der Strukturen und Sequenzen der N1-Domänen des fd G3P\* und IF1 G3P\*.  
a) Überlagerung der Kristallstruktur der N1-Domäne des G3P des Phagen IF1 (grau) mit der N1-Domäne des WT fd G3P\* (rot), deren Rückgratatome eine Abweichung von 0,623 Å zeigen. Die homologe Schleifenstruktur ist orange (fd-N1) bzw. hellblau (IF1-N1) eingefärbt. Als Stäbchen-Modelle dargestellt sind die im fd G3P\* enthaltenen Reste Asp49 und Glu50 sowie die AS Asp48 und Asp46 der IF1-N1-Domäne. Die Abbildung wurde anhand der PDB-Strukturen 1G3P<sup>61</sup> und 2X9B<sup>91</sup> mit dem Programm Pymol<sup>123</sup> erstellt. b) AS-Sequenzvergleich der N1-Domänen des fd G3P und IF1 G3P\* sowie IF1-N1<sub>DDKTLD</sub>. Identische Reste sind in rot, ähnliche AS in blau dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm BioEdit<sup>165</sup> erstellt.

### 3.4.1 Durch den Einbau von IF1-N1 in die stabilisierte Variante fd G3P\* IHY werden beide Domänen destabilisiert

Die resultierende Variante fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY und die korrespondierende isolierte N1-Domäne mit veränderter Schleifensequenz (IF1-N1<sub>DDKTLD</sub>) wurden zunächst hinsichtlich auf ihre Stabilität charakterisiert. Die thermische Entfaltung der isolierten N1-Domäne wurde dabei anhand des CD-Signals bei 222 nm gemessen. Im Vergleich zu natürlich vorkommender IF1-N1 ergab sich eine starke Destabilisierung durch die Veränderung der Schleife (Tabelle 3.4.1). Die Abnahme des  $T_M$ -Wertes um über 10 °C fällt dabei noch deutlicher aus als die Stabilisierung von fd N1 durch die reziproke Substitution seiner langen Schleife durch die homologe Schleife EGDS aus IF1-N1 ( $\Delta T_M = 8$  °C, Kapitel 3.3.1). Wie bereits bei der Variante fd G3P\* EGDS beobachtet, hat der Austausch der Region jedoch keinen Einfluss auf die Kooperativität des Überganges. Das bedeutet, dass die Destabilisierung nicht durch eine weniger kompakte Faltung verursacht wird. Zwar bleibt die Nettoladung der Schleife gleich, durch die Verlängerung wird jedoch an ihrem N-terminalen Ende ein zusätzlicher Aspartatrest eingefügt. Da sich analog zur N1-Domäne des Phagen fd mit den AS Asp46 und Asp48 zwei negativ geladene Reste in unmittelbarer Umgebung befinden (Abbildung 3.4.1b), wird die ungünstige negative Oberflächenladungsdichte in dieser Region zusätzlich vergrößert.

Der destabilisierende Effekt auf die N1-Domäne in der Chimäre ist noch gravierender. Der Übergangsmittelpunkt der Domäne ist nochmals um mehr als 4 °C verringert (Tabelle 3.4.1). Der Stabilitätsunterschied zeigt an, dass sich die Verknüpfung mit N2 über die Gelenkregion

ungünstig auf N1 auswirkt. Auch im WT fd G3P\* ist die N1-Domäne relativ zur isolierten N1-Domäne leicht destabilisiert, jedoch ist hier der Unterschied mit 2,1 °C nicht so stark ausgeprägt.

Tabelle 3.4.1: Thermische Stabilitätsdaten von IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> und der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY.

Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
	$T_M$ (°C)	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{45^\circ\text{C}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$T_M$ (°C)	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{55^\circ\text{C}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
Isolierte IF1-N1	-	-	-	67,2	232	8,1
Isolierte IF1-N1 <sub>DDKTLD</sub>	-	-	-	56,8	238	1,3
fd G3P* IF1-N1 <sub>DDKTLD</sub> IHY	46,3	341	1,4	52,7	222	-1,6
isolierte N1	-	-	-	62,3	234	5,0
isolierte N1 T13I	-	-	-	67,5	235	8,4
isolierte N2 Q129H	38,8	344	-7,4	-	-	-
WT fd G3P*	48,0	612	5,6	60,2	230	3,5
fd G3P* T101I	56,2	626	19,4	62,7	262	5,9
fd G3P* IIHY	61,2	644	27,2	66,0	228	7,2
fd G3P* IIHY $\Delta\beta 6$	36,7	285	-8,7	64,1	202	5,3

Angegeben sind für die Varianten die Schmelztemperaturen  $T_M$ , die Enthalpien der jeweiligen Entfaltungsreaktion am  $T_M$  ( $\Delta H$ ) und die freien Enthalpien der Entfaltung  $\Delta G^{45^\circ\text{C}}$  und  $\Delta G^{55^\circ\text{C}}$  bei 45 °C bzw. 55 °C. Die Übergänge der N2-Domänen im G3P, welche über die Änderung des CD-Signals bei 210 nm verfolgt wurden, wurden gemäß eines Zweizustandsmodells analysiert. Die Daten für N1 im G3P\* und der wurden nach Auswertung des biphasischen Entfaltungsübergangs, der anhand des CD-Signals bei 230 nm gemessen wurde, gemäß eines Dreizustandsmodells erhalten. Der erste Übergang spiegelt die Entfaltung der N2-Domäne sowie die Dissoziation der Domänen wider, der zweite Übergang die Denaturierung der N1-Domäne. Die thermisch-induzierten Übergänge der isolierten N1-Domänen des Phagen IF1 wurden anhand der CD-Signaländerung bei 222 nm gemessen. Der Übergang der isolierten fd-N1-Domänen wurde über die Änderung des CD-Signals bei 230 nm gemessen und gemäß eines Zweizustandsmodells ausgewertet. Zur Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde für die G3P\*-Varianten eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von 10000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> für N2 und für N1 1000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> angenommen, für die isolierten N2-Domänen wurden  $\Delta C_p$ -Werte von 8000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> und für die isolierten N1-Domänen 1000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> verwendet. Die Daten für WT fd G3P\*, isolierte N1 T13I und fd G3P\* IIHY wurden der Referenz<sup>121</sup> entnommen. Die Stabilitätsparameter von fd G3P\* IIHY G153D bzw. isolierter N1-Domäne wurden aus den Arbeiten<sup>150</sup> bzw.<sup>152</sup> erhalten. Die Daten von isolierter N2 Q129H wurden der Referenz<sup>151</sup> entnommen. Die Daten der isolierten fd-N1-Domäne bzw. isolierten IF1-N1-Domäne wurden den Arbeiten<sup>152</sup> und<sup>91</sup>. Die Werte für die Domänen des fd G3P\* T101I entstammen der Referenz<sup>79</sup>, die Daten der Variante fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta 6$  wurden Referenz<sup>80</sup> entnommen. Die Übergänge von 4  $\mu\text{M}$  Protein (1  $\mu\text{M}$  bei 210 nm) wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm, einer Heizrate von 60 °C h<sup>-1</sup> und einer Dämpfung von 8 s gemessen.

Während der Denaturierung der N2-Domäne des Wildtyp-Proteins sind die Entfaltung der Gelenkregion und die Dissoziation der Domänen N1 und N2 miteinander gekoppelt. Die Stabilität von N2 ist dementsprechend ein Maß für die Stärke der Domänenassoziation. In der Variante fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY sind günstige Interaktionen zwischen den Domänen nur schwach ausgebildet. Zwar liegt der Übergangsmittelpunkt mit 46,3 °C deutlich über denen der isolierten N2 Q129H (38,8 °C) bzw. N2 aus der Deletionsvariante fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta 6$  (36,7 °C), die Enthalpie der Entfaltung befindet sich jedoch mit 341 kJ mol<sup>-1</sup> im gleichen Bereich (Tabelle 3.4.1). Die relativ zu isolierter N2-Domäne erhöhte Stabilität der Chimäre ist folglich nicht auf die verstärkte Wechselwirkung zwischen den Domänen zurückzuführen. Im Gegensatz zu fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta 6$  ist in fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY mit dem

$\beta$ 6-Faltblattstrang auch der Austausch T101I enthalten. Im nativen G3P\* führt diese in der Gelenkregion lokalisierte Substitution zu einer Erhöhung des  $T_M$ -Wertes um mehr als 8 °C (Tabelle 3.4.1), wobei aufgrund des geringen Abstandes zur N1-Domäne von 4 Å vermutet wurde, dass hydrophobe Wechselwirkungen zu N1 dafür verantwortlich sind.<sup>121</sup> Zwar wird in der Chimäre der gedockte Zustand nicht eingenommen, es ist jedoch möglich, dass durch Interaktionen der Reste der flankierenden Gelenkregion die Enden des globulären Teils von N2 zusammengehalten und die Domäne dadurch entropisch stabilisiert wird.

Zusätzlich wurde wiederum die Stabilität gegenüber dem Denaturierungsmittel GdmCl untersucht. Dabei zeigte sich, dass in fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY die Änderung der Fluoreszenz sowohl nach Anregung bei 280 nm als auch 295 nm nicht selektiv für die Entfaltung der N2- bzw. N1-Domäne ist, obwohl in dieser Variante die gleiche Anzahl an Fluorophoren enthalten ist wie im fd G3P\* IIHY. Der Verlauf des Signals bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm konnte nicht ausgewertet werden. Die Daten aus dem biphasischen Übergang bei 325 nm nach Anregung bei 295 nm (Abbildung 10.1 im Anhang) sind in Tabelle 3.4.2 aufgelistet. Aufgrund der geringen Stabilitätsunterschiede sind die beiden Phasen nicht sehr gut voneinander getrennt. Da zusätzlich N2 im Vergleich zur Ausgangsvariante deutlich destabilisiert und daher die Basislinie des nativen Proteins schlecht definiert ist, sind die erhaltenen Parameter stark fehlerbehaftet. Wie bereits bei der thermischen Entfaltung beobachtet, ist die N2-Domäne in der Chimäre trotzdem leicht gegenüber der isolierten N2-Domäne stabilisiert.

Der  $[GdmCl]_m$ -Wert von isolierter IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> ist relativ zur isolierten IF1-N1-Domäne ebenfalls deutlich um 1,2 M GdmCl verringert (Tabelle 3.4.2). Der Übergangsmittelpunkt der N1-Domäne des fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY im Vergleich dazu wiederum geringfügig zu niedrigeren Denaturierungsmittelkonzentrationen verschoben, was sich mit den Ergebnissen der thermischen Entfaltung deckt.

Tabelle 3.4.2: Stabilitätsdaten von IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> und der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY aus GdmCl-induzierter Entfaltung.

Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
	$[GdmCl]_m$ (M)	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$[GdmCl]_m$ (M)	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
isolierte IF1-N1	-	-	-	3,6	7,8	29,0
isolierte IF1-N1 <sub>DDKTLD</sub>	-	-	-	2,4	6,5	15,0
fd G3P* IF1-N1 <sub>DDKTLD</sub> IHY	0,9	23,0	19,8	2,2	6,1	13,6
isolierte N2 Q129H	0,7	15,9	10,9	-	-	-
fd G3P* IIHY	2,5	14,9	37,2	3,2	8,9	28,6

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte  $[GdmCl]_m$ , die Kooperativitätsparameter  $m$  sowie die auf 0 M GdmCl extrapolierten freien Enthalpien der Entfaltung  $\Delta G$  bei 25 °C. Der Übergang von N2 im fd G3P\* bzw. isolierter N2 Q129H wurde anhand der Fluoreszenz bei 310 nm bzw. 340 nm (Anregung 280 nm) gemessen, der der N1-Domäne im fd G3P\* IIHY bei 360 nm (Anregung 295 nm) verfolgt. Der Verlauf der Entfaltung der isolierten N1-Domänen des Phagen IF1 wurde bei 325 nm (Anregung bei 280 nm) aufgenommen. Für beide Domänen erfolgte die Analyse der Daten nach einem Zweizustandsmodell. Die GdmCl-induzierte Entfaltung der Domänen der Chimäre wurde über die Fluoreszenz bei 325 nm (Anregung bei 295 nm) verfolgt. Der entsprechende Übergang wurde gemäß eines Dreizustandsmodells ausgewertet. Die Daten für die isolierte

IF1-N1-Domäne wurde Referenz<sup>91</sup> und die Parameter für fd G3P\* IHY der Referenz<sup>121</sup> entnommen. Die Daten isolierter N2 Q129H sind eine persönliche Mitteilung von Roman Jakob.

Um zu untersuchen, wie sich der Austausch der Schleife in IF1-N1 auf die Faltung des Proteins auswirkt, wurden die entsprechenden Ent- und Rückfaltungskinetiken gemessen (Abbildung 3.4.2). Aus dem Verlauf der entsprechenden Raten geht hervor, dass sich der Austausch der Schleifenregion auf beide Geschwindigkeitskonstanten  $k_{EF}$  und  $k_{RF}$  ungünstig auswirkt. Die Entfaltung von IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> ist gegenüber IF1-N1 achtfach beschleunigt, die Rückfaltung dagegen 2,7fach verlangsamt. Demnach wird nicht nur der entfaltete Zustand stabilisiert sondern gleichzeitig auch die gefaltete Form destabilisiert. Zusammen mit den unveränderten Kooperativitäten (Tabelle 10.2 im Anhang) bestätigt dies, dass in der gefalteten IF1-N1-Domäne durch die Substitution der Schleifensequenz lokal ungünstige Wechselwirkungen ausgebildet werden.

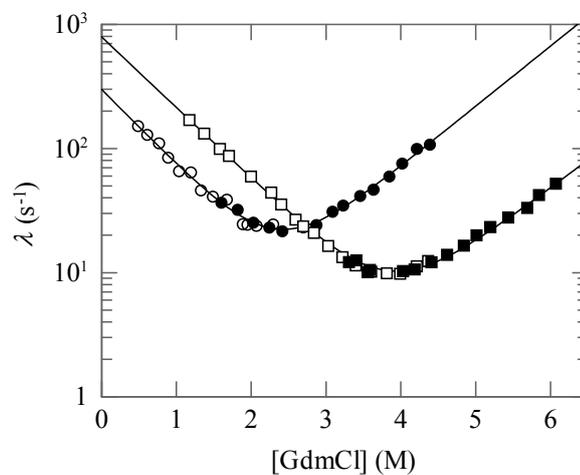


Abbildung 3.4.2: Chevron-Auftragung der Faltungs- und Entfaltungsraten von IF1-N1 und IF1-N1<sub>DDKTLD</sub>. Gezeigt sind die apparenten Rückfaltungs- (offene Symbole) und Entfaltungsraten (geschlossene Symbole) von isolierter IF1-N1 ( $\square$ ;  $\blacksquare$ ) und IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> ( $\circ$ ;  $\bullet$ ) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Angleich an die Datenpunkte gemäß eines Zweizustandsmodells. Die daraus erhaltenen thermodynamischen Parameter sind im Anhang in Tabelle 10.2 aufgelistet. Die entsprechenden Kinetiken wurden nach *stopped-flow*-Mischung anhand der Änderung der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 330 nm nach Anregung bei 295 nm mit 1  $\mu$ M Protein verfolgt. Alle Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 bei 25 °C durchgeführt. Daten der isolierten IF1-N1-Domäne wurden der Referenz<sup>91</sup> entnommen.

### 3.4.2 In der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY liegen die Domänen IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> und N2 in nicht assoziierter Form vor

Zur Analyse, wie stark die Wechselwirkungen durch den Austausch der modifizierten N1-Domäne verringert sind, wurde der Faltungsmechanismus der Variante fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY untersucht. Sowohl die Rückfaltungs- als auch die Entfaltungsraten von N1 der Chimäre ( $\triangle$ ;  $\blacktriangle$ , Abbildung 3.4.3) sind identisch zu denen der korrespondierenden isolierten N1-Domäne ( $\triangle$ ;  $\blacktriangle$ , Abbildung 3.4.3, Tabelle 10.2 im Anhang). Im Gegensatz zur stabilisierten Ausgangsvariante fd G3P\* IHY ist demnach die Entfaltung von N1 deutlich beschleunigt. Die Rückfaltung der N2-Domäne der Chimäre in die  $N^{trans}$ -Form ist geringfügig gegenüber der der isolierten N2-Domäne verlangsamt ( $\square$ ;  $\nabla$ , Abbildung 3.4.3). Die N2-Domäne wird folglich nur leicht durch das Zusammenhalten

der Enden stabilisiert und nicht wie im fd G3P\* IIHY durch die Einnahme des lose-assoziierten Zustandes ( $\square$ ;  $\square$ , Abbildung 3.4.3). Die Interaktionen zwischen den Domänen während der Faltung sind folglich nur sehr schwach ausgeprägt.

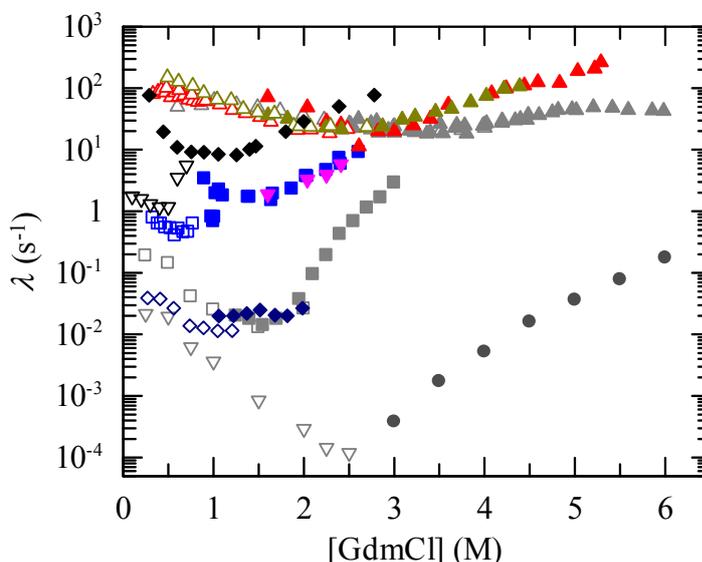


Abbildung 3.4.3: Analyse der Faltungs- und Entfaltungsraten der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY. Auftragung der apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von fd G3P\* IIHY (graue Symbole) und fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY (farbige Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die langsamen Entfaltungs- ( $\blacklozenge$ ) und Rückfaltungsraten ( $\diamond$ ) der N2-Domäne der Chimäre wurden nach manueller Mischung gemessen. Gezeigt sind außerdem die schnellen Rück- und Entfaltungsraten der N1-Domäne in der Chimäre ( $\triangle$ ;  $\blacktriangle$ ), die entsprechenden Raten der isolierten IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> ( $\triangle$ ;  $\blacktriangle$ ) und die konformationelle Faltung der jeweiligen  $U^{trans}$ -Spezies ( $\square$ ;  $\square$ ), ausgehend von entfaltetem Protein. Die Entfaltung der  $N_{cis}$ -Spezies aus dem nicht assoziierten Zustand ( $\blacksquare$ ) konnte bereits in Einzelmischexperimenten nach schneller Mischung detektiert werden. Die entsprechenden Raten wurden zusätzlich auch Anregung bei 295 nm anhand der Änderung der Fluoreszenz oberhalb von 340 nm erhalten ( $\blacktriangledown$ ). Die Entfaltung der N2-Domäne aus dem lose-assoziierten Zustand des fd G3P\* IIHY wurde ausgehend von vollständig entfaltetem Protein nach Rückfaltung für 180 s ( $\blacksquare$ ) in 0,5 M GdmCl und Sprung in Entfaltungsbedingungen gemessen. Die Entfaltungs- ( $\bullet$ ) und Rückfaltungsraten ( $\nabla$ ) des fd G3P\* IIHY nach manueller Mischung gemessen. Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind außerdem die Entfaltungsraten der N1-Domäne im ungedockten fd G3P\* IIHY ( $\blacktriangle$ ), deren Rückfaltung aus dem entfaltetem Zustand ( $\triangle$ ) und die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne Q129H ( $\blacklozenge$ ;  $\nabla$ ). Die Reaktionen der N1-Domänen nach schneller Mischung wurden anhand der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt, die der N2-Domänen oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm. Die Faltungsraten der N2-Domänen nach manueller Mischung wurden über die Messung der Fluoreszenz bei 310 nm erhalten. Die Daten von fd G3P\* IIHY wurden der Publikation<sup>122</sup> entnommen. Die Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 0,5 bzw. 1  $\mu$ M Protein bei 25 °C durchgeführt.

Nach manueller Mischung ist lediglich eine Rückfaltungsreaktion detektierbar, deren Rate unabhängig von der GdmCl-Konzentration ist ( $\diamond$ , Abbildung 3.4.3). Mit einer Zeitkonstante von 37 s (in 0,6 M GdmCl) liegt sie im Bereich der Isomerisierung von Pro161 (Abbildung 3.1.6, Kapitel 3.1.3). Während der Entfaltung kann nach manueller Mischung ebenfalls nur eine Reaktion detektiert werden, deren Zeitkonstante bei etwa 40 s liegt ( $\blacklozenge$ , Abbildung 3.4.3). Dem Verlauf nach gehen die Raten der Phase in die langsame, von Pro161 limitierte Rückfaltungsreaktion über. Oberhalb von 2,0 M GdmCl verliert die Entfaltungsreaktion ihre Amplitude. Ab dieser GdmCl-Konzentration findet demnach die konformationelle Entfaltung der N2-Domäne vollständig in der Totzeit der manuellen Mischung statt.

Nach *stopped-flow*-Mischung ergeben sich unterhalb von 3,0 M GdmCl biexponentielle Kinetiken, deren schnelle Reaktion die Entfaltung der N1-Domäne widerspiegelt (▲, Abbildung 3.4.3). Der Verlauf der resultierenden Raten stimmt, wie schon erwähnt, mit dem der isolierten IF1-N1<sub>DDTKLD</sub> überein (▲, Abbildung 3.4.3). Die langsame Phase reflektiert die Entfaltung der N2-Domäne. Sie wird sowohl nach Anregung bei 280 nm als auch bei 295 nm beobachtet (■; ▼, Abbildung 3.4.3). Eine Kopplung zwischen den Domänen, die z.B. durch die Denaturierung der N1-Domäne verlangsamt wird, ist demnach nicht beobachtbar.

Trotz der stabilisierenden Substitutionen T101I und D209Y in der Gelenkregion gehen die beiden Domänen der Chimäre während der Faltung weder in den gedockten noch in den lose-assoziierten Zustand über. N1 und N2 liegen vielmehr in einer nicht assoziierten Form vor, die dem langlebigen Faltungsintermediat des Wildtyp-Proteins entspricht. Die Vermutung liegt daher nahe, dass sich IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D in der Chimäre aufgrund lokaler Sequenzunterschiede nicht in der Weise anordnen kann wie die fd-N1-Domäne und dadurch die Einnahme der gedockten Form nicht möglich ist.

In G3P des fd Phagen wird der assoziierte Zustand mit *cis*-Pro213 durch die Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen Resten der Gelenkregion und dem unteren Teil der N1-Domäne stark stabilisiert.<sup>62</sup> Daran beteiligt ist, wie bereits erwähnt, unter anderem Gln52 in der N1-Domäne, das zu Gln212 zwei Wasserstoffbrücken ausbildet.<sup>120</sup> In der Struktur der isolierten IF1-N1-Domäne befindet sich an dieser Position ein Serinrest, der folglich die Wechselwirkungen nicht im gleichen Maße aufrechterhalten kann. Desweiteren trägt Serinrest 16 zur Stabilisierung der assoziierten Form des fd G3P\* bei. Der Rest bildet über sein Carbonylsauerstoffatom mit Val215 und seine Hydroxylgruppe mit Pro211 jeweils eine Wasserstoffbrücke aus. In IF1-N1 ist an der entsprechenden Position ein Threoninrest lokalisiert, der sich eventuell aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe nicht optimal positionieren kann. Trotz der guten Übereinstimmung des Proteinrückgrates der Strukturen der beiden N1-Domänen gibt es demnach lokale Unterschiede, die vermutlich eine große Auswirkung auf die Stabilität des gedockten Zustandes haben. Dieser Effekt wird wahrscheinlich noch verstärkt durch die Anhäufung von Prolinresten in der Gelenkregion (Pro211, Pro213, Pro214, Pro96, Pro98), die die Flexibilität der Gelenkregion herabsetzen, weshalb alternative Interaktionspartner in der N1-Domäne weniger gut toleriert werden.

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob zumindest die Interaktion der verlängerten Schleife 1 der N1-Domäne der Chimäre zur Stabilisierung der N2-Domäne beiträgt. Anhand der Variante fd G3P\* EGDS konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit der Schleifenregion wichtig ist für Stabilisierung des *trans*-Konformers von N2, das dadurch mit der gleichen Geschwindigkeit entfaltet wie die *cis*-Form (Kapitel 3.3.2). Um zu untersuchen, ob sich die Entfaltungsschritte der *cis*- und *trans*-Spezies der N2-Domäne der Chimäre unterscheiden, wurde die Entfaltung der Domäne mit *trans*-Pro161 nach kurzer Rückfaltung für 1 s in 0,35 M GdmCl verfolgt (◆, Abbildung 3.4.4).

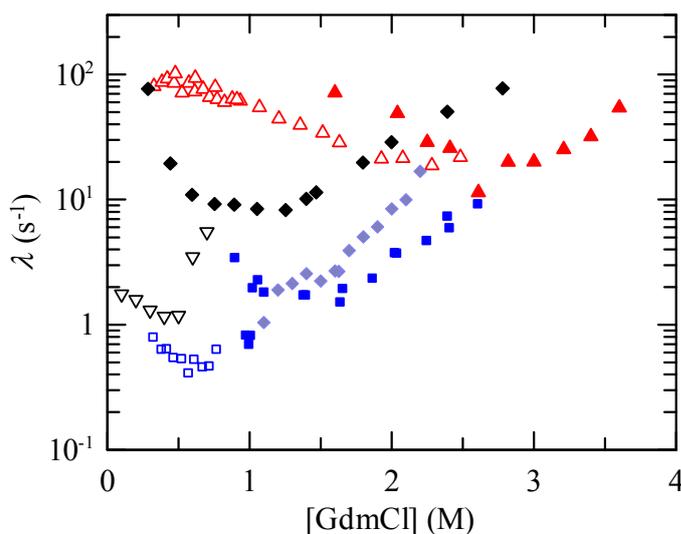


Abbildung 3.4.4: Faltungs- und Entfaltungsraten des fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY nach schneller Mischung. Auftragung der apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) der Domänen des fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Gezeigt sind die schnellen Rück- und Entfaltungsraten der N1-Domäne in der Chimäre ( $\Delta$ ;  $\blacktriangle$ ) und die konformationelle Faltung der  $U^{trans}$ -Spezies ( $\square$ ) ausgehend von entfaltetem Protein. Die Entfaltung der N2-Domäne aus dem nativen Zustand ( $\blacksquare$ ) wurde in Einzelmischexperimenten nach schneller Mischung detektiert. Die Denaturierung der  $N^{trans}$ -Form der Chimäre wurden nach Rückfaltung für 1 s in 0,35 M GdmCl und erneuter Überführung in Entfaltungsbedingungen beobachtet ( $\blacklozenge$ ). Zu Vergleichszwecken aufgetragen sind außerdem die Ent- und Rückfaltungsraten der isolierten N2-Domäne Q129H ( $\blacklozenge$ ;  $\nabla$ ). Die Reaktionen der N1-Domäne nach schneller Mischung wurden anhand der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt, die der N2-Domäne oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm. Die Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 0,5 bzw. 1  $\mu$ M Protein bei 25 °C durchgeführt.

Tatsächlich ist die Geschwindigkeit der Entfaltung der  $N^{trans}$ -Form ( $\blacklozenge$ , Abbildung 3.4.4) gegenüber dem Entfaltungsast der N2-Domäne ausgehend von nativem fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY leicht beschleunigt ( $\blacksquare$ , Abbildung 3.4.4). Dies zeigt, dass analog zur Variante fd G3P\* EGDS während der Faltung des globulären Teils von N2 keine günstigen Wechselwirkungen zu der verlängerten Schleifenregion in der N1-Domäne ausgebildet werden. Der Austausch der Schleife und die Anwesenheit der Gelenkregion reichen demnach nicht aus, damit IF1-N1 und die N2-Domäne des fd G3P miteinander assoziieren können.

### 3.4.3 Durch die Gegenwart der N2-Domäne wird die Affinität der IF1-N1-Domäne in der Chimäre für TolAC-AEDANS nicht beeinflusst

Durch die Substitution der N1-Domäne kann weder der gedockte noch der lose-assoziierte Zustand eingenommen werden. In diesem Fall sollte die Affinität der N1-Domäne der Chimäre relativ zur isolierten Form unverändert sein. Tatsächlich ist der  $K_D$ -Wert von fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY mit 4,7  $\mu$ M nur unwesentlich gegenüber IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D ( $K_D = 3,7 \mu$ M) erhöht (Tabelle 3.4.3). Der Unterschied fällt bei den über die Auftragung der Raten erhaltenen Dissoziationskonstanten größer aus (6,5  $\mu$ M und 4,4  $\mu$ M), was auf die geringfügig verringerte Assoziationsrate und damit vermutlich etwas schlechtere Zugänglichkeit von N1 in der Chimäre zurückgeführt werden kann.

Der Komplex aus fd N1 bzw. IF1-N1 und TolAC wird unter anderem durch drei Salzbrücken stabilisiert. Zwei der drei wechselwirkenden Reste von TolAC, Arg158 und Asp210, besitzen mit Arg29 (fd-N1) bzw. Arg27 (IF1-N1) und Glu50 bzw. Asp48 homologe Interaktionspartner auf N1 (Abbildung 3.4.5). Die Salzbrücke ausgehend von Lys212 wird dagegen, wie bereits erwähnt, in IF1-N1 zu Glu37 ausgebildet, während in der N1-Domäne des fd Phagen mit Asp28 der letzte Rest der Schleifenregion an der Interaktion beteiligt ist.<sup>91</sup>

Tabelle 3.4.3: Parameter der Interaktion von TolAC-AEDANS mit verschiedenen IF1-G3P\*-Varianten.

Variante	[NaCl] (M)	$k_{on}$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{off}/k_{on}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
Isolierte IF1-N1	0	$0,24 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,01$	4,4	$3,3 \pm 0,1$
	1	$0,22 \pm 0,01$	$1,23 \pm 0,02$	5,6	$4,5 \pm 0,1$
Isolierte IF1-N1 E37N	0	$0,23 \pm 0,01$	$1,91 \pm 0,01$	8,4	$7,2 \pm 0,7$
Isolierte IF1-N1 <sub>DDKTLD</sub> E37N	0	$0,32 \pm 0,01$	$1,96 \pm 0,02$	6,3	$5,3 \pm 0,2$
Isolierte IF1-N1 <sub>DDKTLD</sub>	0	$0,4 \pm 0,01$	$1,74 \pm 0,01$	4,4	$3,7 \pm 0,1$
	0,5	$0,37 \pm 0,01$	$1,71 \pm 0,01$	4,6	$3,0 \pm 0,3$
	1	$0,39 \pm 0,01$	$1,55 \pm 0,01$	4,0	$3,6 \pm 0,2$
fd G3P* IF1-N1 <sub>DDKTLD</sub> IHY	0	$0,26 \pm 0,01$	$1,68 \pm 0,04$	6,5	$4,7 \pm 0,2$
	0,5	$0,15 \pm 0,01$	$1,57 \pm 0,01$	10,5	$7,7 \pm 0,3$
	1	$0,11 \pm 0,01$	$1,44 \pm 0,01$	13,1	$11,4 \pm 0,2$

Angegeben sind die aus der Analyse der Amplituden mittels Gleichung 43 erhaltenen  $K_D$ -Werte sowie die mikroskopischen Raten  $k_{off}$  und  $k_{on}$  aus der Auswertung der apparenten Assoziationsraten. Deren Quotient ergibt ebenfalls die Dissoziationskonstante des Komplexes aus der jeweiligen N1-Domäne und  $0,2 \mu\text{M}$  TolAC-AEDANS. Die Daten von IF1-N1 in Abwesenheit bzw. in 1 M NaCl wurden der Masterarbeit von Stefanie Hofmann entnommen.<sup>169</sup> Die Messungen erfolgten in  $0,1 \text{ M}$  KP-Puffer, pH 7,0 und den angegebenen Salzkonzentrationen bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

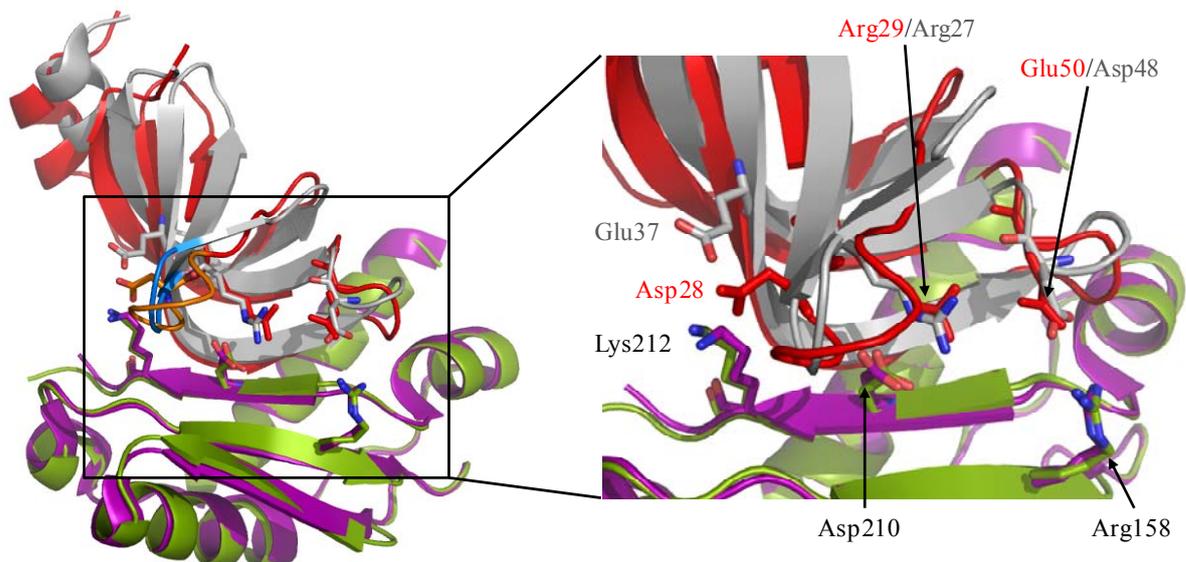


Abbildung 3.4.5: Überlagerung der Strukturen der Komplexe aus IF1-N1 und TolAC bzw. fd-N1 und TolAC. Gezeigt sind die Strukturen von TolAC (grün) im Komplex mit fd-N1 (rot, PDB-Eintrag 1TOL<sup>81</sup>) und TolAC im Komplex mit IF1-N1 (violett bzw. grau; PDB-Eintrag 2X9A<sup>91</sup>). Als Stäbchen-Modelle dargestellt sind die in der fd-N1-Domäne enthaltenen Reste Asp28, Arg29 und Leu27, die Reste Arg27, Glu37 und Asp48 der IF1-N1-Domäne sowie die Reste Arg158, Asp210 und Lys212 von TolAC. Die die Reste 23 bis 26 bzw. 28 umfassende homologe Schleifenstruktur ist in der linken Abbildung hellblau (IF1-N1) bzw. orange (fd G3P\*) eingefärbt. Die Abbildung wurde mit dem Programm Pymol<sup>63</sup> erstellt.

Durch die Substitution der Schleifensequenz enthält IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> mit Asp28 neben Glu37 einen zusätzlichen potenziellen Interaktionspartner für Lys212 im TolAC, trotzdem ist die Affinität dieser Variante für TolAC im Vergleich zu IF1-N1 nicht verbessert (Tabelle 3.4.3). Unterschiede ergeben sich allerdings bei den Werten für  $k_{on}$  und  $k_{off}$ , die für IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> jeweils leicht erhöht sind. Demnach wird der Komplex zwar schneller gebildet, ist jedoch gleichzeitig weniger stabil.

Der Austausch des Glu37 gegen Glutamin in der isolierten IF1-N1 führt zu einer zweifachen Erhöhung des  $K_D$ -Wertes, was hauptsächlich in der Beschleunigung der Dissoziation begründet liegt (Tabelle 3.4.3). Dieser Effekt kann jedoch zumindest teilweise durch die weitere Substitution der Schleifenregion kompensiert werden. Im Vergleich zu isolierter IF1-N1 E37N ( $K_D = 7,2 \mu\text{M}$ ) ist die Dissoziationskonstante der Variante IF1-N1<sub>DDTKLD</sub> E37N nur leicht auf  $5,3 \mu\text{M}$  verringert (Tabelle 3.4.3). Glu37 hat folglich keinen großen Einfluss auf die Affinität der N1-Domäne für TolAC.

Wie zusätzlich die Analyse der Bindungsaffinität einer TolAC-Variante, in der unter anderem Lys212 gegen Aspartat ausgetauscht wurde, gegenüber fd-N1 bzw. IF1-N1 gezeigt hat, scheint der Einfluss der einzelnen Salzbrücken auf die Stabilität des Komplexes relativ gering zu sein. In beiden Fällen waren die  $K_D$ -Werte zwar erhöht, lagen jedoch jeweils in der gleichen Größenordnung (Daten nicht gezeigt). Grund dafür ist vermutlich das zusätzlich über Wasserstoffbrücken zusammengehaltene, intermolekulare  $\beta$ -Faltblatt zwischen den Interaktionspartnern, welches durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird (Abbildung 3.4.5). Folglich hat auch die Erhöhung der Salzkonzentration bis auf 1 M NaCl kaum eine Auswirkung auf die Affinität der isolierten IF1-N1<sub>DDTKLD</sub> bzw. IF1-N1 für TolAC (Tabelle 3.4.3).

Interessanterweise nimmt dagegen in 1 M NaCl die Dissoziationskonstante der Chimäre deutlich von  $3,6$  auf mehr als  $11 \mu\text{M}$  zu, was ausschließlich an der deutlich schlechteren Assoziationsrate liegt (Tabelle 3.4.3). Möglicherweise ist die Bindungsfähigkeit herabgesetzt, da die Interaktionen zwischen den Domänen der Chimäre in 1 M Salz verbessert sind und das Protein dadurch stärker geschlossen vorliegt. In diesem Fall müsste sich die Verbesserung der Wechselwirkungen zwischen IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> und N2 auch in ihrem  $T_M$ -Wert und vor allem der Enthalpie bemerkbar machen. Tatsächlich ergibt sich mit steigender NaCl-Konzentration eine Zunahme des  $\Delta H$ -Wertes, allerdings ist diese Salzabhängigkeit auch für die isolierte N2 Q129H beobachtbar (Tabelle 3.4.4). Während in 1 M NaCl der Übergangsmittelpunkt dieses Proteins geringfügig zu höheren Werten verschoben ist, sind die  $T_M$ -Werte beider Domänen im fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY sogar leicht verringert, was gegen eine stärkere Assemblierung der Domänen in diesem Konstrukt spricht.

Tabelle 3.4.4: Thermische Stabilitätsdaten der isolierten N2-Domäne Q129H bzw. N1 und N2 in der Chimäre.

Variante	[NaCl] (M)	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
		$T_M$ (°C)	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{45^\circ\text{C}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$T_M$ (°C)	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{55^\circ\text{C}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
isolierte N2 Q129H	0	38,8	344	-7,4	-	-	-
	0,5	38,0	346	-8,7	-	-	-
	1	39,6	392	-7,2	-	-	-
fd G3P* IF1-N1 <sub>DDKTL</sub> D IHY	0	46,3	341	1,4	52,7	222	-1,6
	0,5	43,2	345	-2,0	51,0	193	-2,4
	1	44,8	391	-0,2	50,5	192	-2,7

Angegeben sind für die beiden Proteine die Schmelztemperaturen  $T_M$ , die Enthalpien der jeweiligen Entfaltungsreaktion am  $T_M$  ( $\Delta H$ ) und die freien Enthalpien der Entfaltung  $\Delta G^{45^\circ\text{C}}$  und  $\Delta G^{55^\circ\text{C}}$  bei 45 °C bzw. 55 °C. Die Übergänge der N2-Domänen, welche über die Änderung des CD-Signals bei 210 nm verfolgt wurden, wurden gemäß eines Zweizustandsmodells analysiert. Der Verlauf der Entfaltung der N1-Domäne wurde anhand der Änderung des CD-Signals bei 230 nm verfolgt und ebenfalls anhand eines Zweizustandsmodells analysiert. Zur Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde für N2 in der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von 10000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> für N2 und für N1 1000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> angenommen, für die isolierte N2-Domäne Q129H wurde ein  $\Delta C_p$ -Wert von 8000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> verwendet. Die Daten von isolierter N2 Q129H in Abwesenheit von NaCl wurden der Referenz<sup>151</sup> entnommen. Die Messungen erfolgten in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm und einer Heizrate von 60 °C h<sup>-1</sup>.

Da das Denaturierungsmittel GdmCl ein Salz ist, finden die Ent- und Rückfaltung von Proteinen in GdmCl immer unter Hochsalzbedingungen statt. Um zu überprüfen, ob die Ionenkonzentration einen Einfluss auf den Faltungsmechanismus der Chimäre hat, wurden daher deren Ent- und Rückfaltungskinetiken zusätzlich im unpolaren Denaturierungsmittel Harnstoff bei 15 °C untersucht. Unter diesen Bedingungen ergeben sich sowohl nach Anregung bei 280 als auch bei 295 nm monophasische Gleichgewichtsübergänge, die die Denaturierung der N2-Domäne reflektieren. Die N1-Domäne liegt trotz ihrer nur geringfügig höheren Stabilität permanent in gefalteter Form vor. Wie auch schon bei der Entfaltung durch GdmCl beobachtet, ist der Übergangsmittelpunkt der N2-Domäne des fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY mit 4,1 M Harnstoff deutlich gegenüber isolierter N2-Domäne Q129H erhöht ( $[\text{Harnstoff}]_m = 2,6 \text{ M}$ ; Tabelle 10.3 im Anhang).

Die Kombination aus verringerter Messtemperatur und dem im Vergleich zu GdmCl schwächeren Denaturierungsmittel Harnstoff macht es möglich, die Faltungskinetiken der N2-Domäne selektiv zu messen und so sowohl den Chevron der *cis*-Pro161-Spezies als auch den der labileren *trans*-Form der N2-Domäne Q129H aufzulösen (Abbildung 3.4.6). Wie bereits erwähnt unterscheiden sich bei der isolierten N2-Domäne die beiden Konformere mit *cis*- bzw. *trans*-Pro161 lediglich in ihrer Rückfaltungsgeschwindigkeit, ihre Entfaltungsraten folgen dagegen dem gleichen Chevronast.

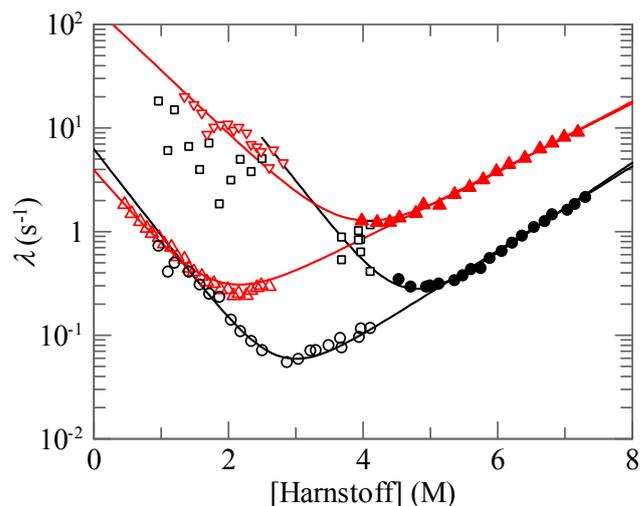


Abbildung 3.4.6: Analyse der Faltungsmechanismen isolierter N2 Q129H und fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY. Aufgetragen sind die apparenten Rückfaltungs- (offene Symbole) und Entfaltungsraten (geschlossene Symbole) von isolierter N2-Domäne Q129H (rote Symbole) und N2 im fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY (schwarze Symbole) in Abhängigkeit von der Harnstoff-Konzentration bei 15 °C. Gezeigt sind die konformationelle Rückfaltung der *cis*- (▽;□) bzw. *trans*-Spezies von N2 Q129H (△;○) sowie deren Entfaltung (▲;●), die nach *stopped-flow*-Mischung anhand der Änderung der Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen wurden. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Angleich gemäß eines Zweizustandsmodells an die Datenpunkte. Die Daten der isolierten N2-Domäne Q129H wurden der Doktorarbeit von Roman Jakob entnommen.<sup>94</sup> Alle Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 0,5 bzw. 1 μM Protein durchgeführt.

Analog zur Denaturierung in GdmCl sind die Ent- und Rückfaltung der labileren N2 in fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY schnelle Reaktionen, die nach *stopped-flow*-Mischung gemessen werden. Die Rückfaltungsraten der *cis*- (□) bzw. *trans*-Form der N2-Domäne (○, Abbildung 3.4.6) in der Chimäre stimmen jeweils mit den Raten der entsprechenden Spezies der isolierten N2 Q129H überein (△;▽, Abbildung 3.4.6). Die Daten von N2 mit *cis*-Pro161 sind allerdings nicht sehr genau, da die entsprechende Phase während der Rückfaltung nur eine geringe Amplitude besitzt.<sup>151</sup> Die Entfaltung der beiden N2-Spezies in der Chimäre (●, Abbildung 3.4.6) ist im Vergleich zur der der isolierten N2-Domäne Q129H (▲, Abbildung 3.4.6) deutlich verlangsamt, weshalb die Chevronminima der *cis*- und *trans*-Spezies von fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY zu höheren Harnstoffkonzentrationen verschoben sind. Der stabilisierende Effekt ist vermutlich wieder auf das Zusammenhalten der Enden der gefalteten N2-Domäne zurückzuführen, das sich bei der Entfaltung bemerkbar macht. Auffällig ist jedoch, dass hier die  $k_{EF}$ -Werte der *cis*- und *trans*-Form der Chimäre übereinstimmen, während der über Doppelmischexperimente in GdmCl aufgelöste Entfaltungssast der labileren *trans*-Spezies zu niedrigeren GdmCl-Konzentrationen verschoben ist (◆;■, Abbildung 3.4.4). Der Grund für diesen Unterschied ist nicht bekannt. Da GdmCl im Gegensatz zu Harnstoff ein Salz ist, liegt die Vermutung nahe, dass die während der Rückfaltung des globulären Teils von N2 in GdmCl ebenfalls enthaltene hohe Konzentration an Chloridionen z.B. die Ausbildung von günstigen Interaktionen zwischen der verlängerten Schleifenregion und der labileren Domäne verhindern.

Auch in 1 M NaCl und Harnstoff stimmen die Entfaltungssäste der beiden Konformere in der Chimäre überein (●, Abbildung 3.4.7). Lediglich die Rückfaltung der beiden Spezies ist

leicht beschleunigt, wodurch die Chevronminima jeweils zusätzlich um mehr als 0,4 M zu höheren Harnstoffkonzentrationen verschoben sind. Ein ähnlicher Effekt ergibt sich auch für die isolierte N2-Domäne Q129H, deren Rückfaltungsast in 1 M NaCl dem von N2 in der Chimäre unter den gleichen Bedingungen entspricht.

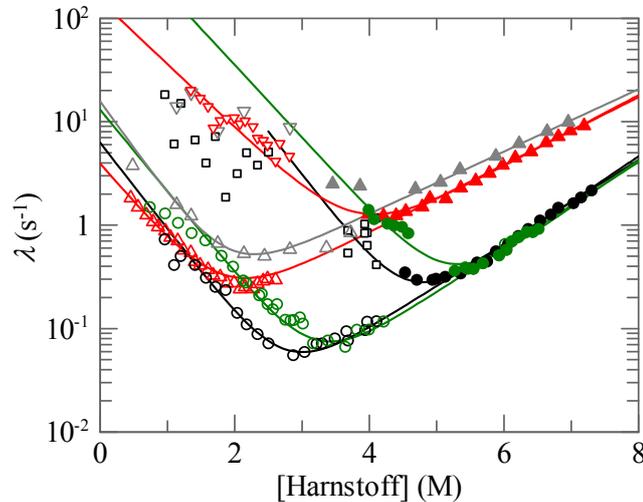


Abbildung 3.4.7: Salzabhängigkeit der Faltung von isolierter N2 Q129H und fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY. Aufgetragen sind die apparenten Rückfaltungs- (offene Symbole) und Entfaltungsraten (geschlossene Symbole) von isolierter N2-Domäne Q129H (rote bzw. graue Symbole) und N2 im fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY (grüne bzw. schwarze Symbole) in Abhängigkeit von der Harnstoff-Konzentration bei 15 °C in 1 M NaCl. Gezeigt sind die konformationelle Rückfaltung der *cis*- (▽) bzw. *trans*-Spezies von N2 (△;○), sowie deren Entfaltung (▲;●), die nach *stopped-flow*-Mischung anhand der Änderung der Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen wurden. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Angleich gemäß eines Zweizustandsmodells an die Datenpunkte. Zum Vergleich sind außerdem die Raten der konformationellen Rückfaltung der *cis*- (▽;□) bzw. *trans*-Spezies (△;○) von isolierter N2-Domäne (Dreiecke) bzw. N2 in fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY (Kreise, Vierecke) sowie deren Entfaltung (▲;●) in 0 M NaCl gezeigt. Die Daten der isolierten N2-Domäne Q129H in Abwesenheit von 1 M NaCl wurden der Doktorarbeit von Roman Jakob entnommen.<sup>94</sup> Die Messungen wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 0,5 bzw. 1 μM Protein durchgeführt.

Durch die Verwendung des Denaturierungsmittels Harnstoff war die selektive Analyse der Faltung von N2 in der Chimäre möglich. Dabei hat sich gezeigt, dass diese Domäne im fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY geringfügig gegenüber der entsprechenden isolierten N2-Domäne stabilisiert ist. Dass die Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, wie anhand der  $K_D$ -Werte vermutet, zu einer Verbesserung der Domäneninteraktion führt, konnte folglich nicht verifiziert werden. Durch das Salz wird die Rückfaltung von N2 beschleunigt, egal ob diese im G3P\* oder isolierter Form vorliegt. Zusätzlich dazu sind nach manueller Mischung neben der Isomerisierung von Pro161 keine weiteren Reaktionen detektierbar, die die Assemblierung der Domänen widerspiegeln (Daten nicht gezeigt). Trotz des zusätzlichen Austausches der Schleifenregion reicht die strukturelle Ähnlichkeit von IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> demnach nicht aus, um die N1-Domäne des fd-Phagen funktionell vollständig zu ersetzen. Innerhalb des Konstrukts ist sie zwar immer noch in der Lage mit TolAC zu interagieren, die Assoziation mit N2, die zu deren starker Stabilisierung führt, ist jedoch vermutlich aufgrund lokaler sterischer Hinderung nicht möglich.

### 3.5 Die Bedeutung des distalen Serin-Glycin-reichen Linkers für die Stabilität und Funktionalität des fd G3P

Die Funktion der beiden N-terminalen Domänen und vor allem der Gelenkregion des fd G3P während der ersten Schritte der Infektion sind sehr gut untersucht.<sup>62; 96; 97</sup> Über die Rolle der beiden Serin-Glycin-reichen Linker, die N1, N2 und die C-terminale (CT) Domäne des G3P verbinden, ist dagegen wenig bekannt. Sowohl der distale erste Linkerbereich (AS 68-86), als auch der proximale zweite (AS 234-272) besteht aus sich wiederholenden Tetra- (GGGS) bzw. Pentapeptideinheiten (EGGGS) (Abbildung 3.5.1).<sup>59; 170</sup> Es wird vermutet, dass letzterer den drei Domänen die für die Infektion und spätere Assemblierung des Phagen nötige Flexibilität verleiht.<sup>124</sup> Über die Sekundärstruktur des zweiten Linkers sind keine Informationen vorhanden. In den zwei Kristallstrukturen der beiden N-terminalen Domänen, die unter anderem über den distalen Linker verknüpft sind, ist dieser jeweils nicht aufgelöst, was auf den hohen Glycin-Gehalt und die damit verbundene hohe Flexibilität des Bereiches zurückgeführt wird (Abbildung 3.5.1a).<sup>60</sup>

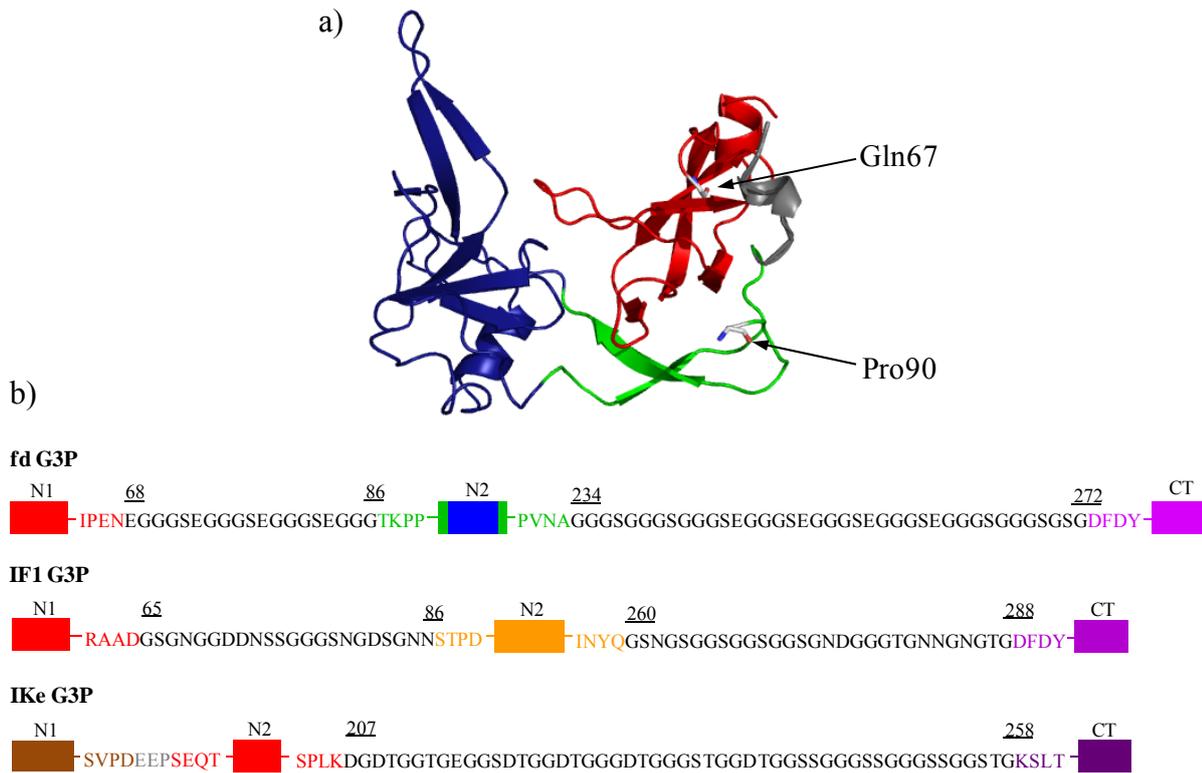


Abbildung 3.5.1: a) Kristallstruktur des N1N2-Fragments von WT fd G3P (G3P\*). Die den distalen Linker flankierenden Reste Gln67 und Pro90 sind als Stäbchen-Modelle gezeigt. Die N1-Domäne ist in rot, der globuläre Teil von N2 in blau und die Gelenkregion in grün dargestellt. Die Abbildung wurde anhand der PDB-Struktur 2G3P<sup>60</sup> mit dem Programm Pymol<sup>63</sup> erstellt. b) Schematische Darstellung der Domänenstruktur des G3P der Phagen fd, IF1 und IKe. Die untereinander funktionell homologen TolAC-Bindungsdomänen sind in rot, die jeweiligen Pilusbindungsdomänen in blau, orange bzw. braun und die CT-Domänen in violett gezeigt. In grün sind die Gelenkregion und in schwarz die AS-Sequenzen der Glycin-reichen Linker dargestellt. Die farbigen Buchstaben vor bzw. nach den Linkerbereichen gehören zu den entsprechend markierten Domänen. N1 und N2: N-terminale Domänen 1 und 2; CT: C-terminale Domäne.

Das G3P des Phagen IF1 besitzt keine Gelenkregion, allerdings finden sich zwischen den einzelnen Domänen analog zum fd G3P glycinhaltige Linkersequenzen (Abbildung 3.5.1b).<sup>88</sup> Die distalen Bereiche weisen dabei eine Ähnlichkeit von 36 % auf, der Wert für die proximalen Linker liegt bei 60 %. Im G3P des filamentösen Phagen IKe sind die Funktionen von N1 und N2 vertauscht, wobei die beiden Domänen lediglich durch einen kurzen Linker getrennt sind. Der Verbindungsbereich zwischen der TolAC-Bindungsdomäne (hier N2) und der CT-Domäne enthält dagegen ebenfalls eine glycinreiche Sequenz, die zu 55 % Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Bereich des WT fd G3P zeigt (Abbildung 3.5.1b).<sup>171</sup> Untersuchungen verkürzter Phagenvarianten haben dabei gezeigt, dass diese Region des IKe G3P vermutlich einen günstigen Einfluss auf die Infektiosität des Phagen hat.<sup>92</sup>

Deletionsanalysen mit plasmidexprimierten fd G3P-Varianten, die in das Periplasma exportiert wurden, deuten zudem darauf hin, dass der distale Linker einen Einfluss auf die Toleranz der Wirtszelle gegenüber verschiedenen Colicinen und die Infektion durch andere Phagen hat.<sup>51; 59</sup> Die Arbeitsgruppe um Carl Borrebaeck konnte außerdem zeigen, dass ein fd Phage, dessen G3P lediglich die N1-Domäne, den distalen Linker sowie die CT-Domäne enthält, trotz des Fehlens der Pilus-Bindungsdomäne N2 pilushaltige Zellen ähnlich gut infiziert wie der Ausgangsphage.<sup>170</sup> Da Phagen mit verkürztem G3P bestehend aus CT-Domäne und N1 ohne distalen Linker F<sup>+</sup>-Zellen nicht infizieren können<sup>124</sup> schlussfolgerten sie, dass mit der ersten Serin-Glycin-reichen Region neben der N2-Domäne ein weiterer Interaktionspartner des F-Pilus existiert.

Interessanterweise ist mit dem in der vorliegenden Arbeit als Referenz verwendeten Phagen fd ΔN2 keine Infektion pilushaltiger Zellen beobachtbar, obwohl sein G3P zwischen N1 und CT-Domäne den zum distalen Linker analogen zweiten Serin-Glycin-reichen Bereich enthält (Kapitel 3.2.5). Im Folgenden wurde deshalb untersucht, inwieweit der erste Linkerbereich die Funktionalität des WT fd G3P und damit den Infektionsmechanismus des Phagen beeinflusst. Dazu wurden zwei Deletionsvarianten hergestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Abstand zwischen den beiden in der Kristallstruktur noch bzw. wieder aufgelösten AS Asn67 und Pro90 (Abbildung 3.5.1a) von ca. 16 Å durch eine ausreichend hohe Anzahl an Linker-AS überbrückt wird.<sup>59; 60</sup> In den beiden resultierenden Varianten fd G3P\* GG und fd G3P\* GSEG sind die AS-Bereiche 71-86 bzw. 69-70 zusammen mit 75-86 deletiert, die entsprechenden Linkerregionen haben damit die Sequenzen EGGTKP (fd G3P\* GG) bzw. EGSEGTKP (fd G3P\* GSEG, Abbildung 3.5.1b).

### **3.5.1 Die Verkürzung des distalen Linkerbereiches hat keinen Einfluss auf die Stabilität und Faltung der N-terminalen Domänen des WT fd G3P\***

Die thermodynamische Stabilität der beiden Proteine fd G3P\* GG und fd G3P\* GSEG wurde zunächst mittels thermisch-induzierter Entfaltung untersucht. Anhand des CD-Signals bei 230 nm wurde sowohl die an die Dissoziation der Domänen gekoppelte Entfaltung von N2 als auch die Denaturierung der N1-Domäne verfolgt. Die aus der Auswertung der Daten gemäß

eines Dreizustandsmodells erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.5.1 gezeigt.

Tabelle 3.5.1: Stabilitätsdaten von WT fd G3P\* und den Deletionsvarianten fd G3P\* GG bzw. fd G3P\* GSEG aus deren thermisch-induzierter Entfaltung.

Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
	$T_{M1}$	$\Delta H$	$\Delta G^{45^\circ\text{C}}$	$T_{M2}$	$\Delta H$	$\Delta G^{60^\circ\text{C}}$
	(°C)	(kJ mol <sup>-1</sup> )	(kJ mol <sup>-1</sup> )	(°C)	(kJ mol <sup>-1</sup> )	(kJ mol <sup>-1</sup> )
WT fd G3P*	48,0	417	3,7	60,2	229	0,1
fd G3P* GG	47,3	423	3,0	58,9	191	-0,6
fd G3P* GSEG	48,6	488	5,3	58,6	208	-0,9

Angegeben sind für die Varianten die Schmelztemperaturen  $T_M$ , die Enthalpien der jeweiligen Entfaltungsreaktion am  $T_M$  ( $\Delta H$ ) und die freien Enthalpien der Entfaltung  $\Delta G^{45^\circ\text{C}}$  und  $\Delta G^{60^\circ\text{C}}$  bei 45 °C bzw. 60 °C. Die Daten für die beiden Domänen wurden nach Auswertung des biphasischen Entfaltungsübergangs, der anhand des CD-Signals bei 230 nm gemessen wurde, gemäß eines Dreizustandsmodells erhalten. Der erste Übergang ( $T_{M1}$ ) spiegelt die Entfaltung der N2-Domäne sowie die Dissoziation der Domänen wider, der zweite Übergang ( $T_{M2}$ ) die Denaturierung der N1-Domäne. Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von 10000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> für N2 und für N1 von 1000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> angenommen. Die Übergänge von 4 µM Protein wurden in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm, einer Heizrate von 60 °C h<sup>-1</sup> und einer Dämpfung von 8 s gemessen. Die Daten für das WT fd G3P\* wurden der Referenz<sup>121</sup> entnommen.

Sowohl im fd G3P\* GG als auch in der Variante fd G3P\* GSEG sind die Stabilitäten der Domänen durch die Deletion der Linkerregion fast nicht beeinflusst. Beide Proteine können demnach trotz verkürztem Linker den gedockten, inaktiven Zustand einnehmen, in dem beide Domänen über die Gelenkregion miteinander interagieren. Zudem sind die Enthalpien der Domänen im Rahmen der Genauigkeit der Auswertung relativ zu denen des WT fd G3P\* unverändert. Dies bestätigt, dass es sich bei dem entfernten AS-Bereich um eine im nativen Protein unstrukturierte und flexible Region handelt, die bei der Entfaltung des G3P\* keinen Beitrag zu den  $\Delta H$ -Werten liefert. Bei der verkürzten Variante fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta 6$  führte dagegen die Deletion des, die beiden Domänen N1 und N2 verbindenden, Faltblattstranges  $\beta 6$  zu deren Entkopplung und somit zur deutlichen Destabilisierung von N2 (Kapitel 3.2.3).<sup>80</sup> Dies bestätigt, dass für die Assemblierung der N-terminalen Domänen die Strukturierung der Gelenkregion und nicht die Flexibilität zwischen den Domänen von entscheidender Bedeutung ist.

Zusätzlich zur thermischen Stabilität wurde auch die GdmCl-induzierte Entfaltung von fd G3P\* GG und fd G3P\* GSEG untersucht (Tabelle 3.5.2). Wie bereits bei der thermischen Denaturierung beobachtet, sind die Übergangsmittelpunkte der N1- und N2-Domänen der Deletionsvarianten denen von WT fd G3P\* sehr ähnlich, allerdings ist die Kooperativität  $m$  und damit die freie Enthalpie der N2-Domäne von fd G3P\* GG auch im Vergleich zu fd G3P\* GSEG leicht verringert. Diese Abweichung deutet an, dass in der kürzeren Variante die Wechselwirkung zwischen den Domänen geschwächt sein könnte.

Tabelle 3.5.2: Stabilitätsdaten von WT fd G3P\* und den Deletionsvarianten fd G3P\* GG bzw. fd G3P\* GSEG aus GdmCl-induzierter Entfaltung.

Variante	Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne			Entfaltung der N1-Domäne		
	[GdmCl] <sub>m</sub> (M)	<i>m</i> (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	Δ <i>G</i> (kJ mol <sup>-1</sup> )	[GdmCl] <sub>m</sub> (M)	<i>m</i> (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	Δ <i>G</i> (kJ mol <sup>-1</sup> )
WT fd G3P*	1,4	18,8	26,6	2,6	8,6	22,2
fd G3P* GG	1,3	15,9	21,1	2,6	7,3	18,8
fd G3P* GSEG	1,5	19,0	28,0	2,5	7,8	19,6

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte [GdmCl]<sub>m</sub>, die Kooperativitätsparameter *m* sowie die auf 0 M GdmCl extrapolierten freien Enthalpien der Entfaltung Δ*G* bei 25 °C. Der Übergang der N2-Domäne wurde nach Anregung bei 280 nm anhand der Fluoreszenz bei 310 nm gemessen, der der N1-Domäne bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Für beide Domänen erfolgte die Analyse der Daten nach einem Zweizustandsmodell. Die Daten für das WT fd G3P\* wurden der Referenz<sup>121</sup> entnommen. Die Übergänge wurden bei 25 °C mit 0,5 μM WT fd G3P bzw. 1 μM fd G3P\* GG und fd G3P\* GSEG in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm und einer Heizrate von 60 °C h<sup>-1</sup> gemessen.

Ob die Verkürzung der Linkerregion einen Einfluss auf den Faltungsmechanismus von fd G3P\* GG hat, wodurch diese Variante womöglich teilweise im dissoziierten Zustand vorliegt, wurde anhand von Faltungskinetiken untersucht. In Abbildung 3.5.2 sind die erhaltenen Chevron-Auftragungen für die beiden Deletionsvarianten jeweils im Vergleich zu WT fd G3P\* dargestellt.

Die N1-Domäne von fd G3P\* GG faltet unabhängig von N2 mit einer Zeitkonstante von 62 s (in 0,5 M GdmCl, Abbildung 3.5.2a, △) und damit unverändert zum Wildtyp-Protein (τ = 55 s). Die beiden Rückfaltungsreaktionen der N2-Domäne reflektieren die durch die Isomerisierung von Pro161 limitierte Faltung (◇) bzw. die Einnahme der gedockten Konformation (○) und sind ebenfalls nicht durch die Deletion der distalen Linkerregion beeinflusst. Anders als für WT fd G3P\* beobachtet (Kapitel 3.1.2), sind jedoch bei der Entfaltung von nativem fd G3P\* GG nach manueller Mischung im Bereich von 1 bis 2 M GdmCl drei Phasen detektierbar (Abbildung 3.5.2a). Die Raten der beiden langsamen Reaktionen, die der konformationellen Entfaltung und deren nachgelagerter Isomerisierungsreaktion von Pro213 entsprechen (●; ●, Abbildung 3.5.2a), stimmen gut mit denen des WT fd G3P\* überein. Die schnellste der drei Reaktionen spiegelt die Entfaltung der nicht assoziierten N2-Domäne wider (◆), die durch die notwendige Isomerisierung von *cis*-Pro161 in die *trans*-Konformation verzögert wird. In WT fd G3P\* ist diese Phase nur durch Doppelmischexperimente zugänglich (Kapitel 3.1.3).

Nach *stopped-flow*-Mischung ist eine weitere Entfaltungsreaktion der N2-Domäne detektierbar, deren Raten den aus Doppelsprungexperimenten ermittelten Raten für die Denaturierung von N2 im ungedockten Zustand des Wildtyp-Proteins entsprechen (■, Abbildung 3.5.2a). Gefaltetes fd G3P\* GG liegt demnach analog zu fd G3P\* P213G als Mischung aus gedockten und nicht assoziierten Molekülen vor, worauf bereits die verringerte Kooperativität des Gleichgewichtsüberganges hingedeutet hat (Tabelle 3.5.2). Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften der verschiedenen G3P\*-Zustände kann keine Aussage über den Anteil der nicht-gedockten Population in fd G3P\* GG getroffen werden.

Die Stabilitäten der Deletionsvarianten sind jedoch ähnlich hoch, daher ist anzunehmen, dass der größere Teil die gedockte Konformation einnimmt.

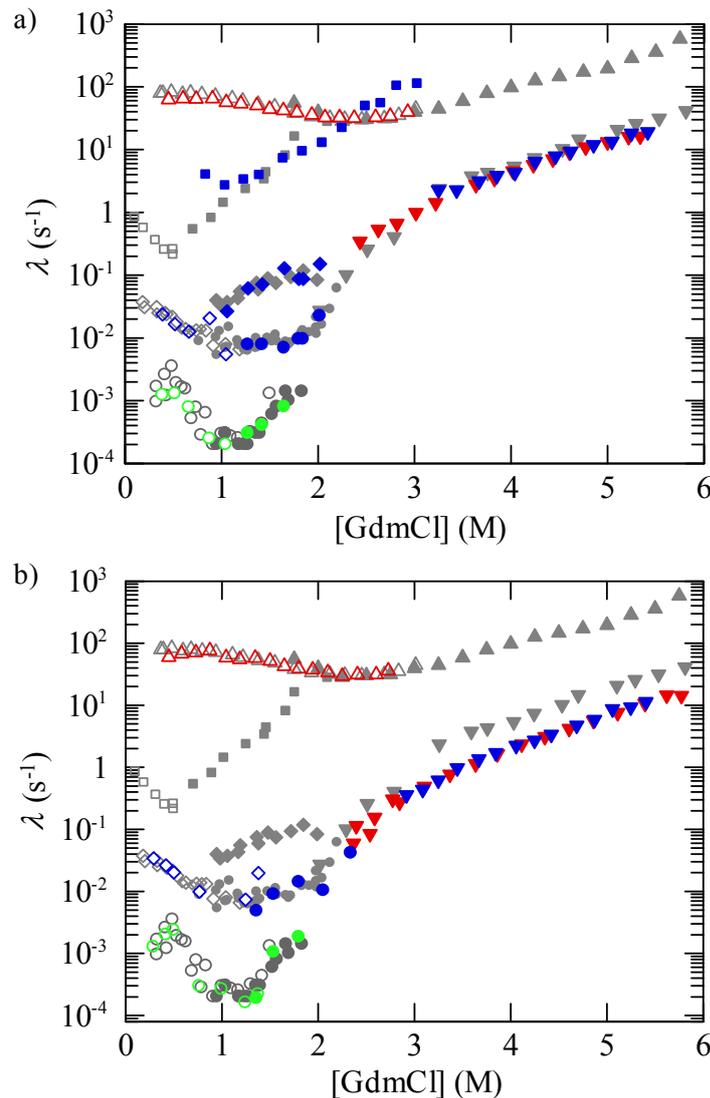


Abbildung 3.5.2: Chevron-Auftragung der Entfaltungs- und Rückfaltungsrate der Deletionsvarianten. Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsrate (offene Symbole) von a) fd G3P\* GG und b) fd G3P\* GSEG in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. In rot sind die Reaktionen der N1-Domäne dargestellt, welche oberhalb von 340 nm anhand der Trp-Fluoreszenz nach Anregung bei 295 nm gemessen wurden. Nach Anregung bei 280 nm wurden die Faltungsraten der N2-Domäne (blaue Symbole) in Handmischexperimenten über die Messung der Fluoreszenz bei 310 nm und nach schneller Mischung über die Verfolgung der Fluoreszenz oberhalb von 320 nm erhalten. Die Rückfaltung der N1-Domäne ( $\triangle$ ), die Entfaltung des nativen Proteins oberhalb von 2,3 M GdmCl ( $\blacktriangledown$ ;  $\blacktriangledown$ ) und der N2-Domäne im nicht assoziierten Zustand ( $\blacksquare$ ) wurden nach schneller Mischung an einer *stopped-flow*-Apparatur gemessen. Die schnellere ( $\diamond$ ) und langsamste ( $\circ$ ) Rückfaltungsreaktion von N2 und die zwei bzw. drei Entfaltungsreaktionen der N2-Domäne aus dem nativen Zustand ( $\blacklozenge$ ;  $\bullet$ ;  $\bullet$ ) wurden nach manueller Mischung aufgenommen. In grau sind jeweils zum Vergleich analogen die Daten des WT fd G3P\* aufgetragen. Die entsprechenden Raten wurden der Abbildung 3.1.6 (Kapitel 3.1.3) entnommen. Gezeigt sind dabei die aus Doppelsprungexperimenten erhaltenen Raten der durch die Isomerisierung von Pro161 limitierten Entfaltung von N2 ( $\blacklozenge$ ), die Rückfaltung der ungedockten N2-Domäne ( $\square$ ) sowie die Entfaltung der N1-Domäne im nicht assoziierten Zustand ( $\blacktriangle$ ). Alle Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit 1  $\mu$ M Protein durchgeführt.

Im Gegensatz zur kurzen Deletionsvariante liegt natives fd G3P\* GSEG wie die Ausgangsvariante fast ausschließlich im assoziierten Zustand vor. Die Entfaltungs- und

Rückfaltungsraten entsprechen denen von WT fd G3P\* und es sind weder in den Handmisch- noch in den *stopped-flow*-Mischexperimenten zusätzliche Phasen detektierbar (Abbildung 3.5.2b). Der einzige Unterschied ergibt sich für die Raten der Entfaltung aus dem gedockten Zustand oberhalb von 3 M GdmCl, die relativ zum WT fd G3P\* geringfügig verlangsamt sind (▼;▼, Abbildung 3.5.2b). Die Abweichung tritt erst unter Denaturierungsbedingungen auf, bei denen die Entfaltung von der Denaturierung der N1-Domäne abhängt. Die Rückfaltung der N1-Domäne ist wie in fd G3P\* GG durch die Deletion des Linkers nicht beeinflusst.

Trotz der Tatsache, dass sich die Länge der Linkerbereiche in den Deletionsvarianten um lediglich zwei AS unterscheidet, ist nur in fd G3P\* GG der geöffnete Zustand signifikant populiert. Es ist daher unwahrscheinlich, dass der distale Glycin-Serin-reiche Linker im WT fd G3P\* direkt an der Vermittlung von stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen den beiden N-terminalen Domänen beteiligt ist, denn sonst wäre ein ähnlich destabilisierender Effekt auch für fd G3P\* GSEG beobachtet worden.

Der Faltungsmechanismus der Population an assoziierten Molekülen in der kurzen Deletionsvariante ist im Vergleich zu WT fd G3P\* unverändert. Denkbar ist daher, dass die verknüpfende Linkersequenz in fd G3P\* GG ausreicht, um den Abstand zwischen N1 und dem ersten Faltblatt der Gelenkregion im vollständig gefalteten Protein zu überbrücken. Damit jedoch der gedockte Zustand überhaupt eingenommen werden kann, sind neben der Isomerisierung von Pro213 zusätzlich strukturelle Umlagerungen der AS der Gelenkregion notwendig, die unter anderem zur Ausbildung der beiden  $\beta$ -Faltblätter führen (Kapitel 3.2). Die zu starke Verkürzung des Linkerbereiches verhindert also vermutlich eine optimale Orientierung der Reste, wodurch die aufgrund der notwendigen Prolylisomerisierung ohnehin hohe Energiebarriere noch vergrößert und das Gleichgewicht leicht in Richtung der nicht assoziierten Spezies verschoben wird.

### 3.5.2 Die Affinität der N1-Domäne für TolAC ist unabhängig von der Länge des distalen Linkers des G3P\*

Die Stabilität und der Faltungsmechanismus des gedockten fd G3P\* sind durch die Deletion des distalen Linkers nur geringfügig bzw. gar nicht beeinflusst. Es stellt sich daher die Frage, ob dieser Bereich eventuell eine Rolle für die Interaktion von N1 mit dem Rezeptor TolAC spielt. Denkbar ist, dass durch seine Länge und Flexibilität der Abstand der N1-Domäne zu N2 und der Gelenkregion vergrößert und somit die Bindungsfläche besser exponiert wird. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, wie sich die Verkürzung des ersten Linkerbereiches auf die Affinität des G3P\* für TolAC auswirkt. Dazu wurden, wie in Kapitel 3.2.1 gezeigt, die Kinetiken der Bindung von TolAC-AEDANS an fd G3P\* GG bzw. fd G3P\* GSEG in Abhängigkeit von deren Konzentration gemessen. Anhand der Zunahme der Amplituden und der apparenten Raten ( $k_{app}$ ) konnten die Dissoziationskonstanten bestimmt werden (Abbildung 3.5.3, Tabelle 3.5.3).

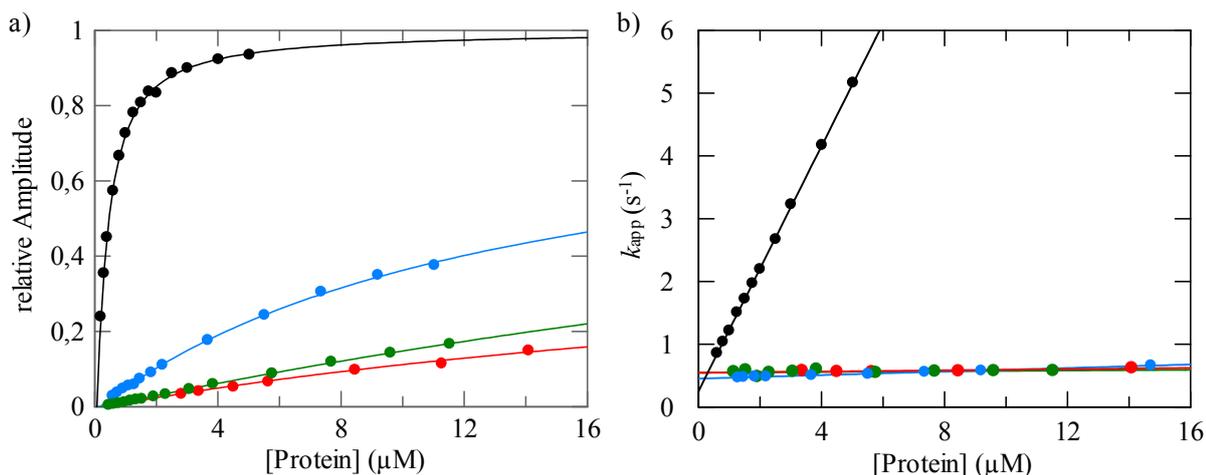


Abbildung 3.5.3: Bindung der G3P\*-Deletionsvarianten an den Rezeptor TolAC-AEDANS.

a) Abhängigkeit der normierten Fluoreszenzamplituden aus den Assoziationskinetiken von der Konzentration an isolierter N1 (●), WT fd G3P\* (●), fd G3P\* GG (●) bzw. fd G3P\* GSEG (●). Die Linien stellen den Angleich an die Daten gemäß Gleichung 43 dar. b) Auftragung der apparenten Assoziationsraten der Bindung von variierenden Konzentrationen isolierter N1 (●), WT fd G3P\* (●), fd G3P\* GG (●) bzw. fd G3P\* GSEG (●) an 0,2 µM TolAC-AEDANS. Die Raten und Amplituden wurden aus dem Angleich monoexponentieller Funktionen an die Assoziationskinetiken erhalten. Durch lineare Regression (durchgezogene Linien) ergab sich aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse die mikroskopische Rate der Dissoziation  $k_{off}$ , aus der Steigung die mikroskopische Rate der Assoziation  $k_{on}$ . Die Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde aus den Quotienten der beiden berechnet. Die Assoziationskinetiken wurden nach Anregung bei 280 nm anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz oberhalb von 460 nm in *stopped-flow*-Mischexperimenten verfolgt. Alle Messungen wurden bei 25 °C in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 durchgeführt. Die erhaltenen  $K_D$ -Werte und mikroskopischen Raten sind in Tabelle 3.5.3 aufgelistet.

Tabelle 3.5.3: Bindungsparameter der Interaktion von TolAC-AEDANS mit den G3P\*-Deletionsvarianten.

Variante	$k_{on}$ (µM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{off}/k_{on}$ (µM)	$K_D$ (µM)
Isolierte N1	0,97 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,26	0,28 ± 0,02
WT fd G3P*	n.d.	n.d.	n.d.	82 ± 30
fd G3P* GG	0,014 ± 0,001	0,453 ± 0,002	32	13 ± 2
fd G3P* GSEG	n.d.	n.d.	n.d.	59 ± 10

Angegeben ist der aus der Analyse der Amplituden erhaltene  $K_D$ -Wert sowie die mikroskopischen Rate  $k_{off}$  und  $k_{on}$  aus der Auswertung der apparenten Assoziationsraten. Deren Quotient ergibt ebenfalls die Dissoziationskonstante des Komplexes aus dem jeweiligen G3P\* und 0,2 µM TolAC-AEDANS. (n. d.: keine Auswertung möglich). Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3.5.3 beschriebenen Bedingungen.

Im nativen, gedockten Zustand des G3P ist die Bindungsstelle für TolAC größtenteils in der Interaktionsfläche zwischen N1 und N2 verborgen. Erst nach Dissoziation der beiden Domänen wird die Bindungsstelle zugänglich. Vollständig gefaltetes WT fd G3P\* hat daher z.B. im Vergleich zu isolierter N1 eine sehr geringe Affinität gegenüber TolAC-AEDANS. Der aus der Auswertung der Amplituden erhaltene  $K_D$ -Wert der längeren der beiden Deletionsvarianten, fd G3P\* GSEG, ist mit 59 µM vergleichbar hoch. Eine verlässliche Auswertung der apparenten Raten war hier, wie auch schon beim WT fd G3P\*, nicht möglich (Abbildung 3.5.3, Tabelle 3.5.3). Zwischen den beiden Varianten existieren also weder signifikante Unterschiede in der thermodynamischen Stabilität noch im Faltungsmechanismus und fd G3P\* GSEG liegt wie das Wildtyp-Protein ebenfalls fast vollständig im gedockten

Zustand vor. In diesem hat die Verkürzung des distalen Linkers auf die Sequenz GSEG demnach keinen Effekt auf die Wechselwirkung mit TolAC.

Die Affinität von fd G3P\* GG gegenüber TolAC-AEDANS ist im Vergleich zur isolierten N1-Domäne vor allem aufgrund der deutlich geringeren Assoziationsrate noch immer sehr gering. Relativ zu WT fd G3P\* bzw. fd G3P\* GSEG ist jedoch der  $K_D$  zumindest nach der Analyse des Amplitudenverlaufes signifikant verringert. Aus dem Quotienten der mikroskopischen Raten  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  ergibt sich ein höherer  $K_D$ -Wert, der jedoch auch unter denen der anderen beiden G3P\*-Varianten liegt. Verantwortlich dafür ist wahrscheinlich die im Vergleich zu den anderen Proteinen erhöhte Population an nicht assoziierten Molekülen, in denen die Interaktionsfläche auf N1 für TolAC-AEDANS besser zugänglich ist. Der Anteil an ungedocktem fd G3P\* GG liegt danach bei maximal 10 %, wie der Vergleich mit der Dissoziationskonstante des langlebigen, nicht assoziierten Intermediates des WT fd G3P\* zeigt ( $K_D = 1,54 \mu\text{M}$  in zusätzlich 0,1 M GdmCl; Kapitel 3.2.1).

Um die Bindungsfähigkeit der Deletionsvarianten im ungedockten Zustand zu untersuchen, wurde, wie unter Kapitel 3.1.7 beschrieben, ihre Rückfaltung in Gegenwart von TolAC-AEDANS anhand der Änderung der Akzeptorfluoreszenz detektiert. Bei allen drei Varianten erfolgt die Freisetzung von TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit N1 über eine biexponentielle Reaktion, deren Raten die Faltung der N2-Domäne und die feste Domänenassoziation durch die Isomerisierung von Pro161 bzw. Pro213 in die *cis*-Konformation widerspiegeln (Abbildung 3.5.4, Tabelle 3.5.4).

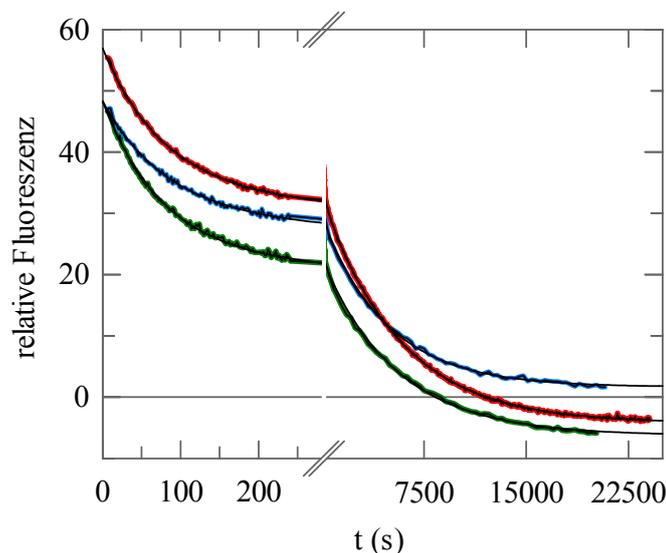


Abbildung 3.5.4: Verdrängung von TolAC aus dem Komplex mit N1 durch Faltung des jeweiligen G3P\*. Gezeigt sind die um den Pufferwert korrigierten Kinetiken der Freisetzung von TolAC-AEDANS bei der Rückfaltung von (●) WT fd G3P\*, (●) fd G3P\* GG bzw. (●) fd G3P\* GSEG. Die Reaktionen wurde nach zehnfacher Verdünnung des jeweiligen denaturierten Proteins ( $10 \mu\text{M}$  in 5 M GdmCl) in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  TolAC-AEDANS anhand der AEDANS-Fluoreszenz bei 490 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Messungen wurden bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  in 0,1 M KP-Puffer, 0,5 M GdmCl, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Die schwarzen Linien stellen den Angleich biexponentieller Funktionen an die Daten da. Die daraus erhaltenen Raten und Amplituden sind in Tabelle 3.5.4 aufgelistet.

Tabelle 3.5.4: Raten und Amplituden der Freisetzung von TolAC-AEDANS aus dem Komplex mit N1 durch Faltung der verschiedenen G3P\*-Deletionsvarianten.

Variante	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>ges</sub>	τ <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )	τ <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )
WT fd G3P*	23,9	37,4	61,3	82	5260
fd G3P* GSEG	25,6	28,9	54,5	78	5435
fd G3P* GG	18,9	27,7	46,5	84	4762

Aufgelistet sind die Raten und Amplituden aus dem Angleich biexponentieller Funktionen an die Kinetiken der TolAC-AEDANS-Verdrängung durch die Faltung der jeweiligen G3P\*-Deletionsvariante. Die Messungen wurden unter den in Abbildung 3.5.6 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Die Zeitkonstanten der beiden Phasen stimmen jeweils überein, was wiederum bestätigt, dass die Linkerregion keinen Einfluss auf die Faltungskinetik des Wildtyp-G3P\* hat. Die Anfangswerte der Deletionsvarianten sind jedoch im Vergleich zum WT fd G3P\* leicht herabgesetzt. Das bedeutet, dass die Zugänglichkeit der Bindungsfläche auf der N1-Domäne im geöffneten Zustand dieser beiden Proteine schlechter ist. Hauptursache dafür ist vermutlich die verringerte Flexibilität der N1-Domäne im nicht assoziierten Zustand, welche bedingt wird durch die Verkürzung des Linkers. Abweichungen ergeben sich außerdem bei den Amplituden der Reaktionen. Erwartungsgemäß ist die Gesamtamplitude der TolAC-Verdrängung durch die Faltung von fd G3P\* GG am kleinsten, da hier ein Teil der Moleküle nicht in die assoziierte Form übergeht. Der Fluoreszenzendwert dieser Verdrängungskinetik liegt dementsprechend deutlich über denen der anderen.

### 3.5.3 fd Phagen mit verkürztem distalem Linker haben bei der Propagation gegenüber dem Wildtyp-Phagen keinen Nachteil

Der Vergleich der verkürzten Proteine mit WT fd G3P\* zeigt, dass der distale Linker, wenn überhaupt, nur einen geringen Einfluss auf die Stabilität und Faltung des G3P\* bzw. die Affinität der N1-Domäne gegenüber TolAC hat. Das legt die Vermutung nahe, dass dieser Bereich eventuell eine wichtige Funktion während eines der anderen Schritte der Phagenpropagation hat, denn das G3P ist unter anderem auch an der Fertigstellung der Assemblierung des Phagen beteiligt.<sup>15-17</sup>

Zur Überprüfung wurden im Gen-3 des Wildtyp-Phagen die entsprechenden Deletionen eingefügt und die DNA in *E. coli* Zellen eingebracht. Nach Inkubation der Zellen konnten aus deren Kulturmedium die entsprechenden Phagen fd G3P GG bzw. fd G3P GSEG isoliert werden. Die Assemblierung und Freisetzung der Phagenvarianten sind demnach durch die Verkürzung des ersten Serin-Glycin-reichen Linkers nicht beeinflusst.

Die isolierten Phagen wurden zunächst für Infektionsexperimente mit pilusfreien *E. coli* HB2156 Zellen verwendet. Die Infektiosität der Phagen ist hier lediglich abhängig von der Population der Phagen mit geöffnetem G3P\*, denn erst durch die Dissoziation der beiden N-terminalen Domänen wird die Bindungsstelle auf N1 für den Rezeptor TolAC zugänglich. Trotz der leicht erhöhten Affinität des fd G3P\* GG gegenüber TolAC-AEDANS *in vitro* besitzt der entsprechende Phage relativ zu den fd WT Phagen und dem Phagen fd G3P\* GSEG keine höhere Infektiosität gegenüber den F<sup>-</sup>-Zellen (Daten nicht gezeigt). Der

Anteil der Phagen mit nicht assoziiertem G3P ist demnach zumindest geringer als die Auflösungsgrenze des Infektionsexperimentes, das eine Genauigkeit von 10 % hat.

Beim Vergleich der Infektiositäten der Phagenvarianten gegenüber pilushaltigen *E. coli* Zellen war ebenfalls kein Unterschied zum Wildtyp-Phagen detektierbar (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet zum einen, dass auch für das Einbringen der ssDNA des Phagen in die Zelle nach der Interaktion von N1 mit TolAC die Länge des ersten Linkers nicht ausschlaggebend ist. Zum anderen findet sich kein Hinweis darauf, dass die von Nilsson *et al.* beobachtete Interaktion des Serin-Glycin-reichen Bereiches mit dem Pilus<sup>170</sup> einen signifikanten Einfluss auf den Infektionsmechanismus hat. Die Genauigkeit des Vergleiches der Infektion verschiedener pilushaltiger *E. coli* Kulturen durch die Phagenvarianten ist jedoch verhältnismäßig gering, da die Konzentration an F-Pili stark von den Wachstumsbedingungen der Zellen abhängt.

Wie bereits erwähnt war es bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, die monomere Einheit des Pilus, das F-Pilin, in stabiler Form herzustellen. Ob es zwischen dem F-Pilus und dem distalen Linker zu Wechselwirkungen kommt, wodurch die Bindungsaffinität des G3P\* gegenüber dem Pilus zusätzlich erhöht wird, konnte deshalb *in vitro* nicht untersucht werden. Sollte jedoch der Wildtyp-Phage durch die vermeintliche zweite Bindungsstelle bei der Interaktion mit dem Pilus einen Vorteil gegenüber den verkürzten Phagenvarianten haben, müsste er sich in einem entsprechenden Wettbewerbsexperiment gegen diese Konkurrenz durchsetzen. Um dies zu untersuchen wurde eine *E. coli* TG1 Zellkultur mit gleichen Konzentrationen an fd WT Phagen und fd G3P GSEG bzw. fd G3P GG Phagen infiziert. Nach einer Runde bestehend aus Infektion, Phagenpropagation und -isolation wurden mit der erhaltenen Phagensuspension hintereinander drei weitere Zyklen durchgeführt, um eventuell vorhandene geringe Unterschiede in den Infektiositäten der Phagen zu amplifizieren. Nach jeder Infektionsrunde wurde von einer repräsentativen Anzahl an Zellen mittels PCR bestimmt, durch welche Phagenvariante sie infiziert worden waren. Dabei wurde ausgenutzt, dass die Gene des G3P der Deletionsphagen im Bereich des distalen Linkers deutlich kürzer sind als das ursprüngliche Gen-3. In Abbildung 3.5.5 sind die Ergebnisse der Konkurrenz zwischen dem fd WT Phagen und fd G3P GSEG bzw. fd G3P GG gezeigt.

Auch nach vier Infektionszyklen war der Anteil der Phagen mit verkürztem G3P an der Gesamtmenge der koloniebildenden Einheiten (*c.f.u.*) unverändert, sie können sich also gegen den Wildtyp-Phagen behaupten. Die in den Kinetiken der TolAC-Verdrängung beobachtete, leicht verringerte Affinität von fd G3P\* GSEG für TolAC im nicht assoziierten Zustand hat ebenfalls keine Auswirkung auf die Fitness des entsprechenden Phagen. Es ist allerdings nicht geklärt, ob das G3P der Phagen durch die Wechselwirkung von N2 mit dem Pilus lediglich in den nicht assoziierten Zustand übergeht oder N2 eventuell sogar vollständig entfaltet wird. In diesem Fall wäre die Bindungsstelle für TolAC auf der N1-Domäne aufgrund fehlender Interaktionen mit N2 auch im fd G3P\* GSEG Phagen permanent zugänglich.

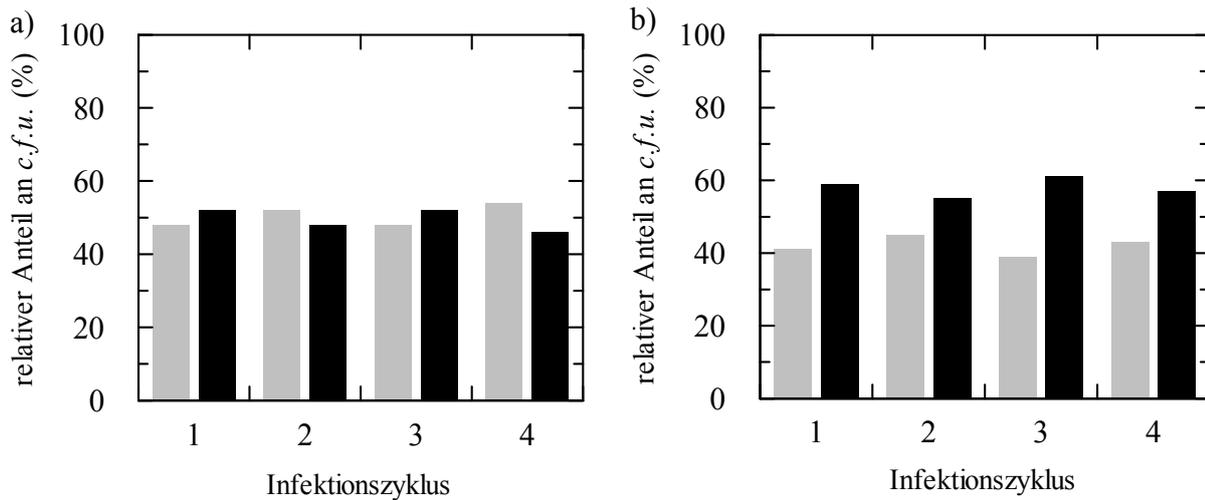


Abbildung 3.5.5: Konkurrenz der Deletionsphagen mit dem Wildtyp-Phagen um die Infektion von  $F^+$ -Zellen. Aufgetragen ist der jeweilige Anteil an a) Phagen fd G3P GSEG (grau) bzw. fd WT Phagen (schwarz) und b) Phagen fd G3P GG (grau) bzw. fd WT Phagen (schwarz) an der Gesamtmenge an *c.f.u.* nach jedem Infektionszyklus. Vor der ersten Infektionsrunde wurden die jeweiligen Phagensuspensionen im Verhältnis von 1:1 gemischt und damit bei 25 °C *E. coli* TG1 Zellen (*m.o.i.* (*multiplicity of infection*) > 1) infiziert. Nach jedem der vier aufeinanderfolgenden Zyklen bestehend aus Infektion, Phagenpropagation und deren Präparation wurde von mindestens 48 Zellen mittels PCR bestimmt, durch welche Phagen sie infiziert worden waren.

Dass die von Nilsson *et al.*<sup>170</sup> beschriebene Interaktion zwischen dem distalen Linker und dem Pilus ausreicht, damit ein Phage mit G3P, bestehend aus N1, erstem Serin-Glycinreichem Linker und C-terminaler Domäne, pilushaltige Zellen ähnlich gut infizieren kann wie der fd WT Phage, ist nach den erhaltenen Ergebnissen unwahrscheinlich. Der Wildtyp-Phage hat bei der gleichzeitigen Infektion von  $F^+$ -Zellen keinen Vorteil gegenüber den Deletionsphagen, deren Affinitäten für den Pilus durch das Fehlen des Linkers signifikant verringert sein sollten. Die Wechselwirkung der N2-Domäne mit der Spitze des F-Pilus wird zudem hauptsächlich über deren hydrophobe Reste Trp181, Phe190 und Phe194 vermittelt.<sup>68</sup> Ein Austausch dieser AS gegen Alanin-Reste im G3P führt dazu, dass die entsprechende Phagenvariante  $F^+$ -Zellen nicht mehr infizieren kann.<sup>68; 97</sup> Der in diesem Phagen ebenfalls enthaltene distale Linker kann folglich den Verlust der Wechselwirkung von N2 mit dem Pilus nicht kompensieren.

### 3.6 Strukturelle und energetische Grundlagen der Dimerisierung des G $\beta$ 1-Proteins

Wie das Beispiel des G3P des fd Phagen zeigt, ist die natürliche Evolution so ausgerichtet, dass Proteine zum einen unter den herrschenden Bedingungen ihre native Struktur aufrechterhalten und zum anderen ihre biologische Funktion optimal erfüllen können.<sup>31; 32</sup> Die geringe Stabilität, vor allem gegenüber thermischer Denaturierung beeinträchtigt jedoch die industrielle Anwendbarkeit vieler Proteine, weshalb unter anderem Selektionsverfahren zur gerichteten evolutiven Stabilisierung immer stärkere Bedeutung erlangen.<sup>35</sup>

Mit Hilfe des in dieser Arbeitsgruppe entwickelten Selektionssystems *Proside* konnten bereits das Kälteschockprotein CspB aus *B. subtilis* und die TEM-1  $\beta$ -Lactamase aus *E. coli* erheblich stabilisiert werden.<sup>54; 172</sup> Die *Proside*-Methode basiert auf der Kopplung der Infektiosität des fd Phagen an die Proteaseresistenz und damit Stabilität des zwischen der C-terminalen und den beiden N-terminalen Domänen des G3P eingebauten Gastproteins.<sup>48; 49</sup>

Die Stabilisierung der Immunoglobulinbindungsdomäne 1 des Proteins G aus *Streptococcus* (G $\beta$ 1) erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde dessen Gen mittels *error-prone* PCR randomisiert und die erhaltenen Phagenbibliotheken durch *Proside*-Selektion gerichteter Evolution unterworfen. Dadurch konnten von Michael Wunderlich mit Glu15, Thr16, Thr18, Ala24 und Asn37 fünf Reste identifiziert werden, welche anscheinend ein hohes Stabilisierungspotential aufweisen (Abbildung 3.6.1).<sup>57</sup>

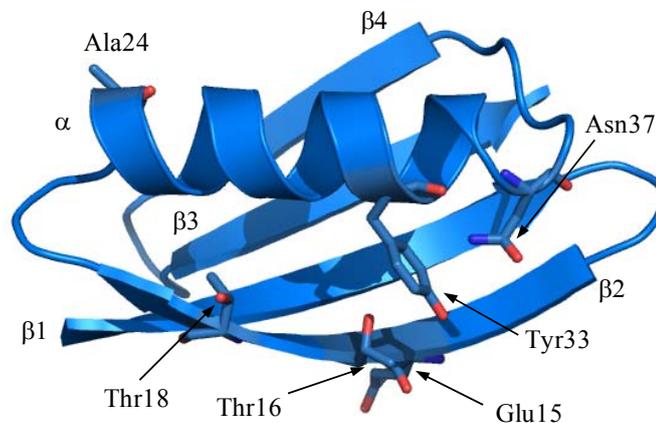


Abbildung 3.6.1: Tertiärstruktur des G $\beta$ 1-Proteins aus *Streptococcus* sp.

Die fünf Reste mit Stabilisierungspotential Glu15, Thr16, Thr18, Ala24 und Asn37 sowie Tyr33 sind als Stäbchen-Modelle dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm Pymol<sup>63</sup> erstellt und basiert auf den Koordinaten der PDB-Datei 1PGA<sup>173</sup>.

Durch Sättigungsmutagenese an diesen Positionen und anschließender *Proside*-Selektion ergaben sich unter anderem in jeder der selektierten Varianten an den Positionen 16 und 37 Leucin-Substitutionen, die das Protein deutlich stabilisieren. Die Kombination der besten, allesamt hydrophoben Austausch E15V, T16L, T18I und N37L erhöht den  $T_M$ -Wert der resultierenden Variante G $\beta$ 1-M2 gegenüber WT-G $\beta$ 1 um 35 °C.<sup>57</sup>

Eine thermodynamische Analyse der einzelnen Austausche sowohl im WT-G $\beta$ 1- als auch G $\beta$ 1-M2-Hintergrund zeigte, dass vor allem die Interaktion zwischen den Leucinresten an den

Positionen 16 und 37 einen sehr hohen Beitrag zur Stabilisierung des G $\beta$ 1-M2-Proteins liefert, wobei dessen Enthalpie der Entfaltung signifikant erhöht ist. Eine direkte Wechselwirkung zwischen den Resten konnte jedoch aufgrund des großen Abstandes der beiden AS von über 10 Å ausgeschlossen werden. Vielmehr wurde vermutet, dass die Interaktion über die aromatische Seitenkette des Tyr33 vermittelt wird (Abbildung 3.6.1).<sup>128; 174</sup>

Im Rahmen des Vertiefungspraktikums und der anschließenden Diplomarbeit wurde von mir die Funktion des Tyr33 für die Stabilität von G $\beta$ 1 anhand weiterer *Proside*-Selektionen mit an den Positionen 16, 33 und 37 bzw. 16, 18, 33 und 37 randomisierten G $\beta$ 1-Phagenbibliotheken untersucht. Daraus resultierten sechs Varianten, von denen zwei an Position 33 den ursprünglichen Tyrosinrest besitzen. Diese Varianten G $\beta$ 1-16L,18I,Y33,37L und G $\beta$ 1-16L,18I,Y33,D36A,37L enthielten außerdem an den Positionen 16, 18 und 37 die gleichen AS wie G $\beta$ 1-M2. Ansonsten waren an den variierten Positionen fast ausschließlich aromatische und aliphatische Substitutionen zu finden (Tabelle 10.4 im Anhang).<sup>175</sup>

Alle Proteine wiesen deutlich erhöhte Enthalpien und  $T_M$ -Werte auf, die zum Teil noch über denen des hyperstabilen G $\beta$ 1-M2 lagen. Bei allen Varianten zeigte sich zudem, dass ihre Stabilität abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration ist. Im Bereich von 1 bis 10  $\mu$ M ergab sich jeweils ein Anstieg des  $T_M$ -Wertes zwischen 0,7 °C (G $\beta$ 1-16F,33M,37L) und 3,9 °C (G $\beta$ 1-16L,33L,37I, Tabelle 10.4 im Anhang), was die Vermutung nahelegte, dass die Proteine unterschiedlich stark zur Ausbildung von Oligomeren neigen. Bei früheren über *Proside*-Selektionen stabilisierten G $\beta$ 1-Varianten und WT-G $\beta$ 1 konnte dagegen in diesem Konzentrationsbereich keine Tendenz zur Oligomerisierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der Entfaltung von Oligomeren müssen zunächst die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen gelöst werden damit die Monomere entfalten können. Die thermischen Entfaltungskurven der Varianten konnten jedoch gemäß eines einfachen Zweizustandsmodells ausgewertet werden. Eine Signaländerung, verursacht durch die Dissoziation der Oligomere, war demnach nicht direkt beobachtbar. Wenn ein Dimer entfaltet, trägt neben den einzelnen stabilisierenden Substitutionen jedoch folglich auch die Vergrößerung der kooperativen Einheit zur Erhöhung der apparenten Gesamtenthalpie der Entfaltung  $\Delta H_{vH}(\text{Monomer})$  bei. Die Kooperativitäten der Übergänge der Varianten sind vermutlich deshalb deutlich um bis zu 230 kJ mol<sup>-1</sup> gegenüber der des WT-G $\beta$ 1 erhöht, das als monomeres Protein tatsächlich in einem Zweizustandsübergang entfaltet.<sup>175</sup>

### 3.6.1 Die hohe Stabilität der Variante G $\beta$ 1-M2 wird zum Teil bedingt durch die Ausbildung von Dimeren

Der Übergangsmittelpunkt und die Enthalpie der kombinierten Variante G $\beta$ 1-M2 liegen im Bereich der Werte, die für die selektierten Varianten erhalten worden waren. Aus diesem Grund wurde die thermische Entfaltung von G $\beta$ 1-M2 ebenfalls im Konzentrationsbereich von

1 bis 10  $\mu\text{M}$  untersucht (Abbildung 3.6.2). Die erhaltenen thermisch-induzierten Entfaltungsübergänge waren wieder einphasig, so dass der Angleich an die Daten unter der Annahme eines Zweizustandsmodells erfolgte.

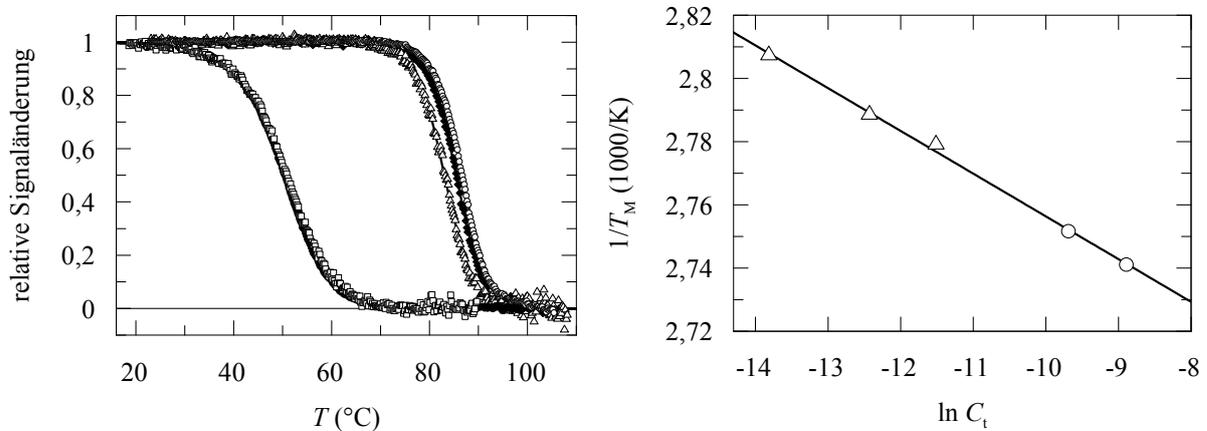


Abbildung 3.6.2: Konzentrationsabhängigkeit der thermisch-induzierten Entfaltung von WT-G $\beta$ 1 und G $\beta$ 1-M2. a) Auftragung der relativen Änderung des CD-Signals bei 222,6 nm von 1 ( $\square$ ) und 10  $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ) WT-G $\beta$ 1 bzw. 1 ( $\triangle$ ), 4 ( $\blacklozenge$ ) und 10  $\mu\text{M}$  ( $\circ$ ) G $\beta$ 1-M2 in Abhängigkeit von der Temperatur. Die durchgezogenen Linien stellen den Angleich an die Messwerte nach Auswertung unter der Annahme des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$  dar. Die Übergänge wurden in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 in Gegenwart von 1,5 M GdmCl mit einer Schichtdicke von 1 cm, einer Heizrate von  $90^{\circ}\text{C h}^{-1}$  und einer Dämpfung von 8 s gemessen. Die aus der Datenanalyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.6.1 aufgelistet. b) Abhängigkeit der Schmelztemperatur  $T_M$  von der Konzentration  $C_1$  an monomerem G $\beta$ 1-M2. Die aufgetragenen Übergangsmittelpunkte resultieren aus der Analyse der CD- ( $\triangle$ ) und DSC-Messungen ( $\circ$ , Tabelle 3.6.1). Nach Gleichung 17 lässt sich durch lineare Regression aus der Steigung die Gesamtenthalpie der Entfaltung  $\Delta H_{\text{vH}}(\text{Dimer})$  ausgehend von vollständig dimerem G $\beta$ 1-M2 zu  $615 \pm 17 \text{ kJ mol}^{-1}$  berechnen.

Im Gegensatz zu WT-G $\beta$ 1 ist auch die Entfaltung von G $\beta$ 1-M2 konzentrationsabhängig (Tabelle 3.6.1). Zwischen 1 und 10  $\mu\text{M}$  steigt der Schmelzpunkt um  $3,6^{\circ}\text{C}$  und die Enthalpie von  $360$  auf  $391 \text{ kJ mol}^{-1}$ , was andeutet, dass die hyperstabile Variante im angegebenen Konzentrationsbereich ebenfalls eine Tendenz zur Oligomerisierung hat. Um eine Aussage über den Oligomerisierungsgrad treffen zu können, wurden die Stabilitäten von WT-G $\beta$ 1 und G $\beta$ 1-M2 bei hohen Konzentrationen mittels DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) analysiert. Neben dem  $T_M$ -Wert werden hier Informationen über die van't Hoff und kalorimetrische Enthalpie erhalten, aus deren Quotient sich der Zweizustandscharakter eines Entfaltungsüberganges abschätzen lässt.<sup>176</sup>

Der Übergangsmittelpunkt von WT-G $\beta$ 1 ist bis zu einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  konstant und das Verhältnis  $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$  nahe 1, was bestätigt, dass das Protein in Lösung als Monomer vorliegt und gemäß des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$  entfaltet (Tabelle 3.6.1). Im Vergleich dazu sind die Schmelzpunkte von G $\beta$ 1-M2 bei 62 bzw.  $139 \mu\text{M}$  genau wie die  $\Delta H_{\text{vH}}$ -Werte signifikant erhöht. Die kalorimetrische Enthalpie  $\Delta H_{\text{cal}}$  wird dagegen auf Grundlage der Monomerkonzentration berechnet. Da sich für G $\beta$ 1-M2 ein Quotient  $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$  von etwa 2 ergibt, liegt dieses bei den untersuchten Konzentrationen folglich als Dimer vor.

Tabelle 3.6.1: Thermische Stabilität von WT-Gβ1 und Gβ1-M2 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Variante	Position				[Protein] (μM)	$T_M$ (°C)	$\Delta H_{vH}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{cal}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$
	15	16	18	37					
WT- Gβ1	<i>Glu</i>	<i>Thr</i>	<i>Thr</i>	<i>Asn</i>	1	51,0	181		
					4	51,2	186		
					10	50,5	188		
					64	50,7	185	178	1,04
					108	50,1	192	166	1,16
Gβ1-M2	Val	Leu	Ile	Leu	1	83,1	360		
					4	85,5	381		
					10	86,7	391		
					62,2	90,3	472	219	2,16
					139	91,7	452	265	1,71
Berechnung nach Modell					1	83,1	559 <sup>a</sup>		
					4	85,5	586 <sup>a</sup>		
$N_2 \rightleftharpoons 2U$					10	86,7	611 <sup>a</sup>		
$\Delta H_{vH}(\text{Dimer})^b = 615 \pm 17 \text{ kJ mol}^{-1}$									

Angegeben sind die Schmelztemperaturen  $T_M$  und die van't Hoff Enthalpien  $\Delta H_{vH}$  von WT-Gβ1 und Gβ1-M2 in Abhängigkeit ihrer Proteinkonzentration. Die ursprünglichen AS an den vier Positionen sind kursiv geschrieben. Die thermischen Übergänge von 1 bis 10 μM Protein wurden mittels der Änderung des CD-Signals bei 222,6 nm verfolgt; für höhere Konzentrationen wurden DSC-Messungen durchgeführt, aus denen zusätzlich die kalorimetrische Enthalpie  $\Delta H_{cal}$  erhalten wurde. Alle Messungen erfolgten in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, 1,5 M GdmCl, pH 7,0. Die CD-Daten wurden zunächst durch nicht-lineare Regression nach dem Zweizustandsmodell  $N \rightleftharpoons U$  analysiert. Die mit <sup>(a)</sup> gekennzeichneten  $\Delta H_{vH}$ -Werte wurden durch Analyse der gleichen CD-Daten auf Grundlage des Zweizustandsmodells  $N_2 \rightleftharpoons 2U$  über die in Gleichung 14 definierte Gleichgewichtskonstante  $K_U$  bestimmt. Hier ist die Entfaltung an die Dissoziation des Dimers gekoppelt. <sup>(b)</sup> Die Gesamtenthalpie  $\Delta H_{vH}(\text{Dimer})$  für die Denaturierung von komplett dimerem Gβ1-M2 wurde aus der Steigung der Auftragung von  $1/T_M$  gegen  $\ln C_t$  erhalten (Abbildung 3.6.2).

Die Entfaltung von Gβ1-M2 ist an die Dissoziation seines Dimers gekoppelt. Die Gesamtenthalpie  $\Delta H_{vH}(\text{Dimer})$  für die Denaturierung ausgehend von vollständig dimerem Protein lässt sich nach Gleichung 17 aus der Auftragung von  $1/T_M$  gegen den natürlichen Logarithmus der entsprechenden Proteinkonzentration  $C_t$  berechnen (Abbildung 3.6.2b). Für die hyperstabile Variante ergibt sich nach linearer Regression aus der Steigung ein Wert von  $\Delta H_{vH}(\text{Dimer}) = 615 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Die apparente Enthalpie der Entfaltung des Dimers  $\Delta H_{vH}(\text{app})$  ist zusätzlich über die Analyse der einzelnen Entfaltungsübergänge auf Grundlage des Zweizustandsmodells  $N_2 \rightleftharpoons 2U$  unter Verwendung der in Gleichung 14 definierten Gleichgewichtskonstante der Entfaltung,  $K_U$ , zugänglich (Kapitel 2.11.1.4). Die darüber ermittelten van't Hoff Enthalpien für den Konzentrationsbereich von 1 bis 10 μM sind ebenfalls in Tabelle 3.6.1 aufgelistet. Mit  $611 \text{ kJ mol}^{-1}$  entspricht die aus dem thermischem Übergang von 10 μM Gβ1-M2 erhaltene Enthalpie  $\Delta H_{vH}(\text{app})$  der über lineare Regression bestimmten Gesamtenthalpie  $\Delta H_{vH}(\text{Dimer})$ . Oberhalb dieser Konzentration kann also die Entfaltung des Proteins als gekoppelter Prozess aus Dissoziation und Denaturierung über das Modell  $N_2 \rightleftharpoons 2U$  beschrieben werden. Die Abnahme der apparenten Enthalpie bei 1 bzw.

4  $\mu\text{M}$  ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass G $\beta$ 1-M2 in diesem Konzentrationsbereich als Mischung aus Monomeren und Dimeren vorliegt.

Um dies zu überprüfen wurden von Dr. Hauke Lilie (Universität Halle-Wittenberg) mittels analytischer Ultrazentrifugation die unter den Bedingungen der thermischen Entfaltungsexperimente vorliegenden apparenten molekularen Massen  $M_r(\text{app})$  von WT-G $\beta$ 1 und G $\beta$ 1-M2 bestimmt. WT-G $\beta$ 1 hat danach bei einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  eine molekulare Masse von  $6,0 \pm 0,5$  kDa, was gut mit der molekularen Masse von monomerem G $\beta$ 1 (ca. 6,2 kDa) übereinstimmt. Für G $\beta$ 1-M2 nimmt  $M_r(\text{app})$  von  $12,2 \pm 0,3$  kDa (bei 150  $\mu\text{M}$ ) auf  $11,3 \pm 0,3$  kDa bei 15  $\mu\text{M}$  ab. Das bestätigt, dass die hyperstabile Variante in wässriger Lösung ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  fast ausschließlich in dimerer Form vorkommt. Unterhalb dieser Proteinkonzentration nimmt der Anteil an Monomeren zu, wobei die Dissoziationskonstante des Komplexes den Messungen zufolge etwa im Bereich von 1  $\mu\text{M}$  liegt ( $M_r(\text{app}) = 9,1 \pm 0,2$  kDa bei 1  $\mu\text{M}$ ).

### 3.6.2 Leucinreste an den Positionen 16 und 37 führen zur Dimerisierung des G $\beta$ 1-Proteins

Die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation bestätigen, dass die deutliche Erhöhung der nach dem Zweizustandsmodell  $N \rightleftharpoons U$  berechneten apparenten Entfaltungsenthalpien der G $\beta$ 1-Proteine zusammen mit der konzentrationsabhängigen Stabilität ein geeigneter Anzeiger für die Vergrößerung der kooperativen Einheit ist. Um die Ursache der Dimerisierung von G $\beta$ 1-M2 näher zu untersuchen, wurden weitere G $\beta$ 1-Varianten auf diese Eigenschaften hin analysiert. Als Grundlage diente dabei die von Michael Wunderlich durchgeführte Analyse der Stabilisierungsbeiträge der Einzelsubstitutionen im WT-G $\beta$ 1 bzw. G $\beta$ 1-M2-Hintergrund.<sup>128</sup>

Durch Einführen der einzelnen Substitutionen E15V, T16L, T18I bzw. N37L in WT-G $\beta$ 1 und Messung der thermisch-induzierten Übergänge von 4  $\mu\text{M}$  der vier resultierenden Varianten 1-4 konnte er den Anteil des jeweiligen Einzelaustausches an der Stabilisierung von G $\beta$ 1 bestimmen (Tabelle 3.6.2).<sup>172; 173</sup> Die Summe der Erhöhung der freien Enthalpien dieser Proteine relativ zu WT-G $\beta$ 1 war mit  $15,3 \text{ kJ mol}^{-1}$  (bei 70 °C) jedoch deutlich geringer als der stabilisierende Effekt der vier Substitutionen in G $\beta$ 1-M2 ( $\Delta\Delta G^{70^\circ\text{C}} = 28 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), was auf zusätzliche günstige Interaktionen dieser AS in der hyperstabilen Variante hinwies.

In einer reziproken Analyse ergab der Austausch der einzelnen stabilisierenden Substitutionen gegen die ursprüngliche AS wiederum vier G $\beta$ 1-Proteine (Varianten 5-8, Tabelle 3.6.2), deren Destabilisierung gegenüber der hyperstabilen Variante zum Teil deutlich stärker war, als die entsprechende Stabilisierung des WT-G $\beta$ 1 durch die umgekehrte Substitution. Besonders große Unterschiede zeigten sich, wie bereits erwähnt, für die beiden Leucinreste an den Positionen 16 und 37. Während die Austausche T16L bzw. N37L den  $T_M$ -Wert des WT-G $\beta$ 1 um 5,6 °C bzw. 8,6 °C erhöhen, wurden durch die Einführung der ursprünglichen AS an diesen Positionen in G $\beta$ 1-M2 die  $T_M$ -Werte um 19,2 bzw. 17 °C

verringert. Die Differenz zwischen den freien Enthalpien der Entfaltung von WT-G $\beta$ 1 und G $\beta$ 1-M2 ist zudem deutlich geringer als die Summe der destabilisierenden Beiträge der einzelnen Rücksubstitutionen in den Varianten 5-8.

Tabelle 3.6.2: Stabilitätsdaten aus den thermisch-induzierten Entfaltungsübergängen verschiedener G $\beta$ 1-Varianten.

Variante	Position				$T_M$ (°C)	$\Delta H_{\text{vH}}(\text{Monomer})$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{70^\circ\text{C}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G^{70^\circ\text{C}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
	15	16	18	37				
WT-G $\beta$ 1	<i>Glu</i>	<i>Thr</i>	<i>Thr</i>	<i>Asn</i>	51,2	186	-12,9	0,0
G $\beta$ 1-M2	Val	Leu	Ile	Leu	85,5	381	15,1	28,0
1	Val	<i>Thr</i>	<i>Thr</i>	<i>Asn</i>	53,8	196	-11,3	1,6
2	<i>Glu</i>	Leu	<i>Thr</i>	<i>Asn</i>	56,8	184	-8,4	4,5
3	<i>Glu</i>	<i>Thr</i>	Ile	<i>Asn</i>	55,9	200	-9,7	3,2
4	<i>Glu</i>	<i>Thr</i>	<i>Thr</i>	Leu	59,8	203	-6,9	6,0
5	<i>Glu</i>	Leu	Ile	Leu	82,3	366	11,8	24,7
6	Val	<i>Thr</i>	Ile	Leu	66,3	206	-2,3	10,6
7	Val	Leu	<i>Thr</i>	Leu	75,8	330	5,3	18,2
8	Val	Leu	Ile	<i>Asn</i>	68,5	212	-0,9	12,0
9	<i>Glu</i>	Leu	<i>Thr</i>	Leu	71,9	315	1,7	14,6

Aufgelistet sind für WT-G $\beta$ 1, G $\beta$ 1-M2 und deren Varianten der Übergangsmittelpunkt  $T_M$ , die van't Hoff Enthalpie  $\Delta H_{\text{vH}}(\text{Monomer})$ , die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G^{70^\circ\text{C}}$  und deren Differenz  $\Delta\Delta G^{70^\circ\text{C}}$  zum WT-G $\beta$ 1 nach Analyse der thermischen Übergänge gemäß des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$ . Für die Auswertung wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von 4000 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> angenommen. Die ursprünglichen AS an den vier Positionen sind kursiv geschrieben. Die Daten von 4  $\mu\text{M}$  Protein wurden in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 in Gegenwart von 1,5 M GdmCl mit einer Schichtdicke von 1 cm und einer Dämpfung von 8 s anhand des CD-Signals bei 222,6 nm gemessen. Die Daten wurden der Doktorarbeit von M. Wunderlich<sup>173</sup> bzw. der Referenz<sup>172</sup> entnommen.

Die  $\Delta G$ -Werte wurden anhand der apparenten Enthalpien berechnet, die für einige der Proteine wieder signifikant erhöht sind. Aufgrund dieser Unterschiede in den  $\Delta H_{\text{vH}}(\text{Monomer})$ -Werten lassen sich die untersuchten G $\beta$ 1-Proteine in zwei Gruppen unterteilen (Abbildung 3.6.3a). Interessanterweise liegen nur die Kooperativitäten der beiden Varianten 5 und 7, in denen jeweils die Substitutionen T16L und N37L kombiniert sind, im Bereich der erhöhten apparenten Enthalpie von G $\beta$ 1-M2. Alle anderen Proteine besitzen ähnliche  $\Delta H_{\text{vH}}$ -Werte wie WT-G $\beta$ 1. Zudem ist die Temperaturabhängigkeit dieser Enthalpien deutlich geringer ausgeprägt als die der Varianten 5, 7 und G $\beta$ 1-M2.

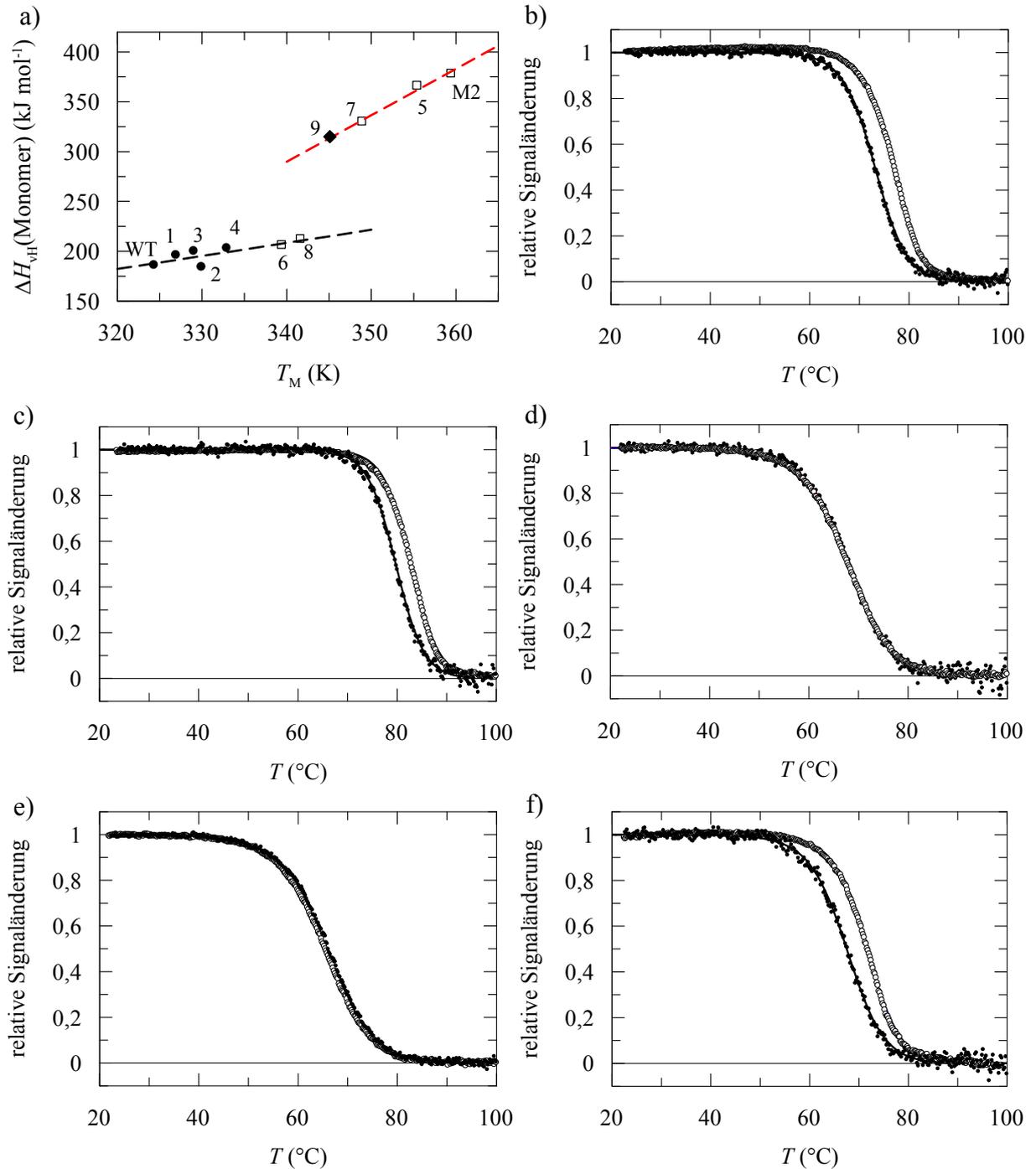


Abbildung 3.6.3: Konzentrationsabhängigkeit der thermischen Stabilität verschiedener Gβ1-Varianten.

a) Aufgetragen sind die apparenten Enthalpien ( $\Delta H_{vH}(\text{Monomer})$ ) gegen die jeweilige Schmelztemperatur für die in Tabelle 3.6.2 aufgelisteten Gβ1-Varianten. Die Daten wurden aus der Entfaltung von 4 μM Protein erhalten. Die gestrichelten Linien stellen die lineare Regression an die Daten dar. b-f) Auftragung der relativen Änderung des CD-Signals bei 222,6 nm von 1 (●) und 10 μM (○) Gβ1-M2 I18T (b, Variante 7), Gβ1-M2 V15E (c, Variante 5), Gβ1-M2 L16T (d, Variante 6), Gβ1-M2 L37N (e, Variante 8) bzw. Gβ1-T16L,N37L (Variante 9, Tabelle 3.6.2) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die durchgezogenen Linien stellen den Angleich an die Messwerte nach Auswertung unter der Annahme des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$  dar. Die resultierenden thermodynamischen Parameter sind im Anhang in Tabelle 10.5 gezeigt. Die Übergänge wurden in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 in Gegenwart von 1,5 M GdmCl mit einer Schichtdicke von 1 cm, einer Heizrate von 90 °C h<sup>-1</sup> und einer Dämpfung von 8 s gemessen.

Sollte die Erhöhung der  $\Delta H_{\text{VH}}$ -Werte der Varianten 5 und 7 genau wie in G $\beta$ 1-M2 zum Teil auf die Ausbildung von Dimeren zurückzuführen sein, müssten ihre Stabilitäten von der Proteinkonzentration abhängen. In Abbildung 3.6.3 sind die thermischen Übergänge von 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  der Varianten gezeigt. Durch die Entfernung der Substitutionen E15V bzw. T18I sind die Stabilitäten der Proteine zwar verringert, jedoch steigt analog zur hyperstabilen Variante bei Erhöhung der Proteinkonzentration von 1 auf 10  $\mu\text{M}$  der Schmelzpunkt um 3,1 °C bzw. 3,7 °C an (Tabelle 10.5; Anhang). Die beiden Positionen 15 und 18 spielen demnach für die Dimerisierung von G $\beta$ 1-M2 keine Rolle. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass dafür die Kombination der Reste an den Positionen 16 und 37 ausschlaggebend ist. Tatsächlich sind die thermischen Stabilitäten der Varianten 6 und 8, in denen einer der beiden Leu-Reste gegen die ursprüngliche AS zurückgetauscht wurde, konzentrationsunabhängig (Abbildung 3.6.3d,e; Tabelle 10.5 im Anhang).

Sobald demnach aus G $\beta$ 1-M2 einer der beiden substituierten Leu-Reste entfernt wird, verliert das Protein im untersuchten Konzentrationsbereich die Fähigkeit zur Dimerisierung. Umgekehrt reichen die beiden Substitutionen T16L und N37L aus, um die Bildung von Dimeren in G $\beta$ 1 zu induzieren. Die thermische Stabilität der Doppelvariante G $\beta$ 1-16L,37L ist im Vergleich zu den Einzelvarianten G $\beta$ 1-T16L und G $\beta$ 1-N37L (Varianten 2 und 4) nicht nur deutlich erhöht, sondern wiederum abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration (Tabelle 10.5; Anhang). Ihre Enthalpie liegt zudem im gleichen Bereich wie die von G $\beta$ 1-M2 (Variante 9, Tabelle 3.6.2, Abbildung 3.6.3a,f).

### **3.6.3 Die Assoziation der Monomere des G $\beta$ 1-M2 wird vermittelt über hydrophobe Wechselwirkungen und die Ausbildung eines intermolekularen $\beta$ -Faltblattes**

Da die Ausbildung von G $\beta$ 1-M2-Dimeren durch die hydrophoben Leu-Substitutionen an den Positionen 16 und 37 hervorgerufen wird, liegt die Vermutung nahe, dass diese AS zentrale Bestandteile der Interaktionsfläche zwischen den monomeren Einheiten sind. Um weitere molekulare Grundlagen der Dimerisierung zu analysieren, wurde von Dr. Klaas Max im Labor von Prof. Dr. Udo Heinemann die Kristallstruktur der hyperstabilen Variante G $\beta$ 1-M2 mit einer Auflösung von 0,88 Å gelöst.<sup>174</sup>

In der asymmetrischen Einheit befinden sich zwei G $\beta$ 1-M2-Moleküle, die ein kompaktes Dimer bilden, dessen die lösungsmittlexponierte Oberfläche um 13,3 % verringert ist. Die geringe Abweichung in den RMSD-Werten der Rückgratome beider Monomere relativ zu Strukturen von WT-G $\beta$ 1 zeigen, dass das Rückgrat durch die eingefügten Substitutionen nicht beeinflusst wurde. Die Dimerisierung erfolgt daher nicht wie bei anderen G $\beta$ 1-Varianten über den Austausch einzelner Stränge zwischen den Monomeren.<sup>177; 178</sup> Vielmehr interagieren die aneinandergelagerten Monomere unter anderem über sechs intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den auf den beiden Faltblattsträngen  $\beta$ 2 und  $\beta$ 2' gelegenen Resten Lys13, Val15 und Thr17 (Abbildung 3.6.4).

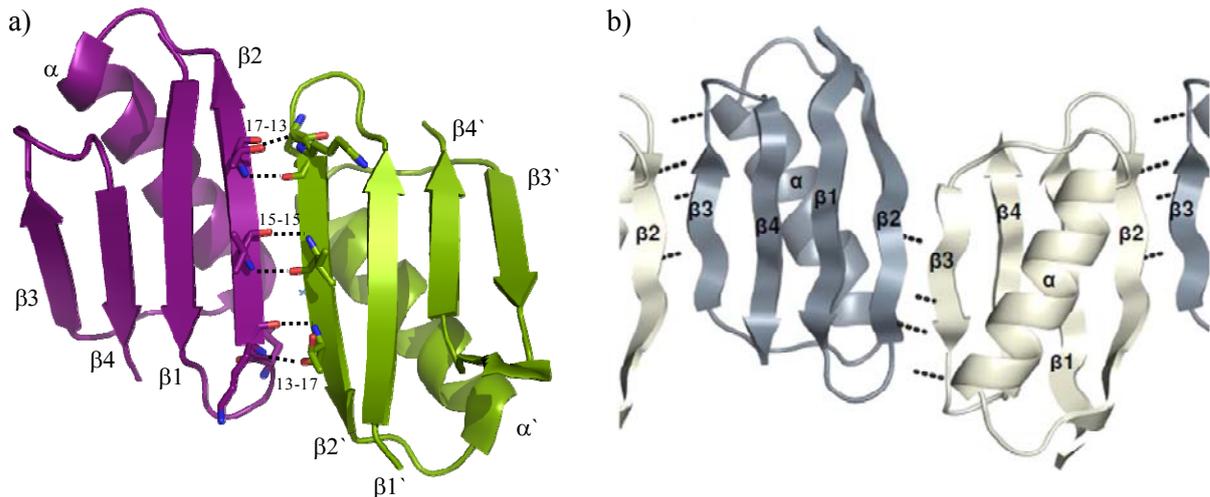


Abbildung 3.6.4: Molekulare Anordnung von G $\beta$ 1-M2 bzw. WT-G $\beta$ 1 im Kristall.

a) Assoziation zweier Monomere der hyperstabilen Variante G $\beta$ 1-M2 unter anderem über sechs Wasserstoffbrücken zwischen AS der Faltblattstränge  $\beta 2$  und  $\beta 2'$ . Die an der Ausbildung des intermolekularen  $\beta$ -Faltblattes beteiligten Reste 13, 15 und 17 sind als Stäbchen-Modelle dargestellt. b) Ausbildung eines durchgehenden  $\beta$ -Faltblattes im Kristall von WT-G $\beta$ 1 durch Aufbau von Wasserstoffbrücken zwischen den Resten der Faltblattstränge  $\beta 2$  und  $\beta 3$ . Die Wasserstoffbrücken sind jeweils als unterbrochene Linien dargestellt. Abbildung a) wurde anhand der PDB-Struktur 3FIL<sup>174</sup> mittels Pymol<sup>63</sup> erstellt; Abbildung b) wurde Referenz<sup>174</sup> entnommen.

Da die Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren ausschließlich Atome der Proteinrückgrate sind, ist eine solche Aneinanderlagerung der Moleküle theoretisch auch bei anderen G $\beta$ 1-Proteinen möglich. Tatsächlich assoziieren WT-G $\beta$ 1-Moleküle, obwohl sie in Lösung als Monomere vorliegen, im Kristall über ihre äußeren Faltblattstränge und bilden so ein durchgehendes  $\beta$ -Faltblatt (Abbildung 3.6.4b). Die Wasserstoffbrücken werden hier jedoch über die Reste der Stränge  $\beta 2$  und  $\beta 3$  zwei benachbarter Moleküle aufgebaut, wodurch sich eine andere Orientierung der  $\alpha$ -Helices zueinander ergibt.

Zur Interaktionsfläche der Monomere in G $\beta$ 1-M2 tragen hydrophile Gruppen nur zu 40 % bei. Der größere Teil der Wechselwirkungen wird über die zum Teil substituierten, hydrophoben Reste oberhalb der beiden  $\beta 2$ -Faltblattstränge vermittelt. In WT-G $\beta$ 1 befindet sich in diesem Bereich eine hydrophobe Tasche, die unter anderem auch durch die Reste Thr16, Thr18 und Tyr33 begrenzt wird (Abbildung 3.6.5a). Durch *Proside*-Selektion auf erhöhte Stabilität wurden von Michael Wunderlich mehrere (monomere) G $\beta$ 1-Varianten mit bevorzugt Isoleucin-Austauschen an den Positionen 16 und 18 identifiziert, deren stabilisierender Effekt insbesondere auf der Verkleinerung des Hohlraumes und der verbesserten Packung der hydrophoben Reste beruhte.<sup>55</sup>

Diese in G $\beta$ 1-M2 zur Dimerisierung verwendeten Oberflächen sind ebenfalls stark zerklüftet, jedoch zeigen sie jeweils eine gute Komplementarität zueinander, wodurch im assoziierten Zustand destabilisierende Hohlräume vermieden werden (Abbildung 3.6.5b,c). Eine entscheidende Rolle nehmen dabei die Leucinreste an den Positionen 16 und 37 der beiden interagierenden Moleküle ein, die sich im Zentrum der hydrophoben Wechselwirkungsflächen befinden. Von dort ragen ihre Seitenketten in direkt gegenüber-

liegende Hohlräume auf der Oberfläche des jeweils anderen Monomers und bilden so den hydrophoben Kern des Dimers (Abbildung 3.6.5b, d).

Die Aushöhlungen sind das Ergebnis der Umorientierung der Tyrosinreste an den Positionen 33 und 33'. Durch Rotation ihrer C $\alpha$ -C $\beta$ -Bindungen um ca. 120° richten sich ihre Seitenketten nach außen, wobei die Hydroxylgruppe aus der hydrophoben Interaktionsfläche entfernt und dem Lösungsmittel exponiert wird (Abbildung 3.6.5e). Im Gegensatz zum WT-G $\beta$ 1 sind die Leucinreste an den Positionen 16 und 37 nun nicht mehr durch den Hydroxyphenylrest des Tyr33 getrennt und können sich zueinander orientieren. Dadurch wird zum einen der Abstand zwischen ihnen von 8,4 Å auf 4,4 Å reduziert und zum anderen die Hydrophobizität der Dimerisierungsfläche in diesem Bereich deutlich erhöht (Abbildung 3.6.5b). Entgegen früherer Vermutungen wird die Interaktion zwischen den substituierten Leu-Resten also nicht durch Tyr33 vermittelt, sondern findet intermolekular direkt zwischen diesen vier statt.

Die Arbeitsgruppe um Angela Gronenborn konnte anhand der NMR-Struktur der sehr stark destabilisierten G $\beta$ 1-Variante A34F zeigen, dass diese in Lösung auch die für G $\beta$ 1-M2 beschriebene Dimerform ausbildet.<sup>179</sup> Die Dissoziationskonstante des Komplexes liegt jedoch mit ca. 27  $\mu$ M deutlich über der der G $\beta$ 1-M2-Variante, was zeigt, dass die intermolekularen Wechselwirkungen im hyperstabilen Protein deutlich stärker ausgeprägt sind. Wie auch schon für G $\beta$ 1-M2 beobachtet, kommt es in G $\beta$ 1-A34F zu einer nach außen gerichteten Umorientierung der Reste Tyr33 und Tyr33'. Der dadurch entstehende Hohlraum wird hier jedoch durch den Phenylring des substituierten Phenylalaninrestes ausgefüllt, der dadurch von der Lösungsumgebung abgeschirmt wird. Die Positionierung des Phe34 im Zentrum der Interaktionsfläche führt zudem zur Auflösung der letzten Windung der  $\alpha$ -Helix ab Tyr33. Die hydrophile Seitenkette des dort lokalisierten Asn37 wird dadurch ebenfalls neu orientiert und dem Lösungsmittel besser zugänglich gemacht.<sup>179</sup>

Sowohl die strukturellen Beispiele von G $\beta$ 1-M2 und G $\beta$ 1-A34F als auch die anderen hier vorgestellten dimeren G $\beta$ 1-Varianten zeigen, dass sich polare Gruppen im Zentrum der Interaktionsfläche ungünstig auf die Stabilität des G $\beta$ 1-Komplexes auswirken. Entscheidend für die deutlich erhöhte Dimerisierungstendenz von G $\beta$ 1 sind demnach vor allem die Flexibilität und die hydrophoben Eigenschaften der AS in der Interaktionsfläche. Leucinreste an den Positionen 16 und 37 sind jedoch nicht obligatorisch. Eine ausgehend von G $\beta$ 1-M2 modifizierte Variante, in der Thr16 durch einen Isoleucinrest ersetzt wurde, besitzt nicht nur eine vergleichbare Stabilität sondern auch einen ähnlich hohen  $\Delta H_{\text{vH}}(\text{Monomer})$ -Wert.<sup>173</sup> Die aus den Selektionen auf stabilisierende AS-Austausche an den Positionen 16, 18, 33 und 37 hervorgegangenen dimeren G $\beta$ 1-Varianten enthalten zudem unter anderem auch die Substitutionen T16F bzw. N37I (Tabelle 10.4 im Anhang).

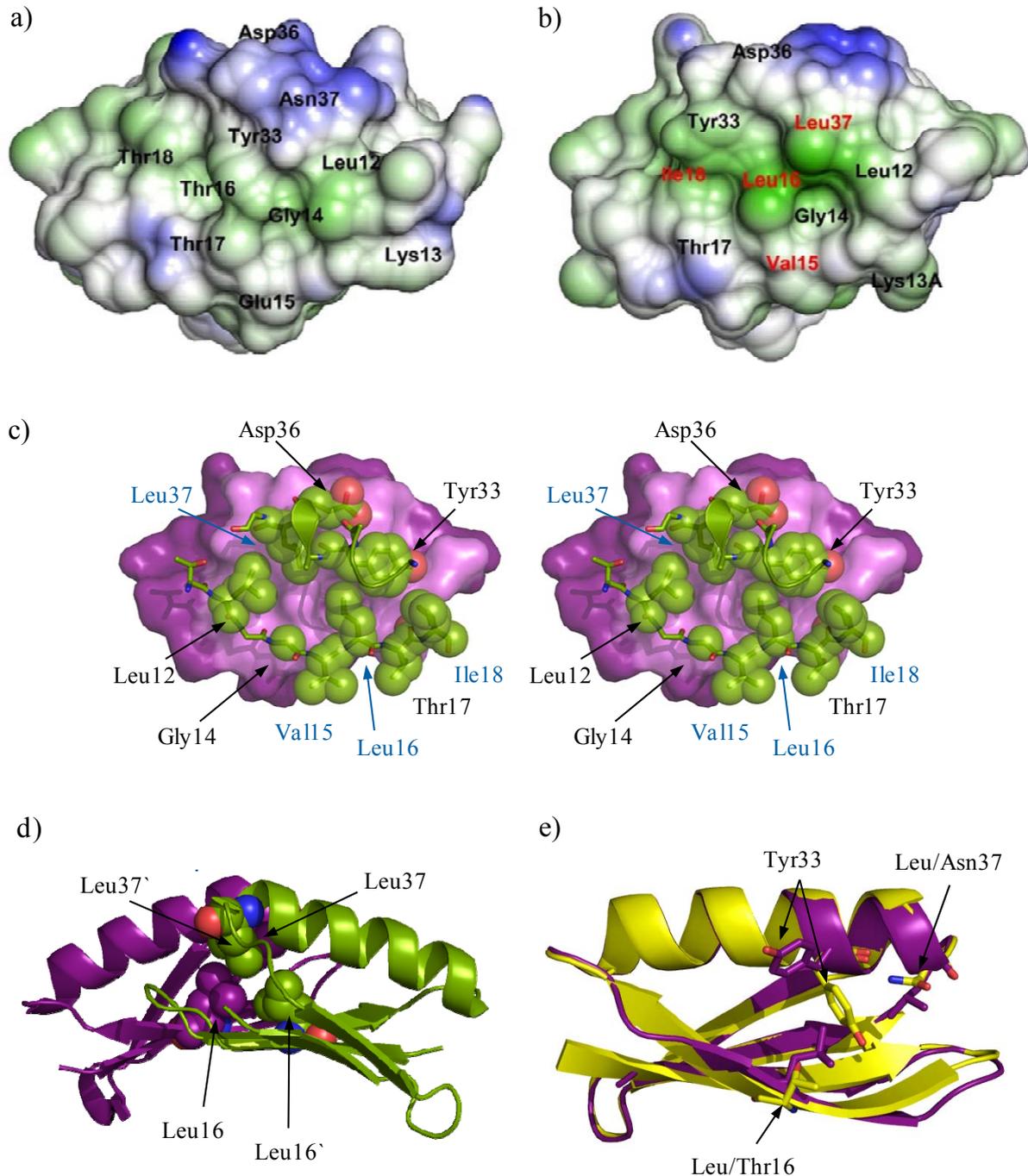


Abbildung 3.6.5: Vergleich der Strukturen von WT-Gβ1 und des Gβ1-M2-Dimers.

a) und b) Nach Ghose und Crippen<sup>180</sup> bzw. Ghose *et al.*<sup>181</sup> mittels VASCO<sup>182</sup> berechnete hydrophobe Potentiale der Oberflächenreste von a) WT-Gβ1 bzw. b) Molekül A des Gβ1-M2. Die in Gβ1-M2 enthaltenen hydrophoben Substitutionen sind rot markiert. Polare Bereiche sind dunkelblau; hydrophobe Bereiche dunkelgrün gekennzeichnet (-0,12 - 0,36). c) Stereoabbildung des Gβ1-M2-Dimers. Molekül A ist als dunkelviolette Fläche gezeigt, die Reste der Interaktionsfläche mit Molekül B sind in hellem Violett hervorgehoben. Die mit Molekül A wechselwirkenden AS in Molekül B sind als grüne Stäbchen-Modelle sowie in Van-der-Waals-Darstellung gezeigt. Die blau markierten Reste entsprechen den substituierten AS. d) Vollständige Ansicht des Gβ1-M2-Dimers diesmal mit den vier Leu-Resten an den Positionen 16 und 37 beider Monomere (grün, violett) in Van-der-Waals-Darstellung. e) Überlagerung von WT-Gβ1 (gelb) und Molekül A von Gβ1-M2 (violett). Die AS an den Positionen 16, 33 und 37 sind als Stäbchen-Modelle gezeigt. O und N-Atome sind in rot bzw. blau dargestellt. Die Abbildungen a) und b) wurden Referenz<sup>171</sup> entnommen, die Abbildungen c) - e) wurden mit Pymol<sup>63</sup> auf Grundlage der PDB-Strukturen 1PGA und 3FIL angefertigt.<sup>63; 173; 174</sup>

### 3.6.4 Die Natur des Restes an Position 33 hat keinen Einfluss auf die Tendenz des G $\beta$ 1-M2 zur Dimerisierung

Für G $\beta$ 1-A34F war beschrieben worden, dass Tyr33 aufgrund seiner Neuorientierung eine Schlüsselrolle bei der Dimerisierung dieser Variante einnimmt.<sup>179</sup> Auch in G $\beta$ 1-M2 ist die direkte Wechselwirkung der Leu-Reste an den Positionen 16 und 37 nur möglich, da die Seitengruppe von Tyr33 nicht mehr zwischen diesen positioniert sondern nach außen gerichtet ist. Wie bereits erwähnt ergaben die auf stabilisierende Substitutionen an den Positionen 16, (18), 33 und 37 durchgeführten *Prosidede*-Selektionen unter anderem dimere Varianten, die das ursprüngliche Tyr33 besaßen, wobei sich an den Positionen 16, 18 und 37 die gleichen Substitutionen wie in G $\beta$ 1-M2 fanden (Tabelle 10.4 im Anhang). In anderen G $\beta$ 1-Proteinen dagegen war der Tyr-Rest gegen Isoleucin bzw. Leucin ausgetauscht. Eine Variante enthielt an Position 33 sogar einen Methioninrest, wobei ihre Tendenz zur Dimerisierung gegenüber den anderen G $\beta$ 1-Varianten reduziert war (Tabelle 10.4 im Anhang). Um die Rolle des Tyr33 bei der Assemblierung von G $\beta$ 1 genauer zu untersuchen, wurde dieses im G $\beta$ 1-M2-Hintergrund gegen Alanin, Threonin, Valin bzw. Leucin ausgetauscht, die entsprechenden Varianten gereinigt und auf ihre Stabilitäten hin analysiert (Tabelle 3.6.3).

Tabelle 3.6.3: Thermodynamische Parameter der thermisch-induzierten Entfaltung verschiedener Varianten von G $\beta$ 1-M2.

Variante	Position					[Protein] ( $\mu$ M)	$T_M$ ( $^{\circ}$ C)	$\Delta H_{vH}$ (Monomer) (kJ mol $^{-1}$ )
	15	16	18	33	37			
WT-G $\beta$ 1	<i>Glu</i>	<i>Thr</i>	<i>Thr</i>	<i>Tyr</i>	<i>Asn</i>	1	51,0	181
						10	50,5	188
G $\beta$ 1-M2	Val	Leu	Ile	<i>Tyr</i>	Leu	1	83,1	360
						10	85,5	381
G $\beta$ 1-M2 Y33T	Val	Leu	Ile	Thr	Leu	1	74,4	321
						10	78,3	344
G $\beta$ 1-M2 Y33A	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	1	79,0	339
						10	82,5	365
G $\beta$ 1-M2 Y33L	Val	Leu	Ile	Leu	Leu	1	87,7	385
						10	91,7	379
G $\beta$ 1-M2 Y33V	Val	Leu	Ile	Val	Leu	1	85,3	378
						10	89,0	385

Aufgelistet sind für WT-G $\beta$ 1, G $\beta$ 1-M2 und dessen Varianten der Übergangsmittelpunkt  $T_M$  und die van't Hoff Enthalpie  $\Delta H_{vH}$ (Monomer) in Abhängigkeit der Proteinkonzentration nach Analyse der thermisch-induzierten Übergänge gemäß des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$ . Für die Auswertung wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von 4000 J mol $^{-1}$  K $^{-1}$  angenommen. Die ursprünglichen AS an den fünf Positionen sind kursiv geschrieben. Die Daten von 1 bzw. 10  $\mu$ M Protein wurden in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 in Gegenwart von 1,5 M GdmCl mit einer Schichtdicke von 1 cm, einer Heizrate von 90  $^{\circ}$ C h $^{-1}$  und einer Dämpfung von 8 s anhand des CD-Signals bei 222,6 nm gemessen.

Alle Proteine zeigen neben der Konzentrationsabhängigkeit ihrer thermischen Stabilität apparente Enthalpien, die im Bereich der hyperstabilen Variante liegen. Für die Dimerisierung ist demnach die nach außen gerichtete Reorientierung der Seitenkette des Tyr33 nicht entscheidend. Es ergeben sich jedoch deutliche Unterschiede in der konformationellen

Stabilität der Varianten, die zeigt, dass aliphatische Reste an dieser Position besser geeignet sind als z.B. polare Seitenketten. Der Austausch von Tyrosin gegen Threonin führt zu einer Destabilisierung des Proteins um mehr als 7 °C. Die Verkürzung der Seitenkette zu Alanin verringert den Übergangsmittelpunkt um ca. 4 °C wohingegen die Substitutionen zu Valin bzw. Leucin sogar leicht stabilisierend wirken. Dies bestätigt, dass die Hydrophobizität der Reste der Interaktionsflächen der Monomere und ihre Komplementarität zueinander entscheidend sind für die Stabilität des Dimers, da dadurch ungünstige Wechselwirkungen und Hohlräume im Inneren vermieden werden.

### 3.6.5 Analyse des Faltungsmechanismus der hyperstabilen Variante Gβ1-M2

Die Kristallstruktur von Gβ1-M2 bietet eine schlüssige Erklärung für die Ursachen der Dimerisierung. Aufgrund ihrer Konzentrationsabhängigkeit ist es jedoch nicht möglich, die thermodynamischen Stabilitäten oligomerer Formen mit denen monomerer Proteine zu vergleichen. Um die Unterschiede zwischen entsprechenden Varianten abzuschätzen, wurden daher in der Vergangenheit zum Teil die Übergangsmittelpunkte bei der gleichen Monomerkonzentration herangezogen.<sup>183-185</sup> Darüber konnte zwar gezeigt werden, dass die Oligomere stabiler sind. Aussagen über die Differenzen in den freien Enthalpien oder die stabilisierenden Beiträge einzelner Substitutionen dazu waren jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund wurde zunächst versucht durch Veränderung der Lösungsmittelbedingungen z.B. über Zugabe von Ethylenglykol, Erhöhung der GdmCl-Konzentration auf 4 M bzw. die Verringerung des pH-Wertes auf 2,0 die Ausbildung von Gβ1-M2-Dimeren zu unterbinden. Da jedoch die thermischen Übergänge auch nach Vorinkubation der Proben bei 70 °C bzw. in 6 M GdmCl in gleichem Maße konzentrationsabhängig blieben (Daten nicht gezeigt), konnte geschlossen werden, dass die Assoziation der Monomere schnell erfolgt, wobei der gebildete Komplex vermutlich deutlich stabiler ist, als aus den Ergebnissen der analytischen Ultrazentrifugation ( $K_D \approx 1 \mu\text{M}$ ) abgeschätzt.

Um zu überprüfen, ob mit der Dissoziation des Komplexes während der Entfaltung eine Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften verbunden ist, wurden GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergänge mit 0,25, 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Gβ1-M2 gemessen (Abbildung 3.6.6). Als Sonde diente die Änderung der Fluoreszenz der drei enthaltenen Tyrosinreste und Trp43 bei 342 nm nach Anregung bei 280 nm. Es zeigte sich, dass Gβ1-M2 aufgrund der Substitutionen wiederum deutlich gegenüber WT-Gβ1 stabilisiert ist. Wie jedoch bereits bei anderen dimeren Gβ1-Varianten beobachtet, ergaben sich bei allen Konzentrationen monophasische Übergänge, deren Kooperativitäten und Übergangsmittelpunkte nach Auswertung gemäß des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$  ebenfalls abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration waren (Tabelle 3.6.4).

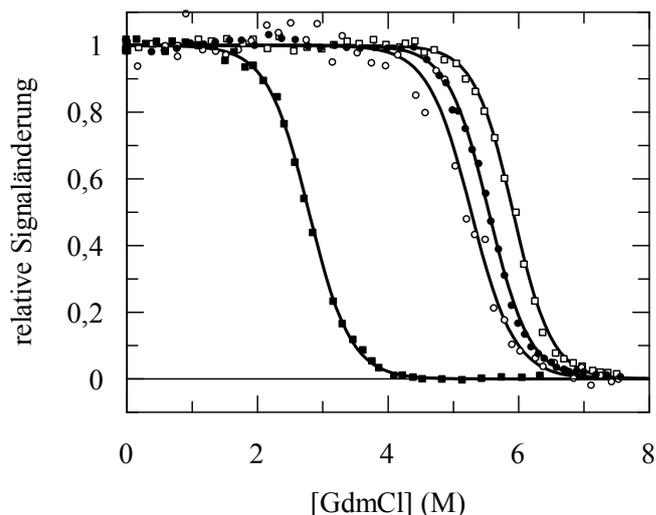


Abbildung 3.6.6: GdmCl-induzierte Entfaltung von WT-G $\beta$ 1 und verschiedenen Konzentrationen an G $\beta$ 1-M2. Aufgetragen sind die Anteile an der Signaländerung von 1  $\mu$ M WT-G $\beta$ 1 (■) und 0,25  $\mu$ M (○), 1  $\mu$ M (●) bzw. 10  $\mu$ M (□) G $\beta$ 1-M2 als Funktion der GdmCl-Konzentration. Die durchgezogenen Linien stellen Kurvenangleiche an die Messwerte unter Annahme des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$  dar. Die Übergänge wurden anhand der Fluoreszenz bei 342 nm nach Anregung bei 280 nm in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 25 °C gemessen. Die aus der Datenanalyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.6.4 aufgelistet.

Tabelle 3.6.4: Thermodynamische Parameter der GdmCl-induzierten Entfaltung von WT-G $\beta$ 1 bzw. G $\beta$ 1-M2.

Variante	[Protein] ( $\mu$ M)	[GdmCl] <sub>m</sub> (M)	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
WT-G $\beta$ 1	1	2,79	7,7	21,6
G $\beta$ 1-M2	0,25	5,27	7,5	39,6
	1	5,54	7,9	44,0
	10	5,92	8,4	49,5

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte [GdmCl]<sub>m</sub>, die Kooperativitätsparameter  $m$ , sowie die auf 0 M GdmCl extrapolierten freien Enthalpien der Entfaltung ( $\Delta G$ ) bei 25 °C. Die Übergänge wurden wie in Abbildung 3.6.6 beschrieben nach Anregung bei 280 nm anhand der Fluoreszenz bei 342 nm gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte gemäß des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$ .

Da die Stabilität der monomeren Form über Gleichgewichtsentfaltung nicht zugänglich war, wurde analysiert, inwieweit sich die Ausbildung von Dimeren auf den Faltungsmechanismus von G $\beta$ 1 auswirkt. Ziel war es dabei, wenn möglich die Kinetik der konformationellen Faltung des Monomers von der Einstellung des Monomer-Dimer-Gleichgewichtes zu trennen.

Wie bereits unter anderen Bedingungen gezeigt, folgen die Ent- und Rückfaltungskinetiken von WT-G $\beta$ 1 über den gesamten Denaturierungsmittelbereich einem monoexponentiellen Verlauf<sup>56; 186</sup>, wobei die Reaktionen innerhalb weniger Sekunden abgeschlossen sind (Abbildung 3.6.7a). Während der Rückfaltung von 0,25 bzw. 1  $\mu$ M vollständig entfaltetem G $\beta$ 1-M2 nach schneller Mischung in 3 M GdmCl ist ebenfalls nur eine schnelle Phase detektierbar, deren Zeitkonstante mit 63 bzw. 57 ms unabhängig von der Proteinkonzentration ist (Abbildung 3.6.7b). Dies deutet darauf hin, dass die Assoziationsreaktion unter nativen Bedingungen nicht den ratenlimitierenden Schritt darstellt.

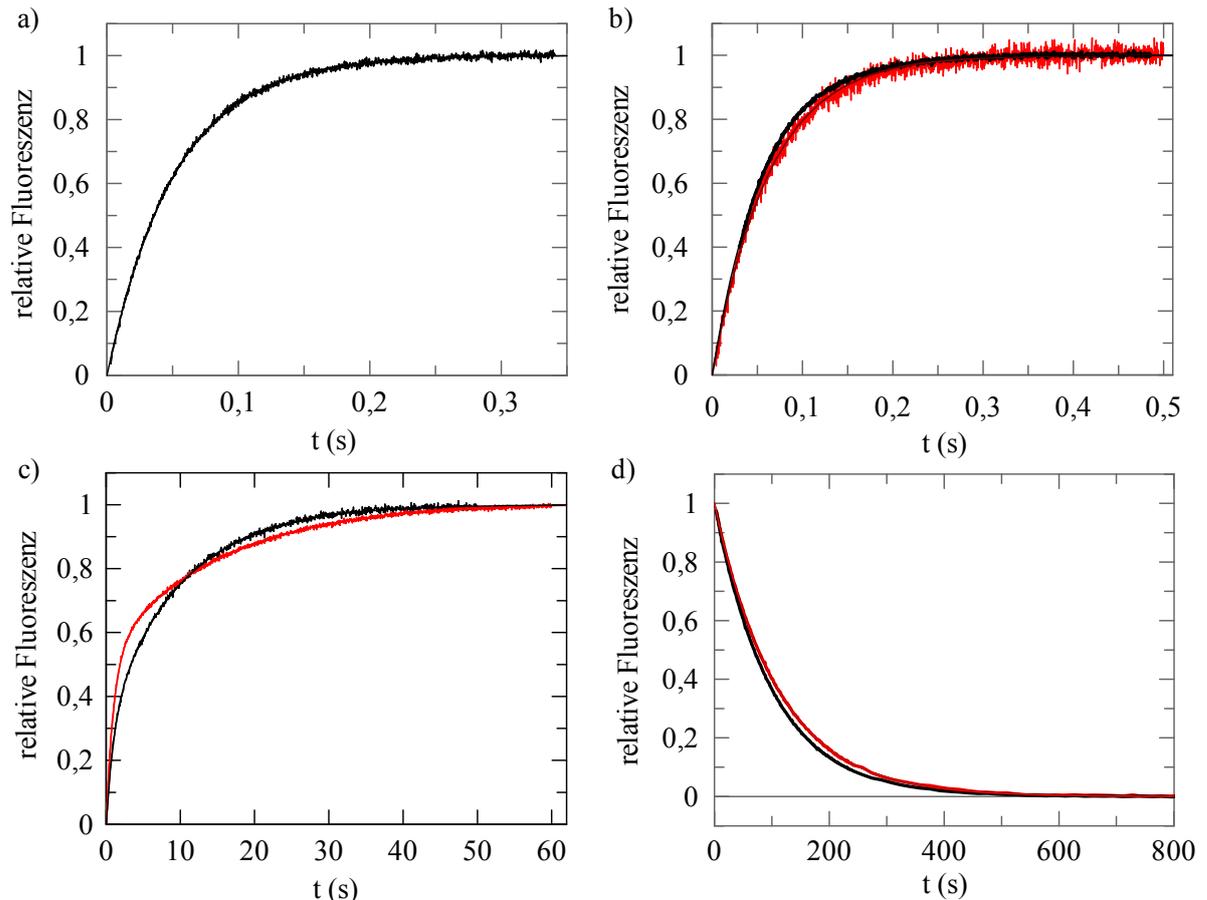


Abbildung 3.6.7: Faltungskinetiken von WT-G $\beta$ 1 bzw. verschiedener Konzentrationen an G $\beta$ 1-M2.

a) Gezeigt ist die normierte Rückfaltungsreaktion von 1  $\mu$ M WT-G $\beta$ 1 in 1,5 M GdmCl mit einer Zeitkonstante von  $\tau = 52$  ms. b-d) normierte Ent- und Rückfaltungskinetiken von 0,25  $\mu$ M (rot) bzw. 1  $\mu$ M G $\beta$ 1-M2 (schwarz) nach elffacher Verdünnung. b) Rückfaltungskinetik von entfaltetem G $\beta$ 1-M2 in 3 M GdmCl. Die durchgezogenen Linien stellen Angleiche von monoexponentiellen Funktionen an den Kurvenverlauf mit Zeitkonstanten von  $\tau(0,25 \mu\text{M}) = 63$  ms und  $\tau(1 \mu\text{M}) = 57$  ms bei 0,25 bzw. 1  $\mu$ M Protein dar. c) Rückfaltung des denaturierten G $\beta$ 1-M2 in 5,1 M GdmCl. Der Angleich biexponentieller Gleichungen an die Daten ergab Zeitkonstanten von  $\tau_1(0,25 \mu\text{M}) = 1,04$  s,  $\tau_2(0,25 \mu\text{M}) = 15,3$  s bzw.  $\tau_1(1 \mu\text{M}) = 1,07$  s,  $\tau_2(1 \mu\text{M}) = 10$  s. Die in a-c) gezeigten Reaktionen wurden nach schneller Mischung anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 280 nm aufgenommen. d) Die Entfaltung von nativem G $\beta$ 1-M2 wurde über die Signaländerung bei 342 nm nach Anregung bei 280 nm in 7,0 M GdmCl nach manueller Mischung gemessen. Aus dem Angleich monoexponentieller Gleichungen an die Reaktionsverläufe ergeben sich Zeitkonstanten von  $\tau(0,25 \mu\text{M}) = 109$  s bzw.  $\tau(1 \mu\text{M}) = 100$  s. Die Messungen wurden bei 25  $^{\circ}$ C in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 durchgeführt.

Bei der Rückfaltung in 5,1 M GdmCl und damit im Übergangsbereich (Abbildung 3.6.6) ergeben sich bei beiden Proteinkonzentrationen biphasische Kinetiken, deren erste Phasen nach Angleich einer doppelte exponentiellen Funktion mit Zeitkonstanten von 1,04 s bei 0,25  $\mu$ M bzw. 1,07 s bei 1  $\mu$ M G $\beta$ 1-M2 ebenfalls keine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zeigen. Dagegen steigt sowohl die Rückfaltungsrate als auch die Amplitude der zusätzlichen langsamen Reaktion mit zunehmender Konzentration an G $\beta$ 1-M2 an (Abbildung 3.6.7c). Der Zeitverlauf der Entfaltung in 7,0 M GdmCl ausgehend von nativem Protein ist dagegen wieder für beide Konzentrationen identisch (Abbildung 3.6.7d), allerdings sind die Reaktionen mit Zeitkonstanten von 100 s hundertfach gegenüber den Rückfaltungskinetiken verlangsamt. Zusätzliche schnelle Entfaltungsphasen konnten nicht

detektiert werden. Durch die Ausbildung von Dimeren ist die Entfaltung demnach deutlich verlangsamt.

Durch Variation der Ent- bzw. Rückfaltungsbedingungen wurden im Folgenden sowohl die Faltung der hyperstabilen Variante als auch die des WT-G $\beta$ 1 näher untersucht. Während in der Chevronauftragung die Entfaltungsraten des Wildtyp-Proteins in entsprechenden die Rückfaltungsraten übergehen (Abbildung 3.6.8a), ergeben sich für G $\beta$ 1-M2 in Abhängigkeit der Denaturierungsmittelkonzentration voneinander unabhängige Äste. Sowohl der Verlauf der schnellen Rückfaltung als auch der Entfaltungsast bei 6-7,5 M GdmCl sind dabei für die beiden untersuchten Proteinkonzentrationen identisch (Abbildung 3.6.8a).

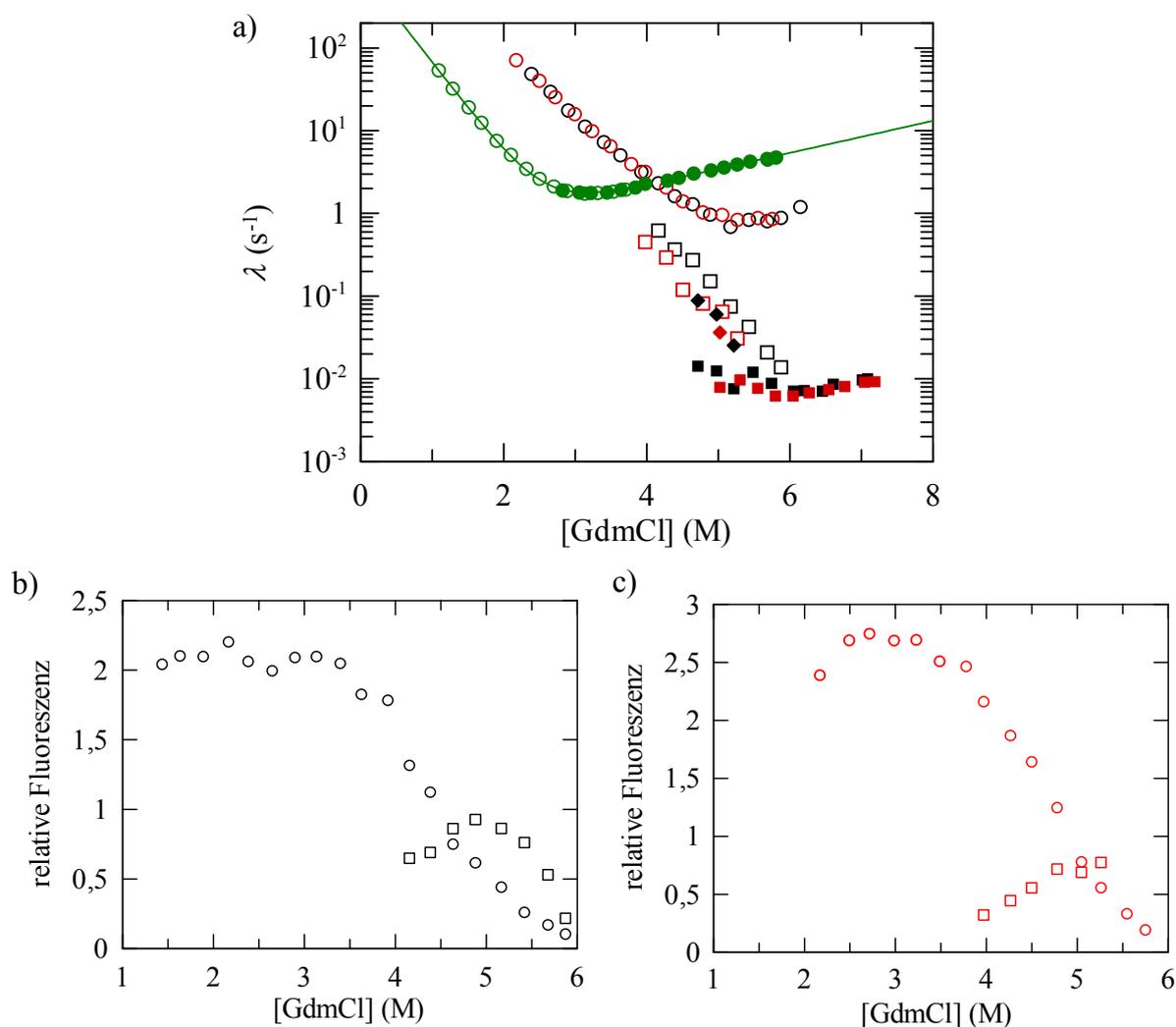


Abbildung 3.6.8: Analyse der Faltungs- und Entfaltungsraten von WT-G $\beta$ 1 und G $\beta$ 1-M2.

a) Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von 1  $\mu$ M WT-G $\beta$ 1 (grüne Symbole) und 0,25  $\mu$ M (rote Symbole) bzw. 1  $\mu$ M G $\beta$ 1-M2 (schwarze Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Raten der schnellen Ent- und Rückfaltungskinetiken (●;○;○;□;□) wurden nach *stopped-flow*-Mischung über die Änderung der Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 280 nm erhalten. Die Entfaltungsreaktionen ausgehend von nativem G $\beta$ 1-M2 wurden nach manueller Mischung anhand der Fluoreszenz bei 342 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt (■,■). b) und c) Amplituden der schnellen (Kreise) bzw. langsamen Phase (Quadrate) der Rückfaltung von b) 1  $\mu$ M und c) 0,25  $\mu$ M G $\beta$ 1-M2 als Funktion der GdmCl-Konzentration. Die entsprechenden Kinetiken wurden nach schneller Mischung anhand der Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 280 nm aufgenommen und durch Angleich biexponentieller Funktionen analysiert. Die durchgezogenen grüne Linie repräsentiert den Angleich gemäß eines Zweizustandsmodells an die Datenpunkte. Alle Messungen wurden nach elfacher Verdünnung bei 25 °C in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 durchgeführt.

Die im Übergangsbereich während der Faltung zusätzlich beobachtete Phase ist nicht nur von der G $\beta$ 1-M2 Konzentration sondern auch sehr stark vom Denaturierungsmittel abhängig, denn ihre Rate verringert sich zwischen 4 und 6 M GdmCl hundertfach. Im Vergleich zur schnellen Rückfaltungsphase, deren Amplitude kontinuierlich mit steigender Denaturierungsmittelkonzentration abnimmt, zeigt die Amplitude der langsamen Reaktion sowohl bei 1  $\mu$ M als auch bei 0,25  $\mu$ M Protein einen glockenförmigen Verlauf ( $\square$ ;  $\square$ , Abbildung 3.6.8b,c). Sie ist demnach nur im Übergangsbereich detektierbar, was die Vermutung nahelegt, dass sie die an die langsame Einstellung des Monomer-Dimer-Gleichgewichtes gekoppelte Verschiebung des Faltungsgleichgewichtes der Variante widerspiegelt. In diesem Fall stellt die Auswertung der Rückfaltungsdaten anhand von biexponentiellen Gleichungen jedoch eine starke Vereinfachung dar, denn die Assoziation zweier gleichartiger Moleküle ist eine bimolekulare Reaktion.

### 3.6.6 Über Doppelmischexperimente kann die Entfaltungsreaktion der monomeren Form des G $\beta$ 1-M2 sichtbar gemacht werden

Dass die beiden Ratenverläufe in G $\beta$ 1-M2 keinen zusammenhängenden Chevron bilden, deutet auf das Vorhandensein mindestens einer schnelleren Entfaltungsphase hin, die analog zum G3P\* durch die langsame Dissoziationsreaktion der Moleküle überdeckt wird. Um solche eventuell vorhandenen Reaktionen zu detektieren wurde in 7,4 M GdmCl entfaltetes G $\beta$ 1-M2 (16,5 bzw. 66  $\mu$ M) zunächst in einer *stopped-flow*-Doppelmischanlage nach elffacher Verdünnung nur kurz für 1,5 s in 4,8 M GdmCl rückgefaltet. Diese Zeit ist ausreichend, damit etwa 75 % der Moleküle falten können. Nach erneutem Sprung in höhere GdmCl-Konzentrationen durch sechsfache Verdünnung wurde der Verlauf der daraus resultierenden Entfaltung der Moleküle verfolgt.

Die erhaltene Kinetik ist monophasisch und mit einer Zeitkonstante von 0,5 s (in 7,4 M GdmCl) im Vergleich zur Entfaltungsreaktion ausgehend von nativem Protein 200fach beschleunigt (Abbildung 3.6.9a). Durch die Variation der Entfaltungsbedingungen während der Doppelmischexperimente im Bereich zwischen 5 und 7,5 M GdmCl konnte der Entfaltungsast der transient gebildeten Spezies aufgelöst werden. Er geht nicht nur in den Rückfaltungsast über, sondern die Raten sind außerdem unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration ( $\bullet$ ;  $\bullet$ , Abbildung 3.6.9b). Daraus wurde geschlussfolgert, dass dieser Chevronverlauf die konformationelle Entfaltung des monomeren G $\beta$ 1-M2 reflektiert. In diesem Fall findet die Assoziation nicht während der Faltung statt, sondern erfolgt, wie bereits aufgrund der Rückfaltungskinetiken im Übergangsbereich vermutet, in einer nachgelagerten, stillen Reaktion.

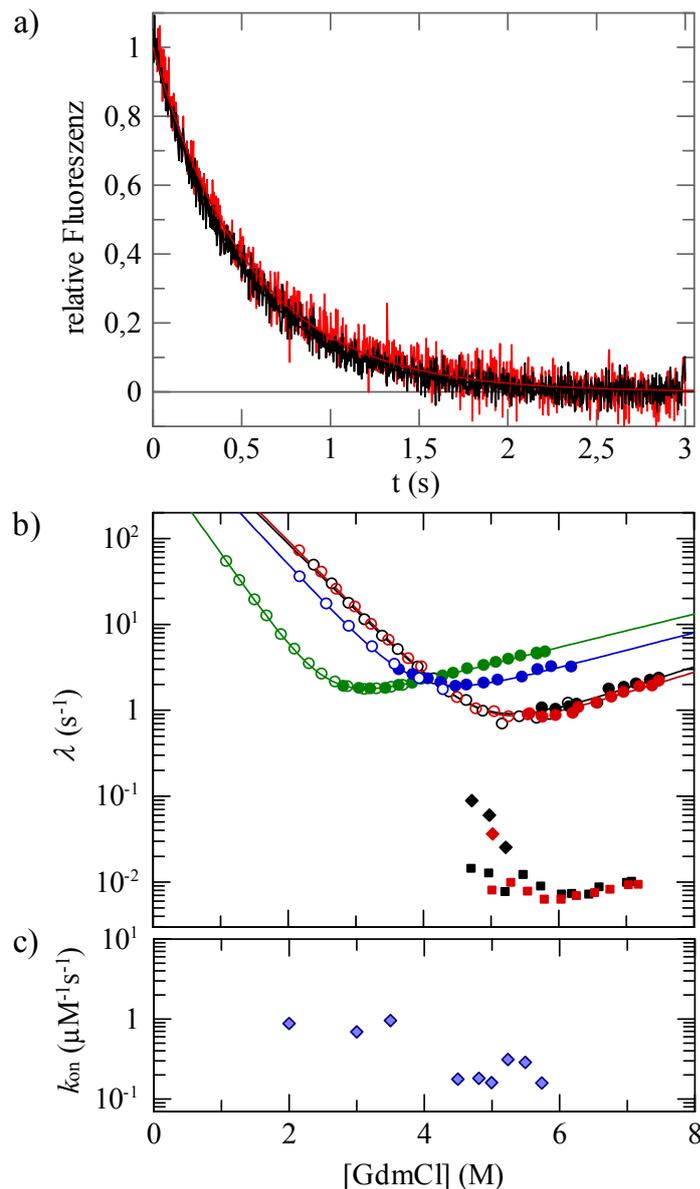


Abbildung 3.6.9: Analyse der Faltungs- und Entfaltungsraten von WT-G $\beta$ 1 und G $\beta$ 1-M2.

a) Entfaltungskinetiken von 0,25  $\mu\text{M}$  (rot) bzw. 1  $\mu\text{M}$  (schwarz) G $\beta$ 1-M2 in 7,0 M GdmCl nach Rückfaltung für 1,5 s in 4,8 M GdmCl mit Zeitkonstanten von  $\tau(0,25 \mu\text{M}) = 0,54 \text{ s}$  bzw.  $\tau(1 \mu\text{M}) = 0,5 \text{ s}$ . b) Aufgetragen sind die apparenten Entfaltungs- (gefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) von 1  $\mu\text{M}$  WT-G $\beta$ 1 (grüne Symbole), 1  $\mu\text{M}$  G $\beta$ 1-M2 L37N (blaue Symbole) und 0,25  $\mu\text{M}$  (rote Symbole) bzw. 1  $\mu\text{M}$  G $\beta$ 1-M2 (schwarze Symbole) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Gezeigt sind die Raten der Ent- und Rückfaltungskinetiken ( $\bullet$ ;  $\circ$ ;  $\blacklozenge$ ;  $\lozenge$ ;  $\bullet$ ;  $\circ$ ), welche nach *stopped-flow* Einzel- bzw. Doppelmischung über die Fluoreszenzänderung oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 280 nm erhalten wurden. Die Entfaltungsreaktionen ausgehend von nativem G $\beta$ 1-M2 ( $\blacksquare$ ,  $\blacklozenge$ ) wurden nach manueller Mischung anhand der Fluoreszenz bei 342 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Angleich gemäß des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$  an die Datenpunkte. Die daraus erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3.6.5 aufgelistet. c) Auftragung der Assoziationsraten, die nach Auswertung der Amplitudenverläufe in Abbildung 3.6.10 bzw. der Analyse der biphasischen Rückfaltungsreaktionen nach dem Modell in Gleichung 30 erhalten wurden ( $\blacklozenge$ ). Alle Messungen wurden bei 25  $^{\circ}\text{C}$  in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 durchgeführt.

Unter nativen Bedingungen ist das Monomer in der Lage vollständig zu falten, weshalb die Bildung der Dimere erst oberhalb von 4,0 M GdmCl indirekt über die Kopplung an die Faltungsreaktion spektroskopisch sichtbar wird. Anhand weiterer Doppelmischexperimente konnten analog zu den Experimenten mit fd G3P\* P213G (Kapitel 3.1.6) über den Verlauf der

Amplituden der schnellen Entfaltungsphase in Abhängigkeit von der Rückfaltungsdauer in 2,0, 3,0 bzw. 3,5 M GdmCl die jeweiligen Assoziationsraten bestimmt werden (Abbildung 3.6.10a-c). Dazu wurde die Rückfaltung von 1  $\mu$ M entfaltetem G $\beta$ 1-M2 über die Verdünnung in der entsprechenden Denaturierungsmittelkonzentration induziert. Nach variablen Zeiten wurde das Protein durch einen weiteren Verdünnungsschritt erneut in Entfaltungsbedingungen (7,0 M GdmCl) überführt. Die Amplitude der resultierenden Entfaltungsreaktion ist dabei ein Maß für die Menge der transient gebildeten gefalteten Monomere.

Nach Inkubation in 3,5 M GdmCl zur Rückfaltung und erneutem Sprung in 7,0 M GdmCl ergibt sich zunächst ein Anstieg der Amplitude. In dieser schnellen Phase wird die gefaltete monomere Form als Intermediat gebildet, bevor es zur Assoziation der Moleküle kommt. Dadurch nimmt die Konzentration an gefaltetem Monomer und damit die Amplitude der schnellen Entfaltungsreaktion in einer weiteren Phase wieder ab. Nach Rückfaltung in 2,0 bzw. 3,0 M GdmCl ist lediglich der Abfall dieser Amplitude beobachtbar. Unter diesen Bedingungen findet die konformationelle Faltung des G $\beta$ 1-M2-Monomers fast vollständig innerhalb der Totzeit der *stopped-flow*-Doppelmischung statt. Der Angleich an den Verlauf der Amplituden erfolgte unter der Annahme, dass die Faltung des Monomers und die Assoziation sequenzielle Reaktionen sind (Gleichung 30):



mit N und N<sub>2</sub> als der nativen monomeren bzw. dimeren Form und U als entfalteter Spezies. Die Parameter  $k_{on}$  und  $k_{off}$  entsprechen der Assoziations- bzw. Dissoziationsrate,  $k_{EF}$  und  $k_{RF}$  den mikroskopischen Ent- und Rückfaltungsraten des Monomers. Für die Auswertung der Kurvenverläufe anhand der nach Gleichung 30 aufgestellten Differenzialgleichungen (Kapitel 2.12.2.2, Gleichungen 31 - 33) wurde das Programm DynaFit<sup>131</sup> verwendet. Die Informationen über  $k_{EF}$  und  $k_{RF}$  wurden dabei aus dem Verlauf des Rückfaltungssastes ermittelt. Da im betrachteten GdmCl-Bereich monomeres G $\beta$ 1-M2 vollständig in den nativen Zustand übergeht und bei 1  $\mu$ M der hyperstabilen Variante gleichzeitig das Gleichgewicht deutlich auf der Seite des Dimers liegt, wurde bei den Berechnungen die Dissoziationskonstante  $k_{off}$  vernachlässigt. Die aus den Kurvenverläufen ermittelten Assoziationsraten liegen im Bereich von 0,69 (3,0 M GdmCl) bis 0,96  $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (2,0 M GdmCl, Abbildung 3.6.10).

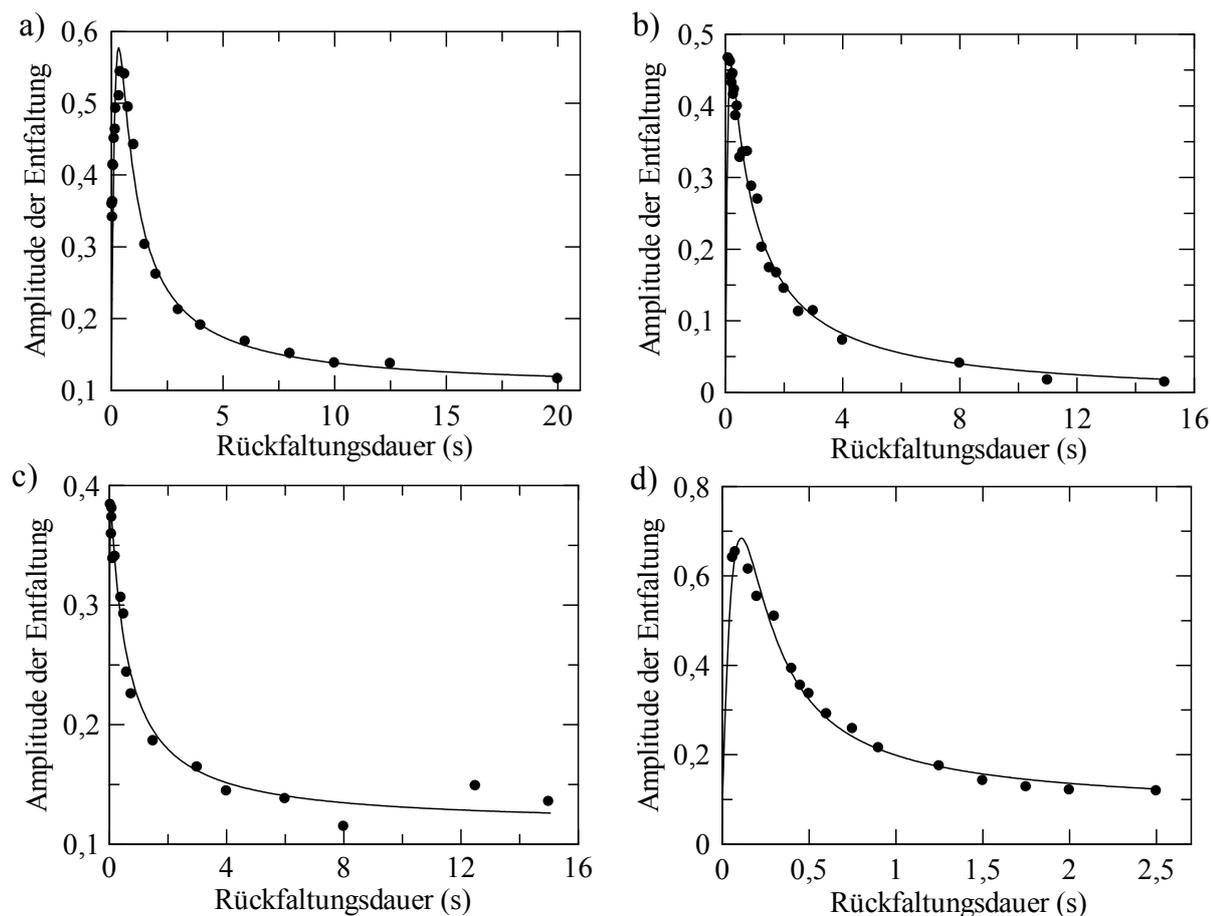


Abbildung 3.6.10. Bestimmung der Assoziationsrate von Gβ1-M2 in 2, 3 bzw. 3,5 M GdmCl. Aufgetragen sind die Amplituden der schnellen Entfaltungsphase in 7,0 M GdmCl nach *stopped-flow*-Mischung in Abhängigkeit der Rückfaltungsdauer in a) 3,5 M, b) und d) 3,0 M und c) 2,0 M GdmCl. In 7,4 M GdmCl denaturiertes Gβ1-M2-Protein wurde dabei durch elffache Verdünnung in 2,0, 3,0 bzw. 3,5 M GdmCl unterschiedlich lang rückgefaltet und danach durch sechsfache Verdünnung in 7,0 M GdmCl erneut entfaltet. Die Entfaltungsreaktionen wurden nach schneller Mischung anhand der Fluoreszenz oberhalb von 340 nm nach Anregung bei 280 nm in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 bei 25 °C verfolgt. Die Proteinkonzentrationen während der Rückfaltung betragen bei a)-c) 1 μM bzw. d) 6 μM. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Angleich an die Daten unter Verwendung des durch die Differentialgleichungen 31-33 beschriebenen Modells mit folgenden Assoziationskonstanten ( $k_{on}$ ): a)  $0,96 \pm 0,09 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  b)  $0,69 \pm 0,09 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  c)  $0,88 \pm 0,15 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  d)  $0,69 \pm 0,05 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Das Experiment wurde zusätzlich bei einer höheren Proteinkonzentration wiederholt, indem 6 μM Gβ1-M2 in 3,0 M GdmCl für variable Zeiten rückgefaltet wurde (Abbildung 3.6.10d). Die durch die Dimerisierung bedingte Abnahme der Amplitude der Entfaltungsreaktion erfolgt deutlich schneller als bei 1 μM Protein (Abbildung 3.6.10b). Der nach Angleich an die Daten erhaltene Wert für  $k_{on}$  ist dabei mit  $0,69 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  identisch zum Wert bei geringerer Gβ1-M2-Konzentration. Die Verläufe der Amplituden bestätigen damit noch einmal, dass nicht nur im Übergangsbereich sondern auch unter vollständig nativen Bedingungen die Bildung der Dimere in einer der Faltung des Gβ1-M2-Monomers nachgelagerten, jedoch spektroskopisch nicht sichtbaren Reaktion erfolgt.

Der in Abbildung 3.6.9b gezeigte Chevron von Gβ1-M2 kann daher verwendet werden, um nach Angleich gemäß eines Zweizustandsmodells über die mikroskopischen Raten  $k_{EF}$  und  $k_{RF}$  die Gleichgewichtskonstante und damit die freie Enthalpie der monomeren Form zu

bestimmen. Die sich daraus für 0,25 bzw. 1  $\mu\text{M}$  der hyperstabilen Variante ergebenden kinetischen und Stabilitätsdaten sind nahezu identisch (Tabelle 3.6.5).

Der Übergangsmittelpunkt des Monomers ist jeweils im Vergleich zum WT-G $\beta$ 1 deutlich um 2,3 M GdmCl auf 4,9 M GdmCl verschoben, was sich auch in den bei 3,5 M GdmCl berechneten  $\Delta G$ -Werten widerspiegelt. Die vier Substitutionen E15V, T16L, T18I und N37L stabilisieren danach G $\beta$ 1 um etwa 15 kJ mol $^{-1}$  (Tabelle 3.6.5). Dies entspricht interessanterweise der Summe der Beiträge zur freien Enthalpie, wie sie für die G $\beta$ 1-Proteine mit den entsprechenden Einzelsubstitutionen (Tabelle 3.6.2, Varianten 1 bis 4) nach thermisch-induzierter Entfaltung in 1,5 M GdmCl aus den jeweiligen  $\Delta G$ -Werten bei 70 °C ermittelt wurden.

Tabelle 3.6.5: Analyse der Faltung von WT-G $\beta$ 1, G $\beta$ 1-M2 L37N bzw. monomerem G $\beta$ 1-M2.

Variante	[Protein] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{EF}}$ (s $^{-1}$ )	$m_{\text{EF}}$ (M $^{-1}$ )	$k_{\text{RF}}$ (s $^{-1}$ )	$m_{\text{RF}}$ (M $^{-1}$ )	[GdmCl] $_{\text{m}}$ (M)	$m$ (kJ mol $^{-1}$ M $^{-1}$ )	$\Delta G$ (kJ mol $^{-1}$ )	$\Delta\Delta G$ (kJ mol $^{-1}$ )
WT-G $\beta$ 1	1	0,37	0,446	875	-2,56	2,6	7,5	-6,9	0
G $\beta$ 1-M2	0,25	0,033	0,553	3495	-1,81	4,9	5,9	8,2	15,1
	1	0,032	0,576	3111	-1,79	4,9	5,9	7,9	14,8
G $\beta$ 1-M2 L37N	1	0,19	0,466	2230	-1,91	3,9	5,9	2,6	9,5

Aufgelistet sind die mikroskopischen Entfaltungs- ( $k_{\text{EF}}$ ) und Rückfaltungsraten ( $k_{\text{RF}}$ ) extrapoliert auf 0 M GdmCl sowie die entsprechenden kinetischen  $m$ -Werte nach Auswertung der in Abbildung 3.6.9b gezeigten Daten gemäß des Zweizustandsmodells  $\text{N} \rightleftharpoons \text{U}$ . Der Übergangsmittelpunkt [GdmCl] $_{\text{m}}$ , die freie Enthalpie der Entfaltung ( $\Delta G$ ) bei 3,5 M GdmCl sowie Kooperativität  $m$  wurden über die Gleichungen 28-30 berechnet.  $\Delta\Delta G$  entspricht der Differenz der freien Enthalpien zwischen den Varianten und WT-G $\beta$ 1. Die Kinetiken wurden wie in Abbildung 3.6.9 beschrieben gemessen.

Dass sich die Stabilisierungen der vier Austausch additiv verhalten, zeigt sich auch in der Analyse der stabilisierten, jedoch monomeren Variante 8 (Tabelle 3.6.2), in der bis auf N37L alle stabilisierenden Substitutionen enthalten sind. Im Vergleich zu G $\beta$ 1-M2 entfaltet dieses Protein innerhalb weniger Sekunden, wobei die Ent- und Rückfaltungsraten der monophasischen Kinetiken einen Chevron bilden (Abbildung 3.6.9b). Durch Asparagin an Position 37 ist die Stabilität relativ zu G $\beta$ 1-M2 um 5,3 kJ mol $^{-1}$  herabgesetzt (Tabelle 3.6.5), was wiederum in etwa dem Stabilitätsgewinn von G $\beta$ 1-N37L gegenüber WT-G $\beta$ 1 entspricht ( $\Delta\Delta G^{70^\circ\text{C}} = 6,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ , Tabelle 3.6.2, Variante 4). Im Vergleich zum Wildtyp-Protein sind jedoch die Kooperativitäten der beiden Proteine G $\beta$ 1-M2 und Variante 8 leicht verringert (Tabelle 3.6.5). Dies ist wahrscheinlich auf den erhöhten Anteil an exponierten hydrophoben AS auf der Oberfläche zurückzuführen, die in G $\beta$ 1-M2 zur Dimerisierung führen.

### 3.6.7 Die Dissoziationskonstante des G $\beta$ 1-M2-Dimers liegt im nanomolaren Bereich

Aus den kinetischen Daten lässt sich der Anteil an nativem Protein in Abhängigkeit der GdmCl-Konzentration für die monomere Form berechnen und damit der GdmCl-induzierte

Übergang des gefalteten Gβ1-M2-Monomers bestimmen (Abbildung 3.6.11a). Danach ist der Verlauf selbst im Vergleich zu den Daten von 0,25 μM Gβ1-M2 deutlich zu niedrigeren GdmCl-Werten verschoben. Das bedeutet, dass die Dissoziationskonstante noch deutlich unterhalb dieser Proteinkonzentration liegt. Die Gleichgewichtsentfaltung bei 0,25, 1 bzw. 10 μM wird folglich jeweils über eine apparente Gesamtgleichgewichtskonstante  $K_{app}$  beschrieben, die sich nach dem Modell in Gleichung 30 wie folgt zusammensetzt:

$$K_{app} = \frac{[U]}{[N] + 2[N_2]} \quad \text{Gl. 35}$$

[U], [N] und [N<sub>2</sub>] entsprechen dabei den Konzentrationen der jeweiligen Spezies. Da außerdem die Stabilitätskonstante des Monomers  $K_U(\text{GdmCl})$  bekannt ist, kann anhand der im Kapitel 2.12.2.3 hergeleiteten Gleichungen 37 und 39 der  $K_D$ -Wert in Abhängigkeit der Protein- bzw. GdmCl-Konzentration bestimmt werden. Die Berechnung ist jedoch aufgrund der Fehleranfälligkeit lediglich im Übergangsbereich von 5,0 bis 5,8 M GdmCl, in dem jeweils mindestens 10 % natives bzw. 10 % denaturiertes Protein vorliegen, sinnvoll (Abbildung 3.6.11b).

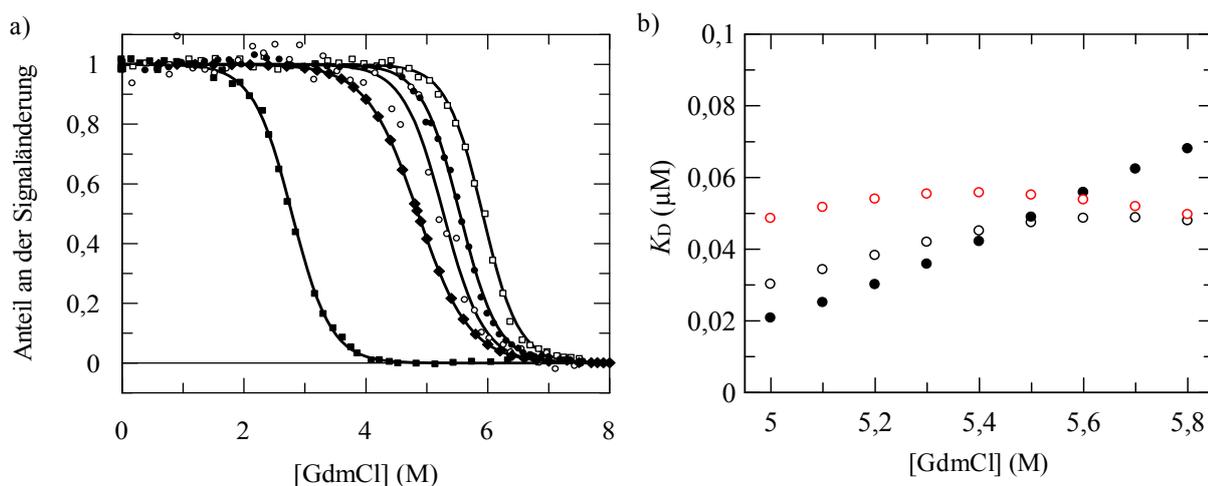


Abbildung 3.6.11: Bestimmung der  $K_D$ -Werte anhand der Gleichgewichtsübergänge von Gβ1-M2.

a) Aufgetragen sind die Anteile an der Signaländerung von 1 μM WT-Gβ1 (■) und 0,25 μM (○), 1 μM (●) bzw. 10 μM (□) Gβ1-M2 als Funktion der GdmCl-Konzentration. Die durchgezogenen Linien stellen Kurvenangleiche an die Messwerte unter der Annahme des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$  dar. Die Übergänge wurden anhand der Fluoreszenz bei 342 nm nach Anregung bei 280 nm in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 25 °C gemessen. Die Daten des Überganges des Monomers von Gβ1-M2 (◆) wurden anhand der kinetischen Daten von 1 μM Protein ermittelt (Tabelle 3.6.5). b) Auftragung der über  $K_{app}$ ,  $K_U$  und die jeweilige Proteinkonzentration (0,25 μM (○), 1 μM (●) bzw. 10 μM (●)) nach den Gleichungen 37 und 39 bestimmten Dissoziationskonstanten  $K_D$  in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration.

Zwar weichen die für die verschiedenen Konzentrationen an Gβ1-M2 bestimmten  $K_D$ -Werte leicht voneinander ab, in erster Näherung sind sie jedoch unabhängig von der Proteinkonzentration. Alle Werte liegen deutlich unterhalb von 0,1 μM, was anzeigt, dass der gebildete Komplex sehr stabil ist. Im hier betrachteten GdmCl-Bereich sind, wie in Abbildung 3.6.7c gezeigt, biphasische Kinetiken detektierbar, deren schnelle Reaktion die

Faltung des Monomers reflektiert. Die langsame Phase entspricht der Strukturierung von G $\beta$ 1-M2, die durch die Assoziation der Monomere limitiert wird. Durch erneute Auswertung der Reaktionsverläufe von 1  $\mu$ M Protein mit Hilfe des Programms DynaFit und den auf dem Modell in Gleichung 30 basierenden Differenzialgleichungen 31 - 33 (Kapitel 2.12.2.2) ergaben sich die entsprechenden Dissoziations- und Assoziationsraten in Abhängigkeit der GdmCl-Konzentration (Tabelle 3.6.6).

Tabelle 3.6.6: Berechnete Dissoziationskonstanten des Dimers von G $\beta$ 1-M2 im Übergangsbereich.

[GdmCl] <sub>m</sub> (M)	$k_{\text{on}}$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{off}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{D}}^{\text{kin}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{\text{D}}$ ( $\mu\text{M}$ )
5,74	0,16	0,008	0,05	0,049
5,50	0,29	0,005	0,03	0,047
5,24	0,24	0,003	0,01	0,040
4,99	0,12	0,001	0,01	0,030
4,81	0,18	0,002	0,01	0,023

Die Assoziations- ( $k_{\text{on}}$ ) und Dissoziationsraten ( $k_{\text{off}}$ ) wurden durch die Analyse der biphasischen Rückfaltungskinetiken anhand der Gleichungen 31 - 33 mit Hilfe des Programmes DynaFit erhalten. Die  $K_{\text{D}}^{\text{kin}}$ -Werte ergeben sich aus dem Quotienten dieser Raten ( $K_{\text{D}}^{\text{kin}} = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ ). Der  $K_{\text{D}}$ -Wert wurde außerdem anhand der Gesamtgleichgewichtskonstante des Überganges mit 1  $\mu$ M Protein und der Stabilitätskonstante des Monomers  $K_{\text{U}}$  berechnet (Gleichungen 37 und 39). Der Fehlerbereich von  $k_{\text{off}}$  liegt bei  $\pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ , die von  $k_{\text{on}}$  und  $K_{\text{D}}^{\text{kin}}$  bei  $\pm 0,03 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bzw.  $\pm 0,01 \mu\text{M}$ .

Für die Angleiche wurden  $k_{\text{EF}}$  und  $k_{\text{RF}}$  wiederum anhand des Chevrons des Monomers bestimmt und konstant gehalten. Dabei zeigte sich, dass die Assoziationsraten im Vergleich zu den über Doppelmischexperimente erhaltenen Daten bei 2,0, 3,0 bzw. 3,5 M GdmCl leicht verringert sind. Sie besitzen jedoch die gleiche Größenordnung (Abbildung 3.6.9c). Ähnlich verhält es sich mit den jeweiligen  $K_{\text{D}}^{\text{kin}}$ -Werten, die sich aus dem Quotienten von  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  berechnen lassen (Tabelle 3.6.6). In erster Näherung stimmen diese mit den anhand der Gleichgewichtsübergänge ermittelten  $K_{\text{D}}$ -Werten überein (Tabelle 3.6.6, Abbildung 3.6.11). Einen großen Anteil an den niedrigen Dissoziationskonstanten haben die geringen  $k_{\text{off}}$ -Werte. Sie zeigen an, dass der einmal gebildete Komplex durch die Wechselwirkungen zwischen den Monomeren stark stabilisiert wird. Über die Stabilität des Dimers in Abwesenheit von GdmCl kann zwar keine Aussage getroffen werden. Die erhöhte Assoziationsrate von  $0,96 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  in 2 M GdmCl lässt jedoch vermuten, dass die Stabilität des Komplexes unter diesen Bedingungen sogar noch größer ist.



## 4. Zusammenfassende Diskussion

Viele biotechnologische Verfahren zur *in vitro* Evolution z.B. auf erhöhte Stabilität oder Bindungsfähigkeit von Proteinen basieren auf dem *phage display*, für das hauptsächlich filamentöse Phagen wie der fd Phage verwendet werden.<sup>26-28</sup> Diese Phagen infizieren *E. coli* Zellen, indem ihr G3P zunächst mit dem F-Pilus und anschließend der C-terminalen Domäne des Membranproteins TolA (TolAC) der Zelle interagiert. Der fd Phage kommt je nach Konformation seines G3P in aktiver bzw. inaktiver Form vor. Im gedockten jedoch inaktiven Ruhezustand sind die beiden N-terminalen Domänen N1 und N2 des G3P miteinander assoziiert.<sup>60; 72; 73; 96</sup> Die Interaktion wird dabei größtenteils über ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen der Gelenkregion und N1 ermöglicht.<sup>62</sup> Da dadurch jedoch die Interaktionsfläche auf N1 für TolAC verborgen ist, muss das G3P für die Infektion aktiviert werden. Dazu interagiert der globuläre Teil der N2-Domäne mit dem Pilus, woraufhin Pro213 in die *trans*-Konformation wechselt und die Gelenkregion entfaltet wird. Diese strukturellen Veränderungen führen zur Dissoziation der Domänen und die N1-Domäne kann an TolAC binden. Der Vergleich der Infektiositäten verschiedener fd Phagenvarianten gegenüber pilushaltigen *E. coli* Zellen, unter anderem in dieser Arbeit, hat gezeigt, dass das G3P des Wildtyp-Phagen in seiner Stabilität und seinem Faltungsmechanismus optimal an diesen Infektionsmechanismus angepasst ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben einen detaillierten Einblick, welche strukturellen Elemente des G3P sowohl für die Aufrechterhaltung der gedockten Form im Ruhezustand als auch für deren Übergang in die aktive Konformation wichtige Funktionen übernehmen. Neben der lokalen Sequenz um das als Schalter fungierende Pro213 und neben der Stabilität der Gelenkregion ist dabei insbesondere die Interaktion zwischen der ersten Schleife der N1-Domäne und Resten des globulären Teils von N2 von zentraler Bedeutung (Abbildung 4.1).

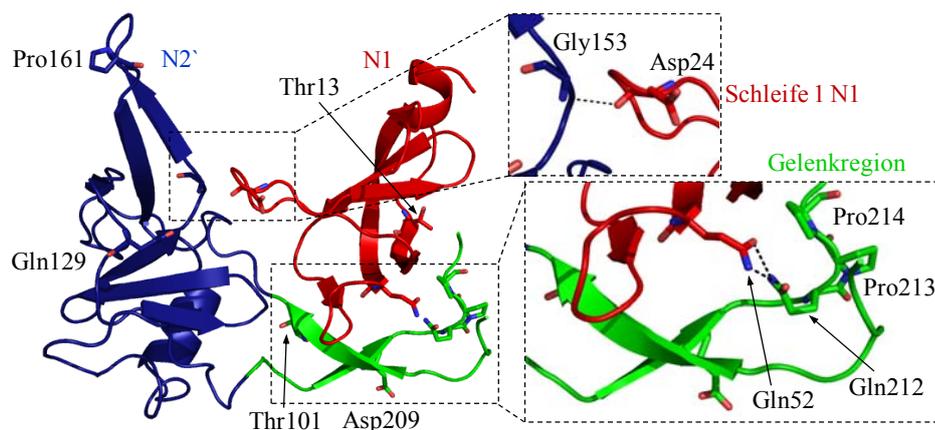


Abbildung 4.1: Funktionell wichtige Tertiärstrukturbereiche im N1N2-Fragment von WT fd G3P\*.

Die Reste Asp24, Gln52, Gly153, Pro161, Gln212, Pro213 und Pro214 sowie die Positionen der stabilisierenden Substitutionen im fd G3P\* IHY sind als Stäbchen-Modelle gezeigt. Die N1-Domäne ist in rot, der globuläre Teil von N2 (N2') in blau und die Gelenkregion in grün dargestellt. Die obere Vergrößerung zeigt die Schleife 1 von N1, deren Asp24 mit Gly153 in N2' interagiert. Gln212 in der Gelenkregion bildet mit Gln52 zwei Wasserstoffbrücken aus (untere Vergrößerung), wenn Pro213 in *cis*-Form vorliegt. Die Abbildung wurde anhand der PDB-Struktur 2G3P<sup>60</sup> mit dem Programm Pymol<sup>123</sup> erstellt.

## 4.1 Die Stabilität der Gelenkregion beeinflusst die Funktionalität des G3P

### 4.1.1 Die aktive Form des WT fd G3P\* liegt nicht im lose-assoziierten Zustand vor

Die Analyse des WT fd G3P\* mittels NMR-Spektroskopie hat gezeigt, dass im langlebigen Faltungsintermediat des Wildtyp-Proteins vor allem die Stärke der Domäneninteraktion stark herabgesetzt ist, wodurch die Gelenkregion mit *trans*-Pro213 vollständig entfaltet vorliegt. In der stabilisierten Variante fd G3P\* IIHY führen dagegen die beiden in ihrer Gelenkregion lokalisierten Substitutionen T101I und D209Y (Abbildung 4.1) zu einer deutlichen Stabilisierung dieser Region und damit von N2. Im langlebigen Faltungsintermediat des fd G3P\* IIHY mit Pro213 im nicht-nativen *trans*-Konformer liegt dabei die Gelenkregion teilweise gefaltet vor und N1 und N2 sind lose miteinander assoziiert.<sup>62</sup>

Der Unterschied zwischen dem WT fd G3P\* und der Variante fd G3P\* IIHY spiegelt sich auch in ihren Faltungsmechanismen wider. Die Faltung des Wildtyp-G3P\* erfolgt zwar im gleichen Zeitbereich wie die der stabilisierten Variante, jedoch liegt das langlebige Faltungsintermediat, das gleichzeitig der biologisch aktiven Form entspricht, nicht in einem lose-assoziierten Zustand vor. Nach der Rückfaltung von N1 und des globulären Teils der N2-Domäne wird letztere lediglich durch die nachgelagerte Isomerisierung von Pro161 mit einer Zeitkonstante von 100 s leicht stabilisiert (Abbildung 4.2). In fd G3P\* IIHY wird die Stabilität der N2-Domäne nach ihrer Faltung unmittelbar erhöht, da die Gelenkregion teilweise faltet, und so N2 direkt in die lose-assoziierte Form überführt wird. Im WT fd G3P\* ist die Gelenkregion wesentlich weniger stabil. Ihre Strukturierung und die Assoziation der Domänen werden daher erst durch die abschließende, sehr langsame *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro213 ( $\tau = 5600$  s, Abbildung 4.2) ermöglicht, die auch in der stabilisierten Variante zur Einnahme des inaktiven, gedockten Zustandes führt.

Die Entfaltung der N1-Domäne aus dem nativen Zustand des WT fd G3P\* erfolgt analog zum fd G3P IIHY gekoppelt an die N2-Domäne (Abbildung 4.2). Während jedoch in der stabilisierten Variante die Denaturierung der Domänen zumindest bei intermediären GdmCl-Konzentrationen abhängig ist von der Konformationsänderung des Pro213, ist die konformationelle Entfaltung der Domänen im WT fd G3P\* über den gesamten Denaturierungsmittelbereich schneller als die *cis*→*trans*-Isomerisierung von Pro213 (Abbildung 4.2). Die Nachstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes erfolgt nur langsam, weshalb die Rückfaltung des G3P\* nach kurzem Entfaltungspuls direkt in den gedockten Zustand möglich ist. Im Ruhezustand bewirkt demnach die langsame Isomerisierung des Pro213 die schnelle Einnahme der stabilen Konformation z.B. nach kurzzeitiger Veränderung der Umweltbedingungen, durch die die N-terminalen Domänen entfaltet wurden. Zudem verringert sie die Wahrscheinlichkeit der spontanen Domänen dissoziation, durch die die N2-Domäne stark destabilisiert wird.

Im fd G3P\* IIHY wird der native Zustand durch die Substitutionen in der Gelenkregion zusätzlich stabilisiert, was dazu führt, dass die Variante im Gegensatz zum Wildtyp-G3P\*

weder *in vitro* mit gereinigtem TolAC-AEDANS noch *in vivo* mit dem TolAC pilusfreier Zellen interagieren kann. Die Austausch T101I und D209Y verhindern demnach die spontane Dissoziation von N1 und N2, was zumindest für die Stabilität des G3P im Ruhezustand von Vorteil ist.

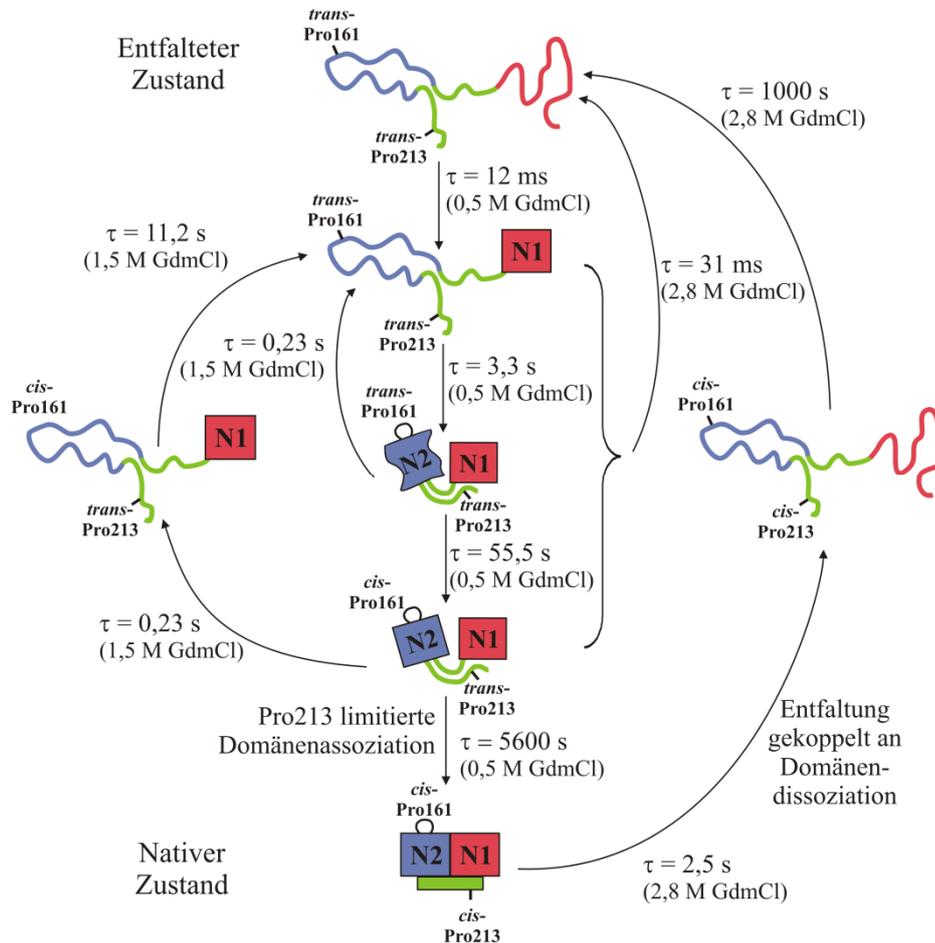


Abbildung 4.2: Modell des Faltungsmechanismus des Wildtyp-G3P\*.

Angegeben sind die Zeitkonstanten  $\tau$  der Entfaltungsreaktionen der beiden N-terminalen Domänen bei 1,5 bzw. 2,8 M GdmCl sowie die Rückfaltungsreaktionen in 0,5 M GdmCl. Zu Beginn der Rückfaltung geht zunächst die N1-Domäne in den nativen Zustand über (rotes Quadrat). Die Faltung der N2-Domäne (blaues Quadrat) und damit die Population des langlebigen Faltungsintermediates erfolgt in zwei sequenziellen Schritten. Nach der konformationellen Faltung des globulären Teils in die *trans*-Form kommt es zur nachgelagerten Isomerisierung von Pro161 in die *cis*-Konformation. Die Einnahme der nativen Form wird durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro213 verursacht, wodurch die Gelenkregion (grünes Rechteck) faltet. Aufgrund der Assoziation der Domänen ist ihre Entfaltung nicht nur deutlich verlangsamt, sondern auch gekoppelt. Dabei kommt es zunächst zur konformationellen Entfaltung der Domänen. Die Nachstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes von Pro213 erfolgt wiederum in einer nachgelagerten, langsamen Reaktion. Die Entfaltung der Domänen aus dem Intermediatszustand ist dagegen entkoppelt und zudem deutlich beschleunigt. Die Abbildung wurde nach Referenz<sup>122</sup> modifiziert.

#### 4.1.2 Im langlebigen Intermediat ist die Affinität der N1-Domäne des G3P\* gegenüber TolAC deutlich erhöht

Aus den Infektionsexperimenten mit pilushaltigen Zellen geht hervor, dass der Phage fd G3P IIHY weniger infektiös ist als der WT fd Phage. Im WT fd G3P ist die Stabilität von N2 und damit der Gelenkregion so eingestellt, dass im Ruhezustand ausreichender Schutz durch die Domänenassoziation gewährleistet ist. Beim Übergang in die aktive Form durch die

*cis*→*trans*-Isomerisierung von Pro213 entfaltet die Gelenkregion jedoch komplett, wodurch das Wasserstoffbrückennetzwerk mit der N1-Domäne aufgelöst und die Interaktionsfläche für TolAC auf der N1-Domäne gut zugänglich wird. Dies zeigt sich unter anderem in der relativ zum nativen WT fd G3P\* hundertfach erhöhten Affinität der intermediären Form für TolAC-AEDANS, die damit nur unwesentlich gegenüber der der isolierten N1-Domäne verringert ist. Diese drastische Zunahme der Bindungsfähigkeit des G3P deckt sich dabei mit *in vivo* Experimenten von Barbara Eckert, in denen die Phageninfektiosität durch einen Entfaltungsschritt stark erhöht werden konnte.<sup>96</sup>

Im gedockten Zustand ist die Affinität des WT fd G3P\* für TolAC aufgrund der Interaktion von N1- und N2-Domäne deutlich schlechter. Die NMR-Titration von nativem Wildtyp-Protein mit TolAC in hoher Konzentration hat jedoch gezeigt, dass dieses die N2-Domäne verdrängen und damit den gedockten Zustand auflösen kann. Dadurch ist die Gelenkregion wie im langlebigen Faltungsintermediat vollständig entfaltet und vor allem die Stabilität der N2-Domäne deutlich verringert. Dies bestätigt noch einmal, dass das Faltungsintermediat, in dem Pro213 in *trans*-Konformation vorliegt, der bindungsaktiven Form des G3P entspricht.

In der stabilisierten Variante verstärken die zusätzlichen Substitutionen in der Gelenkregion die Domänenassoziation sowohl im nativen als auch im Intermediatzustand. Diese Interaktionen führen dazu, dass während der Rückfaltung des Proteins in Gegenwart von TolAC-AEDANS durch die Einnahme des lose-assoziierten Zustandes der größte Teil von TolAC aus dem Komplex mit der N1-Domäne verdrängt wird. Die apparente Bindung von TolAC an das langlebige Intermediat des fd G3P IIHY ist folglich deutlich schwächer als die Bindung an das entsprechende Intermediat des WT fd G3P\*. Für die optimale Wechselwirkung der N1-Domäne an TolAC muss die Gelenkregion demnach vollständig entfaltet sein.

## **4.2 Die Sequenz um Pro213 reguliert den Übergang in den gedockten Zustand des G3P**

### **4.2.1 Durch die Substitution des Pro213 gegen Glycin liegt das Wildtyp-G3P zum Teil in geöffneter Form vor**

Während die Stabilität der Gelenkregion indirekt die Wechselwirkung von TolAC mit der N1-Domäne im aktiven Intermediat beeinflusst, wird die Lebensdauer dieses Zustandes des G3P durch die sehr langsame Isomerisierung von Pro213 und die damit verbundene Assoziation der Domänen limitiert.<sup>96; 120</sup> Die Substitution des Prolinrestes gegen Glycin hat folglich nicht nur gravierende Auswirkung auf die Stabilität der N-terminalen Domänen, sondern auch auf die Einnahme des gedockten Zustandes. Die Interaktion der N1- mit der N2-Domäne ist deutlich geschwächt. Der Übergangsmittelpunkt der N2-Domäne des entsprechenden fd G3P\* P213G liegt nur um 3,2 °C über dem der isolierten N2-Domäne. Die Analyse des Faltungsmechanismus hat gezeigt, dass die Einnahme des gedockten Zustandes und damit die

Stabilisierung der N2-Domäne durch die P213G-Substitution teilweise verhindert werden. Das Protein liegt in nativem Zustand folglich als Mischung aus gedockten und geöffneten Molekülen vor. Diese Beobachtung erklärt Ergebnisse von Infektionsexperimenten, die von Barbara Eckert durchgeführt worden waren. Demnach infiziert der entsprechende Phage im nativen Zustand pilusfreie Zellen, bei deren Infektion es auf die Zugänglichkeit der N1-Domäne ankommt, hundertfach besser als der Wildtyp-Phage.<sup>96</sup>

Zumindest ein kleiner Teil des fd G3P\* P213G liegt trotzdem in assoziierter Form vor, wodurch die N2-Domäne leicht stabilisiert wird. Die Zeitkonstante der Domänenassoziationsreaktion, die unabhängig voneinander über einen Zweischritt-Entfaltungstest bzw. die Rückfaltung des fd G3P\* P213G in Gegenwart von TolAC-AEDANS bestimmt wurde, beträgt etwa 750 s und ist damit deutlich schneller als die durch die Isomerisierung von Pro213 limitierte Domänenassoziation ( $\tau = 5600$  s). Dass die 750-s Faltungsreaktion ebenfalls prolinlimitiert ist, zeigt die Katalysierbarkeit durch die Prolylisomerase hFKBP12+IF. Der Befund ist ein Hinweis darauf, dass womöglich eines der sechs weiteren Prolinreste in der Gelenkregion die Rolle des Schalters übernimmt. In Frage kommen dabei vor allem die beiden in unmittelbarer Nähe von Position 213 gelegenen Proline 211 und 214.

Die assoziierte Form von fd G3P\* P213G ist im Vergleich zum nativen WT fd G3P\* ebenfalls stark destabilisiert, was zum einen auf die deutlich schnellere Isomerisierung des betroffenen Prolinrestes zurückgeführt werden kann. Auf der anderen Seite müssen zur Ausbildung des stabilisierenden Wasserstoffbrückennetzwerkes die N1-Domäne und die Gelenkregion optimal zueinander orientiert sein. Durch die Isomerisierung eines anderen Prolins ergibt sich möglicherweise eine leicht veränderte Konformation.

Im Gegensatz zum fd G3P\* P213G liegt die stabilisierte Variante fd G3P\* IIHY P213G trotz der Substitution des Prolinschalters vollständig in geschlossener Form vor. Die Klärung der Struktur dieser Variante könnte wahrscheinlich Aufschluss darüber geben, wie in Abwesenheit des Pro213 der geschlossene Zustand eingenommen wird und welche (Prolin-)Reste dabei eine wichtige Rolle spielen.

#### **4.2.2 Die Auswirkung der Austausch Q212A und P214A ist abhängig von der Natur des Restes an Position 213**

Die ungewöhnlich langsame Isomerisierung des Pro213 wird maßgeblich beeinflusst von seinen benachbarten Resten Gln212 und Pro214. Dies konnte unter anderem anhand eines Pentapeptids mit der entsprechenden Sequenz gezeigt werden, für das eine vergleichbar hohe Zeitkonstante der *trans*→*cis*-Isomerisierung ermittelt wurde.<sup>96</sup> Die Substitution des Gln212 zu Alanin führt zu einer zweifachen Beschleunigung der Einnahme des gedockten Zustandes, die *trans*→*cis*-Isomerisierung des Pro213 in der Variante fd G3P\* P214A ist sogar dreifach schneller.<sup>96</sup> Im nativen G3P\* mit *cis*-Pro213 übernimmt Gln212 zusätzlich eine wichtige stabilisierende Funktion bei der Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzwerkes, indem es zwei Wasserstoffbrücken zum Gln52 in der N1-Domäne ausbildet (Abbildung 4.1). Pro214

wirkt sich durch seine Starrheit vermutlich indirekt stabilisierend auf die gedockte Form aus, wodurch *cis*-Pro213 einrastet und der Übergang in die *trans*-Konformation erschwert wird.

Die Infektiositäten der entsprechenden Phagenvarianten gegenüber pilusfreien Zellen<sup>96</sup> und die Analyse der thermischen Stabilität lassen jedoch vermuten, dass analog zum fd G3P\* P213G nicht alle Moleküle des fd G3P\* Q212A bzw. fd G3P\* P214A den geschlossenen Zustand einnehmen. Der  $T_M$ -Wert von fd G3P\* Q212A ist mit 39,4 °C nur geringfügig gegenüber dem des P213G-substituierten G3P\* ( $T_M = 37,8$  °C) erhöht, der Übergangsmittelpunkt des fd G3P\* P214A befindet sich bei 41 °C.

Der destabilisierende Effekt der einzelnen Austausche Q212A und P214A ist vergleichbar mit der Auswirkung der P213G-Substitution. In Kombination führen die Austausche der zu Pro213 benachbarten Reste zumindest im Wildtyp-Protein zur vollständigen Auflösung der Domäneninteraktion, wodurch die N2-Domäne stark destabilisiert wird. Deren Übergangsmittelpunkt ist nur um 2 °C gegenüber der isolierten N2-Domäne erhöht, was vermutlich auf einen leichten Zusammenhalt ihrer Enden durch die flankierenden Reste der Gelenkregion zurückgeführt werden kann. Die Affinität der N1-Domäne von fd G3P\* APA für TolAC befindet sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Bereich der Affinität der isolierten N1-Domäne. Trotz des noch vorhandenen Prolinschalters kann folglich das stabilisierende Wasserstoffbrückennetzwerk nicht ausgebildet werden. Dafür verantwortlich ist neben dem Verlust der lokalen Wechselwirkungen von Gln212 bzw. der Fixierung durch die starre Konformation des Pro214 vermutlich auch die Beschleunigung der Isomerisierung von Pro213. In dem von der modifizierten Sequenz abgeleiteten Pentapeptid Abz-AAPAA-pNA erfolgt die Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes an Pro213 mit einer Zeitkonstante von 29 s bei 25 °C (Daten nicht gezeigt), was einer 200fachen Beschleunigung der Isomerisierung relativ zum Peptid Ac-AQPPV-OH entspricht.<sup>96</sup>

In fd G3P\*APA setzt zudem Pro213 selbst durch die Einschränkung seiner möglichen Konformationen die Flexibilität der Polypeptidkette stark herab, weshalb die Einnahme alternativer Orientierungen erschwert wird. Anders verhält es sich, wenn zusätzlich zu den Substitutionen Q212A und P214A auch Pro213 gegen Glycin ausgetauscht wird. In der entsprechenden Variante fd G3P\*AGA wirkt sich die destabilisierende Wirkung der beiden benachbarten Reste nicht mehr aus, vielmehr ist der P213G-Austausch und damit der Verlust des Prolinschalters von entscheidender Bedeutung. Die Stabilität der N2-Domäne der Variante ist identisch zu der von N2 im fd G3P\* P213G. Im Gegensatz zum P213G-substituierten G3P\* liegt fd G3P\* AGA allerdings nicht als Mischung aus nicht assoziierten und gedockten Molekülen vor. Anhand der Analyse des Faltungsmechanismus konnte gezeigt werden, dass die Variante fd G3P\*AGA in einen Zustand übergeht, der leicht gegenüber der nicht assoziierten Form des Wildtyp-Proteins bzw. fd G3P\*APA stabilisiert ist. Wie im fd G3P\*APA fehlen sowohl Pro214 als auch Gln212, die den gedockten Zustand stabilisieren. Durch Gly213 ist jedoch die Flexibilität der Gelenkregion erhöht und damit auch eine leicht veränderte, dafür aber stabilisierende Anordnung möglich, in der durch die Wechselwirkung mit N1 deren Zugänglichkeit für TolAC und damit die Affinität verringert ist.

Die Ergebnisse bekräftigen, dass nicht Pro213 alleine, sondern die lokale Sequenz um diesen Rest wichtig ist. Die drei AS Gln212, Pro213 und Pro214 kooperieren und vermitteln damit sowohl die Aufrechterhaltung der stabilen Konformation im Ruhezustand als auch die hohe Lebensdauer des aktiven Intermediates. Nach der *trans*→*cis*-Isomerisierung sorgt Pro213 durch seine geringe Flexibilität für die optimale Orientierung der Reste der Gelenkregion relativ zur N1-Domäne. Diese Anordnung wird durch den Einfluss der benachbarten Reste Gln212 und Pro214 stabilisiert, wodurch die Strukturierung der gesamten Gelenkregion und der Aufbau des Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen der Gelenkregion und der N1-Domäne ermöglicht werden. Die Kooperation der Reste 212-214 erklärt auch, warum bei *Proside*-Selektionen mit Bibliotheken, in denen die drei Positionen jeweils einzeln randomisiert waren, nicht nur Pro213, sondern auch die beiden ursprünglichen Reste Gln212 und Pro214 erhalten wurden.<sup>79</sup> Die Balance zwischen ausreichender Stabilität auf der einen und höchstmöglicher Funktionalität auf der anderen Seite ist folglich im G3P des Wildtyp-Phagen bereits optimal eingestellt.

#### **4.3 Die Interaktion der ersten Schleife von N1 mit dem globulären Teil von N2 stabilisiert den assoziierten Zustand**

Aus dem Faltungsmechanismus des WT fd G3P\* geht hervor, dass die Weiterleitung des Signals der Bindung der N2-Domäne an den Pilus nicht nur zur Entfaltung der Gelenkregion sondern auch zur Isomerisierung von Pro213 führen muss, damit der aktive Zustand lange genug geöffnet bleibt. Wie sich die N2-Domäne durch die Interaktion mit dem Pilus verändert, ist nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass sie zumindest partiell entfaltet, wodurch die Stärke der Assoziation mit der N1-Domäne deutlich verringert wird. Die Ausbildung einer Interdomänendisulfidbrücke durch den Austausch des Asp24 in der ersten Schleife von N1 und dem im globulären Teil von N2 gelegenen Gly153 (Abbildung 4.1) gegen Cysteinreste hat zudem demonstriert, dass N1 und N2 räumlich separiert sein müssen, damit N1 an TolAC binden kann. Der Phage mit der entsprechenden G3P-Variante (G3P\*-Clamp) konnte nach Ausbildung dieser Disulfidbrücke pilushaltige *E. coli* Zellen nicht mehr infizieren.<sup>83</sup>

Die Verkürzung der ersten Schleife der N1-Domäne des fd Phagen (Abbildung 4.1) durch den Austausch gegen die entsprechende Sequenz „EGDS“ aus der funktionell und strukturell homologen N1-Domäne des Phagen IF1 zeigt deutlich, dass die Wechselwirkung dieser Schleife mit dem globulären Teil von N2 nicht nur lokale Stabilität vermittelt, sondern essentiell ist für die Einnahme des gedockten Zustandes. Dies ergibt sich nicht nur aus den stark geschwächten Domäneninteraktionen in der entsprechenden Variante fd G3P\* EGDS, sondern auch aus der relativ zum Wildtyp-Protein deutlich höheren Affinität ihrer N1-Domäne für TolAC. Der Effekt auf die Stabilität und Affinität ist dabei vergleichbar mit der Wirkung der Substitution des Gly153 zu Aspartat. Die Analyse der Struktur des G3P\* hat dabei ergeben, dass Gly153 in N2 zu dem in der Schleife von N1 enthaltenen Asp24 eine Rückgratwasserstoffbrücke ausbildet (Abbildung 4.1).

Aus der Analyse der Faltung und der Verdrängung von TolAC während der Rückfaltung der Variante fd G3P\* EGDS geht hervor, dass auch in diesem Protein erst die nachgelagerte *trans*→*cis*-Isomerisierung des Pro213 zur Einnahme eines nativen Zustandes führt. Die Schalterfunktion ist nur geringfügig beeinflusst. Im nativen fd G3P\* EGDS ist jedoch die Assoziation der N1- und N2-Domäne relativ zum nativen WT fd G3P deutlich geschwächt. Die Wechselwirkung zwischen Asp24 und Gly153 fungiert demnach als eine Art Druckknopf, der den assoziierten Zustand festigt.

Durch die Bindung von N2 an den Pilus muss folglich *in vivo* nicht nur die Entfaltung der Gelenkregion eingeleitet, sondern auch die Wechselwirkung zwischen Gly153 und Asp24 in der ersten Schleifenregion von N1 gelöst werden. Denkbar ist, dass aufgrund der partiellen Entfaltung von N2, die durch die Bindung an den Pilus hervorgerufen wird, die Interaktion der Schleifenregion von N1 mit dem globulären Teil von N2 gestört wird. Die assoziierte Form wird dadurch so stark schwächt, dass die Gelenkregion entfaltet und Pro213 in die nicht-native *trans*-Konformation isomerisiert. Unterstützt wird die Annahme durch die NMR-Analyse des langlebigen Faltungsintermediates von WT fd G3P\* in Gegenwart von TolAC. Die Bindung von TolAC löst den Kontakt zwischen der ersten Schleife von N1 und der N2-Domäne. Dies verursacht Veränderungen in den chemischen Verschiebungen von Resten im globulären Teil der N2-Domäne relativ zu denen des nativen Zustandes. Die Bindung der N1-Domäne des aktiven G3P an TolAC unter anderem über die Schleifenregion führt demnach zur zusätzlichen Destabilisierung und damit partiellen Entfaltung der N2-Domäne.

Die Stabilität der N1-Domäne selbst ist durch die Verkürzung der Schleifenregion von DDKTLD zu EGDS deutlich erhöht. Ihre Affinität für TolAC ist hingegen verringert, weil durch den Austausch mit Asp28 der Salzbrückenpartner für Lys212 im TolAC-Protein nicht mehr vorhanden ist. Die natürliche fd-N1-Domäne mit der längeren Schleifensequenz DDKTLD zeigt also eine stark verringerte Stabilität, diese Schleife übernimmt jedoch dafür wichtige funktionelle Aufgaben wie die Stabilisierung der N2-Domäne im Ruhezustand und die Verbesserung der Interaktion mit TolAC in der infektiösen Form des Phagen.

In der stabilisierten Variante fd G3P\* IIHY führt der Austausch der Schleifenregion ebenfalls zur Destabilisierung der Domäneninteraktionen. Wie bei den Varianten fd G3P\* IIHY P213G und fd G3P\* IIHY APA beobachtet, bewirkt jedoch die Stabilisierung der Gelenkregion durch die zusätzlich vorhandenen Austausche T101I und D209Y, dass diese Proteine trotz der ungünstigen Substitutionen den gedockten und damit stark stabilisierten Zustand einnehmen können. Die Entfaltung der N1-Domäne im fd G3P\* IIHY EGDS ist daher immer noch an N2 gekoppelt und damit im Vergleich zur entsprechenden isolierten N1-Domäne verlangsamt. Dies zeigt einmal mehr, dass der Substitutionshintergrund des G3P einen starken Einfluss auf die Wirkung destabilisierender AS-Austausche hat, wodurch mögliche Effekte kompensiert und damit nicht detektiert werden können.

#### 4.4 Die N1-Domäne des IF1 Phagen kann trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu fd-N1 diese funktionell nicht vollständig ersetzen

Für die Stabilisierung der gedockten Form des fd G3P sind die Interaktion der ersten Schleife seiner N1-Domäne mit dem globulären Teil von N2, sowie die *cis*-Konformation des Pro213 und die Strukturierung der Gelenkregion unbedingt erforderlich. Allein die Deletion eines der beiden Faltblattstränge der Gelenkregion reicht aus, um die N-terminalen Domänen voneinander zu entkoppeln und damit den Infektionsmechanismus des fd Phagen zu dem des IF1 Phagen zu vereinfachen.<sup>80</sup> Der Austausch der N1-Domäne im fd G3P gegen die homologe Domäne des IF1 G3P in der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY zeigt, dass für die Einnahme des assoziierten Zustandes zusätzlich zu den drei strukturellen Elementen deren optimale Anordnung wichtig ist.

In der Chimäre aus IF1-N1 und fd-N2 liegen diese beiden Domänen trotz des vorhandenen Prolinschalters, zusätzlicher stabilisierender Substitutionen in der Gelenkregion und dem Einbau der Sequenz der ersten Schleife aus fd-N1 (DDKTLD) in die IF1-N1-Domäne unabhängig voneinander vor. In diesem G3P kommt es weder zur Wechselwirkung von N2 mit der verlängerten Schleifenregion noch zur Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzwerks zwischen der N1-Domäne und der Gelenkregion. Durch die fehlenden Interaktionen mit N1 ist folglich die Stabilität der N2-Domäne drastisch herabgesetzt. Die N1-Domäne ist durch den Austausch der Schleifenregion ebenfalls deutlich destabilisiert. Interessanterweise ergibt sich jedoch dadurch keine Verbesserung der Affinität zu TolAC, obwohl die Bindung von fd-N1 bzw. IF1-N1 an TolAC über vergleichbare Schlüsselinteraktionen realisiert wird. Die Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTLD</sub> IHY ist folglich in mehrfacher Hinsicht ein weiteres Beispiel dafür, dass es wesentlich schwieriger ist, spezifische Interaktionen durch gerichtete Mutagenese zu verbessern als sie zu schwächen.

Aus der Analyse der G3P-Struktur und den Auswirkungen der Substitution Q212A ist bekannt, dass für die Stabilisierung der Interaktionen des Netzwerkes zwischen den Domänen unter anderem auch Wasserstoffbrücken zwischen den Seitenketten von Gln212 und Gln52 in fd-N1 wichtig sind (Abbildung 4.1). In der N1-Domäne des IF1 G3P befindet sich an der entsprechenden Stelle ein Serinrest. Der Austausch dieses Serin gegen Glutamin führt jedoch ebenfalls nicht zu einer nennenswerten Verbesserung der Wechselwirkungen zwischen den Domänen in der Chimäre (Daten nicht gezeigt).

Die beiden N1-Domänen weisen trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit nur eine Sequenzidentität von 31 % auf, was vermutlich auf eine frühzeitige Anpassung an bestimmte ökologische Nischen zurückgeführt werden kann. Im G3P des Phagen IF1, der *E. coli* Zellen über deren I-Pili infiziert, liegen die N-terminalen Domänen unabhängig voneinander vor, weshalb hier eine intrinsisch hohe Stabilität von N1 und N2 wichtig ist.<sup>91</sup> In dieser Anordnung ist die Interaktionsfläche für TolAC auf der N1-Domäne zudem permanent zugänglich, was ihre im Vergleich zur fd-N1-Domäne schlechtere Affinität teilweise kompensiert. Die N1-Domäne des fd Phagen ist dagegen darauf ausgerichtet, zusätzlich zur

Wechselwirkung mit TolAC, im geschlossenen Zustand über vielfältige Interaktionen die N2-Domäne und die Gelenkregion ausreichend zu stabilisieren, und damit die Robustheit des Phagen zu erhalten. Dafür wird jedoch eine definierte Orientierung von vielen Resten an der Oberfläche von N1 benötigt, die nach dem Einbau der N1-Domäne des Phagen IF1 nicht mehr gegeben ist.

#### **4.5 Der distale Linker zwischen den N-terminalen Domänen hat keinen Einfluss auf die Infektion und Vermehrung des fd Phagen**

Für das Einbringen der ssDNA des Phagen in die Zellen müssen die drei Domänen des G3P spezifische Interaktionen zu verschiedenen Bindungspartnern sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Periplasma eingehen. Aus der Untersuchung der CT-Domäne ist unter anderem bekannt, dass diese nicht *in trans* agieren kann, sondern auf die Verknüpfung mit den N-terminalen Domänen angewiesen ist.<sup>15; 16</sup> Vermutlich um die Abstände zwischen den Interaktionspartnern zu überbrücken, verfügt das G3P des fd Phagen über zwei flexible Serin-Glycin-reiche Linker zwischen N1 und N2 bzw. der N2- und CT-Domäne.

Über den die beiden N-terminalen Domänen verknüpfenden distalen Linker wurde dabei vermutet, dass dieser unabhängig von der N2-Domäne direkt mit dem Pilus interagiert und dadurch zur hohen Infektiosität des Phagen beiträgt.<sup>52</sup> Die hier durchgeführte Analyse verkürzter G3P-Varianten hat jedoch gezeigt, dass Deletionen im Bereich dieses Linkers weder einen Einfluss auf die Stabilität noch auf die Bindungsfähigkeit oder den Faltungsmechanismus des Proteins hat. Auch besitzt der fd Phage durch den distalen Linker weder einen Vorteil bei der Assemblierung noch ist die Infektiosität des fd Phagen durch die Verkürzung des Bereiches herabgesetzt. Die postulierte Rolle bei der initialen Interaktion mit dem Pilus kann folglich nicht bestätigt werden. Die genaue Funktion des Linkerbereiches ist damit trotz eingehender Untersuchung noch immer unklar. Da vor allem die Evolution der Phagen darauf angelegt ist, nicht funktionelle und damit überflüssige Bereiche zu deletieren, um so die Größe der Erbinformation möglichst gering zu halten, kann davon ausgegangen werden, dass der Linker eine andere, noch unbekanntere Bedeutung für den Phagen hat.

In anderen Proteinen wie dem humanen Replikationsprotein A fungieren flexible Linker als Regulatoren des Abstandes zwischen benachbarten Domänen.<sup>187</sup> Aus diesem Grund werden gerade glycinreiche Sequenzen häufig zur Herstellung von Hybridproteinen verwendet. Die Analyse des Einflusses einer solchen verknüpfenden Sequenz auf die Eigenschaften einer fusionierten Einkettenvariante des Arc-Repressors hat dabei gezeigt, dass die Länge und Zusammensetzung des künstlichen Linkers sowohl die Stabilität als auch den Faltungsmechanismus beeinflussen kann.<sup>188</sup> Dies ist zwar für den distalen Linker des G3P nicht beobachtet worden, aber womöglich bietet der Bereich für den im Ruhezustand befindlichen Phagen unter physiologischen Bedingungen einen selektiven Vorteil.

## 4.6 G $\beta$ 1 kann durch zwei Austausch in ein Dimer umgewandelt werden

### 4.6.1 Die hyperstabile Variante G $\beta$ 1-M2 wird durch die Ausbildung von Dimeren zusätzlich stark stabilisiert

Anhand des auf dem fd Phagen basierenden *Proside*-Selektionssystems konnte unter anderem das G $\beta$ 1-Protein deutlich stabilisiert werden, wobei hauptsächlich Substitutionen hin zu hydrophoben Resten identifiziert wurden.<sup>55-57</sup> Die Kombination der besten Austausche resultierte in der hyperstabilen Variante G $\beta$ 1-M2. Die Analyse dieses Proteins mittels konzentrationsabhängiger thermischer Übergänge hat allerdings ergeben, dass sein Übergangsmittelpunkt mit zunehmender Proteinkonzentration ansteigt und seine Enthalpie der Entfaltung relativ zum WT-G $\beta$ 1 drastisch erhöht ist. Durch zusätzlich durchgeführte kalorimetrische Messungen und analytische Ultrazentrifugation konnte bestätigt werden, dass die starke Stabilisierung von G $\beta$ 1-M2 nicht nur durch die Beiträge der vier enthaltenen Substitutionen, sondern auch durch die Ausbildung von Dimeren verursacht wird. Gleichzeitig bedeutet dieser Befund, dass die Konzentrationsabhängigkeit der thermischen Stabilität und ein deutlich erhöhter  $\Delta H$ -Wert sehr robuste Indikatoren dafür sind, dass ein Protein eine erhöhte Tendenz zur Oligomerisierung besitzt.

Die strukturelle Grundlage der Dimerisierung konnte durch die Aufklärung der Kristallstruktur verdeutlicht werden. Danach bilden die beiden aneinandergelagerten Monomere des G $\beta$ 1-M2 über ihre  $\beta$ 2-Stränge ein intermolekulares  $\beta$ -Faltblatt. Der Großteil der Stabilisierung des Dimers basiert jedoch auf hydrophoben Interaktionen vor allem der substituierten Reste. Dabei bilden die vier Leu-Reste an den Positionen 16 und 37 der Monomere den hydrophoben Kern, indem ihre Seitenketten jeweils in die komplementären Aushöhlungen auf der Oberfläche des anderen Moleküls ragen. Die Anordnung ist möglich, da die hydrophile Seitengruppe des Tyr33 reorientiert und damit aus der Interaktionsfläche entfernt wird.

Grundsätzlich besitzt auch WT-G $\beta$ 1 die intrinsische Fähigkeit zur Assoziation, da seine Moleküle über ihre äußeren Faltblattstränge Wasserstoffbrücken zueinander ausbilden können. In wässriger Lösung sind diese Anordnungen jedoch nicht stabil genug, weshalb das Protein in monomerer Form vorliegt. Erst durch weitere Interaktionen wie die für G $\beta$ 1-M2 oder die Variante G $\beta$ 1-A34F beschriebene Bildung einer hydrophoben Interaktionsfläche wird der dimere Zustand ausreichend stabilisiert.<sup>179</sup> In stark destabilisierten G $\beta$ 1-Varianten wird die Oligomerisierung als Strategie verwendet, um das Protein in einer nativen Konformation zu halten. Dabei lagern sich die Monomere nicht einfach aneinander, sondern häufig kommt es durch den Austausch einzelner Stränge zwischen den Molekülen zur Ausbildung von ineinander verschränkten Oligomeren.

#### 4.6.2 Stabilisierung von G $\beta$ 1 mittels *Proside* – Selektion auf dimere Varianten?

Für die Dimerisierung nicht nur der hyperstabilen Variante G $\beta$ 1-M2 sondern allgemein des G $\beta$ 1-Proteins sind allein die Substitutionen T16L und N37L ausreichend. Tyr33, dessen Seitenkette während der Assoziation der Monomere reorientiert wird, hat dagegen keinen Einfluss auf die Tendenz zur Ausbildung von Dimeren.

Während der *Proside*-Selektionen, die zur Generierung der hyperstabilen Variante führten, wurde an den Positionen 16 und 37 ausschließlich die Kombination von Leucinresten gefunden. Anhand weiterer Selektionen des G $\beta$ 1-Proteins auf stabilisierende Substitutionen unter anderem an den Positionen 16, 18, 33 und 37 konnten jedoch auch dimere Varianten identifiziert werden, in denen Thr16 und Asn37 gegen andere hydrophobe AS ausgetauscht waren. Für die Ausbildung von stabilen G $\beta$ 1-Dimeren ist demnach allgemein der Ausschluss polarer Gruppen und eine gute Komplementarität der hydrophoben Interaktionsfläche der Monomere wichtig.

Über die *Proside*-Methode wurden demnach fast ausschließlich G $\beta$ 1-Proteine selektiert, die eine deutlich erhöhte Tendenz zur Dimerisierung zeigen. Der spontan während der Selektionen erhaltene Austausch D36A, der nur im dimeren Hintergrund eine stark stabilisierende Wirkung hat<sup>189</sup>, lässt ebenfalls vermuten, dass während der *in vitro* Selektionen auf erhöhte Stabilität die Ausbildung von Dimeren die treibende Kraft war. Da das G3P und damit auch das eingebaute Gastprotein in drei bis fünf Kopien auf der Oberfläche der Phagenhülle präsentiert werden, ist theoretisch aufgrund der lokal hohen Konzentration an G $\beta$ 1-Molekülen eine Wechselwirkung möglich. Dagegen spricht allerdings die antiparallele Orientierung der Monomere. Eine solche Anordnung erfordert eine starke Neuorientierung eines der beteiligten G3P, zwischen deren CT- und den NT-Domänen G $\beta$ 1 inseriert ist. Eine Dimerisierung der Proteine würde zudem während der Infektion vermutlich zu sterischen Hinderungen führen und damit den Infektionsprozess stören. Eine eindeutige Aussage darüber, ob während der *in vitro* Evolution auch die Dimerisierung von G $\beta$ 1 eine Rolle gespielt hat, kann nicht getroffen werden. Die Analyse der über *Proside*-Selektionen identifizierten Substitutionen zeigt jedoch, dass jeder einzelne der Austausche einen stabilisierenden Effekt auf das G $\beta$ 1-Protein hat.

#### 4.6.3 Über die Analyse des Faltungsmechanismus kann sowohl die Stabilität der monomeren Spezies als auch die des Komplexes ermittelt werden

Zur hohen Stabilität der dimeren G $\beta$ 1-Varianten trägt neben der stabilisierenden Wirkung der einzelnen Substitutionen auch die günstige Interaktion zwischen den Monomeren bei. Es ist folglich nicht zulässig, die thermische Stabilität der oligomeren Formen mit der des monomeren WT-G $\beta$ 1 zu vergleichen, um verlässliche Aussagen über den stabilisierenden Effekt einzelner Substitutionen treffen zu können. Die Analyse des Faltungsmechanismus der hyperstabilen Variante G $\beta$ 1-M2 zeigt jedoch, dass es durch eine gezielte Kombination aus Einzel- und Doppelmischexperimenten möglich ist, die konformationelle Faltung des

Monomers von der Einstellung des Monomer-Dimer-Gleichgewichtes zu trennen. Voraussetzung ist, dass letztere langsamer ist als die Ent- und Rückfaltung der monomeren Spezies. Neben der Stabilität des Monomers von G $\beta$ 1-M2 konnte darüber zumindest im Übergangsbereich auch die Stärke der Assoziation des Dimers bestimmt werden. Die Dissoziationskonstante des Komplexes liegt mit 30 nM deutlich unter dem mittels analytischer Ultrazentrifugation erhaltenen Wert von 1  $\mu$ M.

Die freie Enthalpie der Entfaltung, die sich aus der Analyse des resultierenden Chevrons des G $\beta$ 1-M2-Monomers ergibt, verdeutlicht, dass auch die monomere Spezies deutlich gegenüber dem Wildtyp-Protein stabilisiert ist. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass während der Selektionen die konformationelle Stabilisierung des monomeren G $\beta$ 1 durch die individuellen Austausche und nicht die Dimerisierung die treibende Kraft war. Die stabilisierenden Beiträge der vier Substitutionen verhalten sich dabei additiv. Im Gegensatz zur dimeren Form, in der die hydrophoben Seitenketten mit denen des anderen Monomers interagieren, beruht die günstige Wirkung der ausgetauschten Reste vermutlich auf der verbesserten Packung, wodurch, wie in der stark stabilisierten, jedoch monomeren Variante G $\beta$ 1-IIIEF (T16I, T18I, T25E, V29K), Hohlräume auf der Oberfläche verschlossen werden.<sup>55</sup>

Für das hyperstabile G $\beta$ 1-M2 war es also möglich, sowohl die Stabilität der monomeren Form als auch die Stabilität des Komplexes zu bestimmen. Dieser Befund ist besonders für den Vergleich homologer Proteine aus mesophilen und thermophilen Organismen von großer Bedeutung. Letztere verwenden häufig die Oligomerisierung von Proteinen als Strategie, um deren Stabilität an die physiologischen Bedingungen anzupassen<sup>185; 190; 191</sup>, weshalb die Auswirkungen von Sequenzunterschieden nicht direkt analysiert werden können. In der Vergangenheit wurde daher entweder durch gezielte Substitutionen die Ausbildung von Oligomeren verhindert oder der Unterschied anhand des Vergleiches der thermischen Stabilität bei der gleichen Konzentration an monomerem Protein abgeschätzt.<sup>183; 184</sup> Zumindest für oligomere Proteine, in denen sich das Gleichgewicht der Faltung des Monomers schneller einstellt als das Monomer-Oligomer-Gleichgewicht, kann der kinetische Ansatz verwendet werden, um gezielt den Einfluss bestimmter Austausche auf die Stabilität der monomeren Form zu ermitteln.



## 5. Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits publiziert bzw. zur Publikation eingereicht. Ein weiteres Manuskript ist in Vorbereitung:

1. S. Thoms<sup>1</sup>, K. E. A. Max<sup>1</sup>, M. Wunderlich, T. Jacso, H. Lilie, B. Reif, U. Heinemann and F.-X. Schmid (2009). „Dimer Formation of a Stabilized G $\beta$ 1 Variant: A Structural and Energetic Analysis”, *J. Mol. Biol.* 391, 918–932. (<sup>1</sup> gleichberechtigte Erstautoren)
2. S. Hoffmann-Thoms and F.-X. Schmid. „A kinetic approach to determine the conformational stability of a protein that dimerizes after folding”, ***eingereicht***
3. U. Weininger, S. Hoffmann-Thoms, F.-X. Schmid, J. Balbach. „How conformational unfolding and prolyl isomerization of the gene-3-protein direct phage infection“, ***Manuskript in Vorbereitung***

Im Rahmen dieser Arbeit entstand außerdem folgende Publikation, die nicht Teil der Dissertation sind:

E.-M. Schriefer, S. Hoffmann-Thoms, Annika Schmid, F.-X. Schmid and J. Heesemann. „*Yersinia enterocolitica*  $\beta$ -lactamase A (BlaA) is exported by the twin-arginine translocation pathway: Molecular and biochemical characterization”, ***eingereicht***



## 6. Zusammenfassung

Filamentöse Phagen wie der fd Phage kommen mittlerweile nicht nur in biotechnologischen Selektionsverfahren, sondern verstärkt auch bei der Entwicklung von Nanotechnologieprodukten zum Einsatz. Ein Vorteil des fd Phagen liegt darin, dass er durch die Kultivierung von entsprechend infizierten *E. coli* Stämmen sehr einfach und in großen Mengen hergestellt werden kann. Die Infektion der Wirtszellen erfolgt über das Gen-3-Protein (G3P) des Phagen, das aus drei Domänen besteht. Während die C-terminale Domäne für die Verankerung des G3P in der Phagenhülle verantwortlich ist, übernehmen die beiden N-terminalen Domänen (N1 und N2) die initialen Schritte der Infektion. Im Ruhezustand des Phagen liegen die N1- und N2-Domäne in assoziierter Form vor, wodurch vor allem N2 stark stabilisiert wird. Allerdings blockiert die Interaktion der Domänen die Bindungsfläche auf der N1-Domäne für den sekundären Rezeptor, die C-terminale Domäne des TolA-Proteins, und daher muss der Phage zunächst aktiviert werden. Die Domänen dissoziation wird durch Interaktion der N2-Domäne mit dem F-Pilus der Wirtszelle im ersten Schritt der Infektion ermöglicht, wodurch die für die Assoziation der Domänen wichtige Gelenkregion entfaltet wird und das in der Gelenkregion befindliche Pro213 in die nicht native *trans*-Konformation übergeht. Die Lebenszeit des aktiven Zustandes wird limitiert durch die Reisoomerisierung von Pro213, die jedoch aufgrund der lokalen Sequenz um dieses Prolin mit einer Zeitkonstante von etwa 6000 s (bei 25 °C) sehr langsam abläuft.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche strukturellen Bereiche für die Population des offenen bzw. geschlossenen Zustandes und damit für die Funktionalität des G3P eine wichtige Rolle spielen. Über die Analyse des Faltungsmechanismus des Wildtyp-G3P, sowie der Stabilität und Struktur seines langlebigen Faltungsintermediates mittels NMR-Spektroskopie, konnte nachgewiesen werden, dass die N1- und N2-Domäne im aktiven Zustand fast vollständig dissoziiert sind und die Gelenkregion komplett entfaltet vorliegt. In der Variante G3P IIHY, die unter anderem in der Gelenkregion zwei stark stabilisierende Substitutionen enthält, sind die Domänen im Intermediatzustand noch lose miteinander assoziiert.

Die Unterschiede in der Stärke der Domänenassoziation beeinflussen die Wechselwirkung der entsprechenden G3P-Varianten mit TolAC sehr stark, was *in vitro* anhand von Bindungsexperimenten mittels Energietransfer nachgewiesen werden konnte. Danach ist eine hohe Stabilität der Gelenkregion nur für die Stabilisierung des Ruhezustandes des G3P vorteilhaft. Sowohl im aktiven Intermediatzustand, als auch in der nativen und damit geschlossenen Form führen stabilisierende Austausche zu einer deutlichen Verschlechterung der Interaktionsfähigkeit des G3P mit TolAC. Dies wurde zusätzlich durch Infektionsexperimente sowohl mit pilusfreien, als auch mit pilushaltigen Zellen bestätigt. In beiden Ansätzen zeigte sich, dass die Infektiosität des Wildtyp-Phagen gegenüber dem Phagen mit stabilisiertem G3P erhöht ist. Das bedeutet, dass die Stabilität der Gelenkregion im natürlich vorkommenden fd Phagen optimal eingestellt ist.

Die Analyse der Stabilität und des Faltungsmechanismus der P213G-Variante des fd G3P zeigt, dass auch Pro213 die Stabilität des inaktiven Ruhezustandes und damit die Lebensdauer des aktiven Zustandes stark beeinflusst. Aufgrund des Verlustes des Prolinschalters liegt das entsprechende G3P P213G zum großen Teil in nicht assoziierter und damit instabiler Form vor. Lediglich ein geringer Anteil wird durch den Übergang in die gedockte Form stabilisiert, der im Vergleich zur Isomerisierung von Pro213 stark beschleunigt ist. Die Katalysierbarkeit dieser Assoziationsreaktion durch Prolylisomerasen zeigt, dass es sich dabei ebenfalls um einen prolinkontrollierten Mechanismus handelt, an dem vermutlich andere Prolinreste in der Gelenkregion beteiligt sind.

Die zu Pro213 benachbarten Reste Gln212 und Pro214 regulieren die Geschwindigkeit der Isomerisierung an Pro213. Zusätzlich stabilisieren sie die geschlossene Konformation mit *cis*-Pro213 durch Wechselwirkungen mit Resten der N1-Domäne. Dies geht aus dem Vergleich von G3P-Varianten mit den Austausch Q212A und P214A hervor. In der doppelsubstituierten Variante liegen durch den Austausch beider Reste die N1- und N2-Domäne fast vollständig unabhängig voneinander vor, was unter anderem auf die deutlich beschleunigte Isomerisierung an Pro213 zurückgeführt werden kann. Die Infektiosität des entsprechenden Phagen gegenüber pilusfreien Zellen, für deren Infektion die Zugänglichkeit der N1-Domäne entscheidend ist, ist dadurch vergleichbar zu der eines fd Phagen, bei dem die N2-Domäne des G3P vollständig deletiert ist.

Die für die Infektion notwendige Isomerisierung von Pro213 und die Entfaltung der Gelenkregion werden durch die Bindung der N2-Domäne an die Spitze des Pilus ausgelöst. Dabei wird angenommen, dass die N2-Domäne zumindest partiell entfaltet wird. Um zu analysieren, welche Bereiche des G3P an der Weiterleitung des Signals von der N2-Domäne zur Gelenkregion beteiligt sind, wurden verschiedene Substitutions- bzw. Deletionsvarianten hergestellt, thermodynamisch charakterisiert und die Infektiositäten der entsprechenden Phagenvarianten untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Serin-Glycin-reiche Linker zwischen der N1- und N2-Domäne weder einen Einfluss auf die Stabilität noch die Funktionalität des G3P hat. Wichtig ist hingegen die erste Schleife der N1-Domäne, die sich in der Interaktionsfläche zur N2-Domäne befindet. Nach Ersatz durch die entsprechende, jedoch etwas kürzere Schleife aus dem G3P des Phagen IF1 liegen N1 und N2 fast vollständig dissoziiert vor, wie unter anderem aus der Analyse der Affinität gegenüber TolAC sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hervorgeht. Während der Aktivierung müssen im Umkehrschluss folglich auch die Wechselwirkungen zwischen der Schleifenregion von N1 und der N2-Domäne gelöst werden. Die Analyse des Faltungsmechanismus der Variante zeigte zudem, dass sich die Schleifenregion bereits auf die Faltung der N2-Domäne auswirkt. Dies bekräftigt die Vermutung, dass während der Infektion als direkte Folge der Interaktion von N2 mit dem Pilus die Wechselwirkung des globulären Teils von N2 mit der Schleifenregion unterbunden wird und damit die Entfaltung der Gelenkregion und die Isomerisierung von Pro213 ermöglicht werden.

Für die Einnahme des gedockten Zustandes sind neben dem Prolinschalter auch die Wechselwirkungen zwischen den Domänen, die über die Gelenkregion und die erste Schleife von N1 vermittelt werden, wichtig. Dass für deren Ausbildung jedoch lokale Interaktionen bzw. die exakte Anordnung der Domänen notwendig ist, zeigt der Einbau der N1-Domäne des IF1 Phagen in das G3P des fd Phagen. Trotz zusätzlicher stabilisierender Substitutionen in der Gelenkregion liegen die IF1-N1- und fd-N2-Domäne in der entsprechenden Chimäre unabhängig voneinander vor.

Vor allem aufgrund der hohen Stabilität seines G3P im Ruhezustand wird der fd Phage als Grundlage des *Proside*-Selektionsverfahrens verwendet, um stark stabilisierte Proteinvarianten zu erhalten. Für die Immunoglobulinbindungsdomäne 1 des G-Proteins aus *Streptococcus sp.*(G $\beta$ 1) konnten darüber unter anderem vier stark stabilisierende hydrophobe Austausche identifiziert werden, die in der Variante G $\beta$ 1-M2 kombiniert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Stabilität dieser hyperstabilen Variante mittels CD-Spektroskopie, Kalorimetrie und analytischer Ultrazentrifugation näher analysiert. Dabei zeigte sich, dass die relativ zum WT-G $\beta$ 1 deutlich erhöhte Stabilität von G $\beta$ 1-M2 zum Teil durch deren Dimerisierung bedingt ist. Aus der gelösten Kristallstruktur geht hervor, dass die Assoziation der Monomere nicht nur über die Ausbildung eines intermolekularen  $\beta$ -Faltblattes, sondern vor allem über eine hydrophobe Interaktionsfläche vermittelt wird. Der Kern dieser Assoziationsfläche wird durch die hydrophoben Leucinreste an den Positionen 16 und 37 gebildet. Die Untersuchung weiterer Varianten hat dabei gezeigt, dass die Kombination der Substitutionen T16L und N37L für die Assoziation der Monomere ausreicht. Aus Varianten weiterer *Proside*-Selektionen geht zudem hervor, dass allgemein hydrophobe Reste an diesen Positionen die Tendenz des G $\beta$ 1-Proteins zur Dimerisierung erhöhen.

Generell können die Stabilitäten monomerer Proteine mit denen oligomerer Formen nicht verglichen werden. Um den Beitrag der Austausche zur konformationellen Stabilität des Monomers von G $\beta$ 1-M2 näher zu untersuchen, wurde daher zunächst erfolglos versucht, die Dimerisierung der Variante zu unterbinden. Erst durch die Analyse des Faltungsmechanismus des Proteins durch die Kombination von Einzel- und Doppelmischexperimenten war es möglich, die konformationelle Faltung des Monomers von der Einstellung des Monomer-Dimer-Gleichgewichtes zu trennen. Es gelang, weil die Einstellung des Faltungsgleichgewichtes des Monomers viel schneller erfolgt als die Dimerisierung. Anhand der Faltungskinetiken des G $\beta$ 1-M2-Monomers konnte daraufhin seine Stabilität ermittelt werden. Diese ist gegenüber dem WT-G $\beta$ 1 deutlich erhöht. Eine derartige kinetische Analyse kann nicht nur für G $\beta$ 1-Varianten, sondern allgemein für oligomere Proteine verwendet werden, um die Stabilität ihrer monomeren Form zu ermitteln. Voraussetzung ist lediglich, dass, wie im G $\beta$ 1-M2-Protein, die Faltung des Monomers deutlich schneller abläuft als die Einstellung des Monomer-Oligomer-Gleichgewichtes.



## 7. Summary

Filamentous phages such as the bacteriophage fd are not only used in biotechnological selection techniques but also for the development of nanotechnological applications. The phage fd can easily be produced in large quantities by cultivating *E. coli* cells that were infected by this phage. Infection is mediated by the phage gene-3-protein, which consists of three domains. The C-terminal domain is responsible for anchoring the protein in the phage coat, whereas the two N-terminal domains (N1 and N2) perform the initial infection steps. In the inactive resting state, N1 and N2 are tightly associated, which leads to a strong stabilization of the N2 domain. However, these interactions block the binding site for the secondary receptor, the C-terminal domain of the TolA protein, and therefore the phage has to be activated for infection. The dissociation of the N-terminal domains is enabled by initial binding of domain N2 to the tip of the F pilus on the host cell surface. This results in local unfolding of the hinge region, which mediates the dissociation of N1 and N2, and *cis*→*trans* isomerization of Pro213 within the hinge. The lifetime of the binding-competent form is limited by the re-isomerization of Pro213. This slow locking reaction shows a time constant of 6000 s (at 25 °C) which is determined by the local sequence.

In the thesis presented here, the role of different structural regions for the population of the open and closed state of the G3P was investigated. In the active form of wild type G3P, N1 and N2 are virtually independent of each other and the hinge region is completely unfolded. This could be shown by analysis of the structure and stability of its folding intermediate using NMR spectroscopy and by solving the folding mechanism of the G3P. In the stabilized variant G3P IIHY, the presence of two strongly stabilizing substitutions in the hinge enables the N-terminal domains to loosely associate in the open state.

The differences in domain interactions have a significant impact on the affinity of the G3P variants towards TolAC. *In vitro* binding experiments using energy transfer showed that a highly stable hinge region is only beneficial for the maintenance of the resting state. For G3P IIHY the affinity of both the closed, inactive form and the active intermediate towards TolAC is strongly reduced due to the additional stabilizing replacements in this variant. These observations were confirmed by infection experiments with F pilus bearing cells as well as F pilus deficient cells. In both cases, the infectivity of the wild type phage was increased relative to phage containing the stabilized G3P IIHY. Thus, the stability of the hinge within the wild type phage fd is already adjusted to optimal performance.

Analysis of the stability and the folding mechanism of the P213G variant of G3P revealed that Pro213 also strongly influences the stability of the resting state and therefore the lifetime of the active phage. The loss of the proline switch leads to the population of the active but unstable form in which N1 and N2 are almost completely dissociated. Only a small part of the G3P P213G molecules adopts a locked and therefore stabilized conformation. The velocity of this domain assembly is strongly increased relative to the slow isomerization at Pro213 in the wild type protein. In addition, the locking reaction is catalyzed by prolyl isomerases

indicating that formation of associated G3P P213G is still limited by the conformational change of proline residues which presumably are located in the hinge region.

The residues adjacent to Pro213, Gln212 and Pro214 determine the frequency of prolyl isomerization at Pro213. Furthermore, they stabilize the resting state with *cis*-Pro213 by forming favorable interactions to residues of the N1 domain. This was revealed by comparing G3P variants with alanine substitutions at position 212 and 214. The combination of both substitutions Q212A and P214A resulted in decoupling of N1 und N2 mainly due to the strongly accelerated conformational change at Pro213. The ability of the corresponding phage to infect F pilus deficient cells is comparable to the infectivity of a phage, in which the N2 domain was completely deleted. Thus, in both cases the binding site on the N1 domain for TolAC is fully accessible.

To activate G3P, Pro213 must isomerize and the hinge must unfold. *In vivo*, these conformational changes are induced by the interaction of N2 with the F pilus. Hereby, it is assumed that the N2 domain becomes at least partially unfolded. In order to identify those structural elements, which are responsible for transducing the binding signal from N2 to the hinge region, several deletion and substitution variants were created. Thermodynamic characterization of the purified proteins and functional analysis of the corresponding phages showed that the serine-glycine-rich linker between N1 and N2 has an influence neither on G3P stability nor on its functionality. In contrast, substitution of the first loop of N1, which is located at the domain interface, with the homologous loop sequence from G3P of phage IF1, led to almost complete dissociation of N1 and N2. This was demonstrated by the estimation of the affinity towards TolAC *in vitro* as well as *in vivo*. This implies that for G3P activation the interaction between the loop of N1 and the N2 domain must be abolished. In addition, the analysis of the folding mechanism of the variant showed that the loop region of N1 is beneficial for folding of N2. Thus, as a consequence of the initial binding of N2 to the pilus, the loosening of this domain interaction probably leads to unfolding of the hinge and isomerization of Pro213.

To reach the locked state of G3P, the proline switch must be in *cis* and the stabilizing interactions between the domains, mediated by the hinge and the first loop of N1 must be formed. However, these interactions can only be formed when the domains are optimally oriented. This was revealed by the investigation of a chimeric G3P in which the N1 domain of phage fd had been substituted by the homologous domain of the phage IF1. Despite additional stabilizing substitutions in the hinge, the domains acted independently from each other.

Due to the high thermal stability of its locked G3P, phage fd is used in the *in vitro* Proside selection procedure to identify strongly stabilized proteins. For the  $\beta$ 1 domain of the streptococcal protein G, among others, four strongly stabilizing substitutions could be selected using this method. The combination of these hydrophobic substitutions resulted in the hyperstable variant G $\beta$ 1-M2, the stability of which was investigated in detail using CD spectroscopy, calorimetry and analytical ultracentrifugation. The analysis showed that the

strongly increased stability of this variant is partially caused by the formation of dimers. This could be verified by solving the crystal structure of the G $\beta$ 1-M2 protein. Besides the formation of an intermolecular  $\beta$ -sheet, the association of the molecules is mainly mediated by a hydrophobic interaction surface, the core of which is formed by leucine residues at positions 16 and 37. Investigation of further G $\beta$ 1 variants revealed that the combination of the substitutions T16L and N37L is sufficient for dimerization. Moreover, variants from additional *Proside* selections demonstrate that hydrophobic residues at these positions in general increase the tendency of G $\beta$ 1 to form dimers.

The thermodynamic stabilities of monomeric and dimeric forms of a protein cannot be compared. In order to estimate the contributions of the substitutions to the conformational stability of monomeric G $\beta$ 1-M2, it was first tried – unsuccessfully – to prevent the formation of G $\beta$ 1-M2 dimers. Only the combination of single and double mixing experiments to solve the folding mechanism of the protein made it possible to uncouple monomer folding from the establishment of the monomer/dimer equilibrium. This approach was feasible because over the entire range of denaturant concentration, unfolding and refolding of the monomer were faster than dimer formation and dissociation. The stability of monomeric G $\beta$ 1-M2, which could be calculated on the basis of its folding kinetics, is strongly increased relative to wild type G $\beta$ 1. Thus, this kinetic approach cannot only be used to estimate the stability of the monomeric form of dimeric G $\beta$ 1 variants but also of other oligomeric proteins. The prerequisite is that folding of the monomer is much faster than the adjustment of the monomer/dimer equilibrium.



## 8. Abkürzungsverzeichnis

AEDANS	5-(((Acetylamino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
<i>c.f.u.</i>	<i>colony forming units</i> (koloniebildende Einheiten)
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Cm	Chloramphenicol
CT	C-terminale Domäne des Gen-3-Proteins
$C_t$	Konzentration an monomerem G $\beta$ 1-Protein
d	Schichtdicke
D	Denaturierungsmittel
$[D]_m$	Mittelpunkt des Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltungübergangs
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
dNTP	Desoxyribonukleotide
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
dYT	<i>double yeast-tryptone</i> -Medium
$\Delta C_p$	Wärmekapazitätsänderung während der Entfaltung eines Proteins bei konstantem Druck
$\Delta G$	freie Enthalpie der Entfaltungsreaktion
$\Delta H$	Enthalpie der Entfaltungsreaktion
$\Delta H_{cal}$	Kalorimetrische Enthalpie
$\Delta H_{vH}$	van't Hoff Enthalpie der Entfaltung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat-Dinatriumsalz
fd $\Delta$ N2	fd-Phagen mit Deletion der N2-Domäne von G3P (AS 70-261)
fd G3P* AGA	G3P des fd Phagen mit den Substitutionen Q212A, P213G und P214A
fd G3P* APA	G3P des fd Phagen mit den Substitutionen Q212A und P214A
fd G3P* IIHY	G3P des fd Phagen mit den Substitutionen T13I, Q129H, T101I und D209Y
fd G3P* EGDS	Wildtyp-G3P, in dem die erste Schleife der N1-Domäne durch die kürzere Sequenz EGDS ersetzt ist
fd G3P* IF1-N1 <sub>DDKTLD</sub> IIHY	G3P-Chimäre aus der N1-Domäne des G3P des Phagen IF1, in der die Sequenz ihrer ersten Schleife gegen die Abfolge DDKTLD ausgetauscht wurde, und der N2-Domäne des stabilisierten fd G3P* IIHY
0SS-G3P*-stab	Disulfidfreie G3P-Variante mit den zusätzlichen Substitutionen N15G, R29W, N39K, G55A, T56I, I60V, N138G, L198P, F199L, S207L sowie T13I, Q129H, T101I und D209Y
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
G3P	Gen-3-Protein filamentöser Phagen
G3P*	N-terminales Fragment des Gen-3-Proteins mit den Domänen N1 und N2 (AS 1-217 + Pro-Ser-Gly-(His)6)
G3P* IIHY $\Delta\beta$ 6	fd G3P* IIHY, in dem die Aminosäuren 157-162 deletiert wurden

G3P*-Clamp	0SS-G3P*-Var21 aus der Arbeit von Kather <i>et al.</i> <sup>192</sup> mit den zusätzlichen Mutationen D24C, G153C
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
Gβ1	Immunoglobulinbindungsdomäne 1 des Protein G
Gβ1-M2	stabilisierte Gβ1-Variante mit den Substitutionen E15V, T16L, T18I und N37L
hFKBP12+IF	humanes FKBP12 (FK506-Bindungsprotein) mit innerhalb des großen Loops inserierter IF-Domäne aus SlyD und einem C-terminalen His <sub>(6)</sub> -Tag, Prolylisomerase
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IAEDANS	5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
IF1-N1 <sub>DDKTLTD</sub>	N1-Domäne des G3P des Phagen IF1, in der die erste Schleife gegen die Sequenz DDKTLTD
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
$K_{app}$	apparente Gesamtgleichgewichtskonstante des Denaturierungsmittel-induzierten Überganges dimerer Gβ1-Varianten
$k_{app}$	apparente Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion
$K_D$	Dissoziationskonstante
$k_{EF}$	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Entfaltungsreaktion
$k_{off}$	mikroskopischen Rate der Dissoziation
$k_{on}$	mikroskopischen Rate der Assoziation
KP	Kaliumphosphat
$k_{RF}$	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Rückfaltungsreaktion
$K_u$	Gleichgewichtskonstante der Entfaltung
$m$	Kooperativitätsparameter der Entfaltungsreaktion ( $\delta\Delta G/\delta\Delta[D]$ )
<i>m.o.i.</i>	<i>multiplicity of infection</i> (Verhältnis von Phagen zu Zellen)
$m_{EF}$	kinetischer $m$ -Wert der Entfaltungsreaktion ( $\delta\ln k_{EF}/\delta\Delta[D]$ )
$m_{RF}$	kinetischer $m$ -Wert der Rückfaltungsreaktion ( $\delta\ln k_{RF}/\delta\Delta[D]$ )
n	Brechungsindex
N	nativer Zustand eines Proteins
N1	N1-Domäne des Gen-3-Proteins bzw. isoliertes Teilfragment (AS 1-67 + (Ala) <sub>3</sub> -(His) <sub>6</sub> )
N2	N2-Domäne des Gen-3-Proteins bzw. isoliertes Teilfragment (AS 102-205 + Tyr-Gln-Gly-(His) <sub>6</sub> )
$N/U^{cis}$	Nativer (N) bzw. entfalteter Zustand (U) mit <i>cis</i> -Pro161
$N/U_{cis}$	Nativer (N) bzw. entfalteter Zustand (U) mit <i>cis</i> -Pro213
$N/U^{trans}$	Nativer (N) bzw. entfalteter Zustand (U) mit <i>trans</i> -Pro161
$N/U_{trans}$	Nativer (N) bzw. entfalteter Zustand (U) mit <i>trans</i> -Pro213
Na-Cacodylat	Natriumsalz der Dimethylarsinsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PBS-Puffer	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pNA	<i>para</i> -Nitroanilin

---

PNK	Polynukleotidkinase
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SlyD	<i>sensitive to lysis D</i> , cytosolische Prolylisomerase aus <i>E. coli</i>
ssDNA	Einzelstrang-DNA
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i>
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
$T_M$	Mittelpunkt des thermischen Entfaltungsübergangs
TolAC	C-terminale Domäne von TolA bzw. isoliertes Fragment (AS 295-421 + Cys-(Ala) <sub>3</sub> -(His) <sub>6</sub> )
TolAC-AEDANS	AEDANS-markiertes TolAC
Tricin	N-(Tris(hydroxymethyl)-methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	<i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>
U	entfalteter Zustand eines Proteins
ÜNK	Übernachtkultur
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp (Protein mit unveränderter Aminosäuresequenz)
$\epsilon_\lambda$	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge $\lambda$
$\lambda$	apparente Ratenkonstante ( $k_{EF} + k_{RF}$ )
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge
$\tau$	Zeitkonstante einer Reaktion



## 9. Literaturverzeichnis

1. Dang, X., Yi, H., Ham, M. H., Qi, J., Yun, D. S., Ladewski, R., Strano, M. S., Hammond, P. T. & Belcher, A. M. (2011). Virus-templated self-assembled single-walled carbon nanotubes for highly efficient electron collection in photovoltaic devices. *Nat Nanotechnol* **6**, 377-84.
2. Mao, C., Solis, D. J., Reiss, B. D., Kottmann, S. T., Sweeney, R. Y., Hayhurst, A., Georgiou, G., Iverson, B. & Belcher, A. M. (2004). Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires. *Science* **303**, 213-7.
3. Lee, Y. J. & Belcher, A. M. (2011). Nanostructure design of amorphous FePO<sub>4</sub> facilitated by a virus for 3 V lithium ion battery cathodes. *Journal of Materials Chemistry* **21**, 1033-1039.
4. Lee, Y. J., Yi, H., Kim, W. J., Kang, K., Yun, D. S., Strano, M. S., Ceder, G. & Belcher, A. M. (2009). Fabricating Genetically Engineered High-Power Lithium-Ion Batteries Using Multiple Virus Genes. *Science* **324**, 1051-1055.
5. Neltner, B., Peddie, B., Xu, A., Doenlen, W., Durand, K., Yun, D. S., Speakman, S., Peterson, A. & Belcher, A. (2010). Production of Hydrogen Using Nanocrystalline Protein-Templated Catalysts on M13 Phage. *ACS Nano* **4**, 3227-3235.
6. Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D. & Russel, M. (2011). Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. *Curr Issues Mol Biol* **13**, 51-76.
7. Lee, S. Y., Lim, J. S. & Harris, M. T. (2012). Synthesis and application of virus-based hybrid nanomaterials. *Biotechnol Bioeng* **109**, 16-30.
8. Ploss, M. & Kuhn, A. (2010). Kinetics of filamentous phage assembly. *Phys Biol* **7**, 045002.
9. Model, P. R., M. (2006). Filamentous Bacteriophage. In *The Bacteriophages* (Calendar, R., ed.), Vol. 2, pp. 146-160. Plenum Publishing, New York.
10. Rice, S. A., Tan, C. H., Mikkelsen, P. J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., Hauser, A., McDougald, D., Webb, J. S. & Kjelleberg, S. (2009). The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *Isme Journal* **3**, 271-282.
11. Jacobson, A. (1972). Role of F pili in the penetration of bacteriophage f1. *J Virol* **10**, 835-843.
12. Russel, M. & Model, P. (1989). Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it. *J Virol* **63**, 3284-95.
13. Feng, J. N., Model, P. & Russel, M. (1999). A trans-envelope protein complex needed for filamentous phage assembly and export. *Mol Microbiol* **34**, 745-55.
14. Marciano, D. K., Russel, M. & Simon, S. M. (1999). An aqueous channel for filamentous phage export. *Science* **284**, 1516-9.
15. Bennett, N. J. & Rakonjac, J. (2006). Unlocking of the filamentous bacteriophage virion during infection is mediated by the C domain of pIII. *J Mol Biol* **356**, 266-73.
16. Bennett, N. J., Gagic, D., Sutherland-Smith, A. J. & Rakonjac, J. (2011). Characterization of a Dual-Function Domain That Mediates Membrane Insertion and Excision of Ff Filamentous Bacteriophage. *Journal of Molecular Biology* **411**, 972-985.
17. Rakonjac, J., Feng, J. N. & Model, P. (1999). Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII. *Journal of Molecular Biology* **289**, 1253-1265.
18. Opalka, N., Beckmann, R., Boisset, N., Simon, M. N., Russel, M. & Darst, S. A. (2003). Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryo-electron microscopy. *Journal of Molecular Biology* **325**, 461-470.
19. Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A. K. Y., Schulten, K. & Baneyx, F. (2003). Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nature Materials* **2**, 577-585.
20. Kriplani, U. & Kay, B. K. (2005). Selecting peptides for use in nanoscale materials using phagedisplayed combinatorial peptide libraries. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 470-475.
21. Smith, G. P. (1985). Filamentous Fusion Phage - Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* **228**, 1315-1317.
22. Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., Mccafferty, J., Griffiths, A. D. & Winter, G. (1991). By-Passing Immunization - Human-Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage. *Journal of Molecular Biology* **222**, 581-597.
23. Schier, R., Marks, J. D., Wolf, E. J., Apell, G., Wong, C., Mccartney, J. E., Bookman, M. A., Huston, J. S., Houston, L. L., Weiner, L. M. & Adams, G. P. (1995). In-Vitro and in-Vivo Characterization of a Human Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv Isolated from a Filamentous Phage Antibody Library. *Immunotechnology* **1**, 73-81.
24. Mccafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. (1990). Phage Antibodies - Filamentous Phage Displaying Antibody Variable Domains. *Nature* **348**, 552-554.
25. Parmley, S. F. & Smith, G. P. (1988). Antibody-Selectable Filamentous Fd Phage Vectors - Affinity Purification of Target Genes. *Gene* **73**, 305-318.

26. Blondelguindi, S., Cwirla, S. E., Dower, W. J., Lipshutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J. F. & Gething, M. J. H. (1993). Affinity Panning of a Library of Peptides Displayed on Bacteriophages Reveals the Binding-Specificity of Bip. *Cell* **75**, 717-728.
27. Sidhu, S. S. & Koide, S. (2007). Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 481-487.
28. Cheadle, C., Ivashchenko, Y., South, V., Searfoss, G. H., French, S., Howk, R., Ricca, G. A. & Jaye, M. (1994). Identification of a Src Sh3 Domain Binding Motif by Screening a Random Phage Display Library. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 24034-24039.
29. Johannes, T. W. & Zhao, H. M. (2006). Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Current Opinion in Microbiology* **9**, 261-267.
30. Sanchez, S. & Demain, A. L. (2011). Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. *Organic Process Research & Development* **15**, 224-230.
31. Becktel, W. J. & Schellman, J. A. (1987). Protein Stability Curves. *Biopolymers* **26**, 1859-1877.
32. Jaenicke, R. (1996). How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability? *Naturwissenschaften* **83**, 544-554.
33. Nestl, B. M., Nebel, B. A. & Hauer, B. (2011). Recent progress in industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* **15**, 187-193.
34. Eijnsink, V. G. H., Gaseidnes, S., Borchert, T. V. & van den Burg, B. (2005). Directed evolution of enzyme stability. *Biomolecular Engineering* **22**, 21-30.
35. van den Burg, B. & Eijnsink, V. G. H. (2002). Selection of mutations for increased protein stability. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 333-337.
36. Bornscheuer, U. T. & Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 137-143.
37. Liu, D. N., Trodler, P., Eiben, S., Koschorreck, K., Muller, M., Pleiss, J., Maurer, S. C., Branney, C., Schmid, R. D. & Hauer, B. (2010). Rational Design of Pseudozyma antarctica Lipase B Yielding a General Esterification Catalyst. *ChemBiochem* **11**, 789-795.
38. Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R. & Gaillardin, C. (2000). Probing structural determinants specifying high thermostability in Bacillus licheniformis alpha-amylase. *Journal of Molecular Biology* **301**, 1041-1057.
39. Siegel, J. B., Zanghellini, A., Lovick, H. M., Kiss, G., Lambert, A. R., Clair, J. L. S., Gallaher, J. L., Hilvert, D., Gelb, M. H., Stoddard, B. L., Houk, K. N., Michael, F. E. & Baker, D. (2010). Computational Design of an Enzyme Catalyst for a Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction. *Science* **329**, 309-313.
40. Khare, S. D., Kipnis, Y., Greisen, P. J., Takeuchi, R., Ashani, Y., Goldsmith, M., Song, Y., Gallaher, J. L., Silman, I., Leader, H., Sussman, J. L., Stoddard, B. L., Tawfik, D. S. & Baker, D. (2012). Computational redesign of a mononuclear zinc metalloenzyme for organophosphate hydrolysis. *Nat Chem Biol* **8**, 294-300.
41. Jiang, L., Althoff, E. A., Clemente, F. R., Doyle, L., Rothlisberger, D., Zanghellini, A., Gallaher, J. L., Betker, J. L., Tanaka, F., Barbas, C. F., Hilvert, D., Houk, K. N., Stoddard, B. L. & Baker, D. (2008). De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science* **319**, 1387-1391.
42. Jermutus, L., Ryabova, L. A. & Pluckthun, A. (1998). Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 534-548.
43. Levin, A. M. & Weiss, G. A. (2006). Optimizing the affinity and specificity of proteins with molecular display. *Molecular Biosystems* **2**, 49-57.
44. Fernandez-Gacio, A., Uguen, M. & Fastrez, J. (2003). Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends in Biotechnology* **21**, 408-414.
45. Yan, X. H. & Xu, Z. R. (2006). Ribosome-display technology: applications for directed evolution of functional proteins. *Drug Discovery Today* **11**, 911-916.
46. Light, J. & Lerner, R. A. (1995). Random Mutagenesis of Staphylococcal Nuclease and Phage Display Selection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **3**, 955-967.
47. Bratkovic, T. (2010). Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 749-767.
48. Sieber, V., Plückthun, A. & Schmid, F. X. (1998). Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nature Biotechnology* **16**, 955-960.
49. Martin, A., Schmid, F. X. & Sieber, V. (2003). Proside: a phage based method for selecting thermostable proteins. *Methods in Molecular Biology* **230**, 57-70.
50. Parsell, D. & Sauer, R. (1989). The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 7590-7595.
51. Boeke, J. D. & Model, P. (1982). A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminus of bacteriophage fl gene III protein retains it in the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5200-5204.

52. Karlsson, F., Borrebaeck, C. A. K., Nilsson, N. & Malmberg-Hager, A. C. (2003). The mechanism of bacterial infection by filamentous phages involves molecular interactions between TolA and phage protein 3 domains. *Journal of Bacteriology* **185**, 2628-2634.
53. Ma, W., Tang, C. & Lai, L. (2005). Specificity of trypsin and chymotrypsin: loop-motion-controlled dynamic correlation as a determinant. *Biophys J* **89**, 1183-93.
54. Kather, I., Jakob, R. P., Dobbek, H. & Schmid, F. X. (2008). Increased Folding Stability of TEM-1 beta-Lactamase by In Vitro Selection. *Journal Of Molecular Biology* **383**, 238-251.
55. Wunderlich, M., Max, K. E., Roske, Y., Mueller, U., Heinemann, U. & Schmid, F. X. (2007). Optimization of the G-beta1 domain by computational design and by in vitro evolution: structural and energetic basis of stabilization. *J Mol Biol* **373**, 775-84.
56. Wunderlich, M., Martin, A., Staab, C. A. & Schmid, F. X. (2005). Evolutionary protein stabilization in comparison with computational design. *J Mol Biol* **351**, 1160-8.
57. Wunderlich, M. & Schmid, F. X. (2006). In vitro evolution of a hyperstable Gbeta1 variant. *J Mol Biol* **363**, 545-57.
58. Kremser, A. & Rasched, I. (1994). The adsorption protein of filamentous phage fd: assignment of its disulfide bridges and identification of the domain incorporated in the coat. *Biochemistry* **33**, 13954-8.
59. Stengele, I., Bross, P., Garces, X., Giray, J. & Rasched, I. (1990). Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites. *J Mol Biol* **212**, 143-149.
60. Holliger, P., Riechmann, L. & Williams, R. L. (1999). Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Angström: evidence for conformational lability. *J Mol Biol* **288**, 649-657.
61. Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. & Wlodawer, A. (1998). The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of G3P. *Nature Structural Biology* **5**, 140-147.
62. Weininger, U., Jakob, R. P., Eckert, B., Schweimer, K., Schmid, F. X. & Balbach, J. (2009). A remote prolyl isomerization controls domain assembly via a hydrogen bonding network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12335-40.
63. DeLano, W. L. (2003). The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>.
64. Eckert, B. S., F. X. (2006). Prolin als molekularer Schalter. *Biospektrum* **2**, 151-153.
65. Gray, C. W., Brown, R. S. & Marvin, D. A. (1981). Adsorption Complex of Filamentous Fd Virus. *Journal of Molecular Biology* **146**, 621-627.
66. Babic, A., Lindner, A. B., Vulic, M., Stewart, E. J. & Radman, M. (2008). Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science* **319**, 1533-1536.
67. Smith, G. R. (1991). Conjugal Recombination in Escherichia-Coli - Myths and Mechanisms. *Cell* **64**, 19-27.
68. Deng, L. W. & Perham, R. N. (2002). Delineating the Site of Interaction on the pIII Protein of Filamentous Bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli. *J Mol Biol* **319**, 603-614.
69. Marvin, D. A. & Hohn, B. (1969). Filamentous Bacterial Viruses. *Bacteriological Reviews* **33**, 172-&.
70. Clarke, M., Maddera, L., Harris, R. L. & Silverman, P. M. (2008). F-pili dynamics by live-cell imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17978-17981.
71. Sowa, B. A., Moore, D. & Ippenihler, K. (1983). Physiology of F-Pilin Synthesis and Utilization. *Journal of Bacteriology* **153**, 962-968.
72. Click, E. M. & Webster, R. E. (1998). The TolQRA proteins are required for membrane insertion of the major capsid protein of the filamentous phage f1 during infection. *Journal of Bacteriology* **180**, 1723-1728.
73. Holliger, P. & Riechmann, L. (1997). A conserved infection pathway for filamentous bacteriophages is suggested by the structure of the membrane penetration domain of the minor coat protein g3p from phage fd. *Structure* **5**, 265-75.
74. Levengoodfreyermuth, S. K., Click, E. M. & Webster, R. E. (1993). Role of the Carboxyl-Terminal Domain of TolA in Protein Import and Integrity of the Outer-Membrane. *Journal of Bacteriology* **175**, 222-228.
75. Braun, V. (1995). Energy-Coupled Transport and Signal-Transduction through the Gram-Negative Outer-Membrane Via TonB-Exbb-Exbd-Dependent Receptor Proteins. *Fems Microbiology Reviews* **16**, 295-307.
76. Moeck, G. S. & Coulton, J. W. (1998). TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* **28**, 675-81.
77. Derouiche, R., Gavioli, M., Benedetti, H., Prilipov, A., Lazdunski, C. & Lloubes, R. (1996). TolA central domain interacts with Escherichia coli porins. *Embo Journal* **15**, 6408-6415.
78. Glaser-Wuttke, G., Keppner, J. & Rasched, I. (1989). Pore-forming properties of the adsorption protein of filamentous phage fd. *Biochimica Et Biophysica Acta* **985**, 239-47.

79. Eckert, B. (2007). Die Bedeutung der Stabilität und des Faltungsmechanismus des Gen-3-Proteins filamentöser Phagen für die Infektion von *Escherichia coli*. Dissertation, Universität Bayreuth.
80. Lorenz, S. H. & Schmid, F. X. (2011). Reprogramming the infection mechanism of a filamentous phage. *Mol Microbiol* **80**, 827-34.
81. Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. & Wlodawer, A. (1999). Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure* **7**, 711-722.
82. Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**, 774-97.
83. Lorenz, S. H. (2010). Von der Faltung zur Funktion: Steuerung des Infektionsmechanismus filamentöser Phagen durch Faltungsprozesse und Beschleunigung oxidativer Faltung durch Thioloxygenasen. Dissertation, Universität Bayreuth.
84. Riechmann, L. & Holliger, P. (1997). The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of E-coli. *Cell* **90**, 351-360.
85. Wiseman, R. L., Marvin, D. A. & Dunker, A. K. (1972). Filamentous Bacterial Viruses .3. Physical and Chemical Characterization of Ifl Virion. *Virology* **48**, 230-&.
86. Meynell, G. G. & Lawn, A. M. (1968). Filamentous phages specific for the I sex factor. *Nature* **217**, 1184-6.
87. Peeters, B. P., Schoenmakers, J. G. & Konings, R. N. (1987). Comparison of the DNA sequences involved in replication and packaging of the filamentous phages IKe and Ff (M13, fd, and fl). *DNA* **6**, 139-47.
88. Peeters, B. P., Peters, R. M., Schoenmakers, J. G. & Konings, R. N. (1985). Nucleotide sequence and genetic organization of the genome of the N-specific filamentous bacteriophage IKe. Comparison with the genome of the F-specific filamentous phages M13, fd and fl. *Journal of Molecular Biology* **181**, 27-39.
89. Bradley, D. E. (1979). Morphology of Pili Determined by the N-Incompatibility Group Plasmid N3 and Interaction with Bacteriophage-Pr4 and Bacteriophage-Ike. *Plasmid* **2**, 632-636.
90. Endemann, H., Gailus, V. & Rasched, I. (1993). Interchangeability of the Adsorption Proteins of Bacteriophages Ff and Ike. *J Virol* **67**, 3332-3337.
91. Lorenz, S. H., Jakob, R. P., Weininger, U., Balbach, J., Dobbek, H. & Schmid, F. X. (2011). The filamentous phages fd and IF1 use different mechanisms to infect *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **405**, 989-1003.
92. Endemann, H., Bross, P. & Rasched, I. (1992). The Adsorption Protein of Phage Ike - Localization by Deletion Mutagenesis of Domains Involved in Infectivity. *Mol Microbiol* **6**, 471-478.
93. Khatoun, H., Iyer, R. V. & Iyer, V. N. (1972). A new filamentous bacteriophage with sex-factor specificity. *Virology* **48**, 145-55.
94. Jakob, R. P. (2009). Das Gen-3-Protein filamentöser Phagen als Modellsystem zur Untersuchung von Proteinstabilität, Faltungsmechanismen und Prolylisomerisierung. Dissertation, Universität Bayreuth.
95. Geitner, A.-J. (2007). Das Gen-3-Protein des Phagen IKe, Universität Bayreuth.
96. Eckert, B., Martin, A., Balbach, J. & Schmid, F. X. (2005). Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**, 619-623.
97. Eckert, B. & Schmid, F. X. (2007). A Conformational Unfolding Reaction Activates Phage fd for the Infection of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **373**, 452-61.
98. Jackson, S. E. (1998). How do small single-domain proteins fold? *Fold Des* **3**, R81-91.
99. Kragelund, B. B., Robinson, C. V., Knudsen, J., Dobson, C. M. & Poulsen, F. M. (1995). Folding of a four-helix bundle: Studies of acyl-coenzyme A binding protein. *Biochemistry* **34**, 7217-7224.
100. Schonbrunner, N., Koller, K. P. & Kiefhaber, T. (1997). Folding of the disulfide-bonded beta-sheet protein tendamistat: rapid two-state folding without hydrophobic collapse. *Journal of Molecular Biology* **268**, 526-38.
101. Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A. & Schmid, F. X. (1995). Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat Struct Biol* **2**, 663-73.
102. Garel, J.-R. (1992). Folding of large proteins: multidomain and multisubunit proteins. In *Protein Folding* 1 edit. (Creighton, T. E., ed.), pp. 405-454. Freeman, New York.
103. Jaenicke, R. (1999). Stability and folding of domain proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **71**, 155-241.
104. Creighton, T. E. (1992). Folding pathways determined using disulfide bonds. In *Protein Folding* (Creighton, T. E., ed.), pp. 301-351. W.H.Freeman, New York.
105. Sosnick, T. R., Mayne, L. & Englander, S. W. (1996). Molecular collapse: The rate-limiting step in two-state cytochrome c folding. *Protein-Struct.Funct.Genet.* **24**, 413-426.
106. Balbach, J. & Schmid, F. X. (2000). Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding* (Pain, R. H., ed.), pp. 212-237. Oxford University Press, Oxford.

107. Scherer, G., Kramer, M. L., Schutkowski, M., U., R. & Fischer, G. (1998). Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5568-5574.
108. Stewart, D. E., Sarkar, A. & Wampler, J. E. (1990). Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *Journal of Molecular Biology* **214**, 253-260.
109. Feng, Y., Hood, W. F., Forgey, R. W., Abegg, A. L., Caparon, M. H., Thiele, B. R., Leimgruber, R. M. & McWherter, C. A. (1997). Multiple conformations of a human interleukin-3 variant. *Protein Sci* **6**, 1777-82.
110. Higgins, K. A., Craik, D. J., Hall, J. G. & Andrews, P. R. (1988). Cis-trans isomerization of the proline residue in insulin studied by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Drug Design and Delivery* **3**, 159-170.
111. Yuan, X., Downing, A. K., Knott, V. & Handford, P. A. (1997). Solution structure of the transforming growth factor beta-binding protein-like module, a domain associated with matrix fibrils. *Embo J* **16**, 6659-66.
112. Yuan, X., Werner, J. M., Knott, V., Handford, P. A., Campbell, I. D. & Downing, K. (1998). Effects of proline cis-trans isomerization on TB domain secondary structure. *Protein Science* **7**, 2127-35.
113. Mallis, R. J., Brazin, K. N., Fulton, D. B. & Andreotti, A. H. (2002). Structural characterization of a proline-driven conformational switch within the Itk SH2 domain. *Nat Struct Biol* **9**, 900-905.
114. Brazin, K. N., Mallis, R. J., Fulton, D. B. & Andreotti, A. H. (2002). Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1899-904.
115. Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**, 4953-4963.
116. Scholz, C., Schindler, T., Dolinski, K., Heitman, J. & Schmid, F. X. (1997). Cyclophilin active-site mutants have native prolyl isomerase activity with a protein substrate. *FEBS Lett.* **414**, 69-73.
117. Maier, R., Eckert, B., Scholz, C., Lilie, H. & Schmid, F. X. (2003). Interaction of trigger factor with the ribosome. *Journal of Molecular Biology* **326**, 585-592.
118. Hesterkamp, T. & Bukau, B. (1996). Identification of the prolyl isomerase domain of Escherichia coli trigger factor. *FEBS Lett.* **385**, 67-71.
119. Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J. & Schmid, F. X. (2006). SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* **45**, 20-33.
120. Martin, A. & Schmid, F. X. (2003). A proline switch controls folding and domain interactions in the gene-3-protein of the filamentous phage fd. *J. Mol. Biol.* **331**, 1131-1140.
121. Martin, A. & Schmid, F. X. (2003). Evolutionary stabilization of the gene-3-protein of phage fd reveals the principles that govern the thermodynamic stability of two-domain proteins. *J. Mol. Biol.* **328**, 863-875.
122. Martin, A. & Schmid, F. X. (2003). The folding mechanism of a two-domain protein: folding kinetics and domain docking of the gene-3-protein of phage fd. *J. Mol. Biol.* **329**, 599-610.
123. DeLano, W. L. (2003). The PyMOL molecular graphics system. In *DeLano Scientific LLC*. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
124. Riechmann, L. & Holliger, P. (1997). The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of E. coli. *Cell* **90**, 351-60.
125. Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D., Krebber, A., Ge, L. M. & Pluckthun, A. (1997). Selectively-infective phage (SIP): A mechanistic dissection of a novel in vivo selection for protein-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology* **268**, 607-618.
126. Wunschel, C. (2008). Faltung des Phagen Gen-3-Proteins. Bachelorarbeit, Universität Bayreuth.
127. Knappe, T. A., Eckert, B., Schaarschmidt, P., Scholz, C. & Schmid, F. X. (2007). Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. *J Mol Biol* **368**, 1458-68.
128. Wunderlich, M. (2006). Thermodynamische Stabilisierung von Proteinen durch *in vitro* Evolution und biophysikalische Analyse ihrer molekularen Grundlagen. Dissertation, Universität Bayreuth.
129. Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
130. Kuzmic, P. (2009). DynaFit--a software package for enzymology. *Methods Enzymol* **467**, 247-80.
131. Kuzmic, P. (1996). Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase. *Analytical Biochemistry* **237**, 260-273.
132. Schagger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.
133. Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**, 319-26.
134. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* **31**, 3784-3788.

135. Mayr, L. M., Landt, O., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1993). Stability and folding kinetics of ribonuclease T1 are strongly altered by the replacement of *cis*-proline 39 with alanine. *Journal of Molecular Biology* **231**, 897-912.
136. Privalov, P. L. (1993). Physical basis of the stability of the folded conformations of Proteins. In *Protein folding* (Creighton, T. E., ed.). Freeman, New York.
137. Beasty, A. M., Hurler, M. R., Manz, J. T., Stackhouse, T., Onuffer, J. J. & Matthews, C. R. (1986). Effects of the Phenylalanine-22-]Leucine, Glutamic Acid-49-]Methionine, Glycine-234-]Aspartic Acid, and Glycine-234-]Lysine Mutations on the Folding and Stability of the Alpha-Subunit of Tryptophan Synthase from Escherichia-Coli. *Biochemistry* **25**, 2965-2974.
138. Lassalle, M. W., Hinz, H. J., Wenzel, H., Vlasi, M., Kokkinidis, M. & Cesareni, G. (1998). Dimer-to-tetramer transformation: loop excision dramatically alters structure and stability of the ROP four alpha-helix bundle protein. *J Mol Biol* **279**, 987-1000.
139. Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in Enzymology* **131**, 266-280.
140. Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Adv Protein Chem* **23**, 121-282.
141. Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988). Unfolding Free-Energy Changes Determined by the Linear Extrapolation Method .1. Unfolding of Phenylmethanesulfonyl Alpha-Chymotrypsin Using Different Denaturants. *Biochemistry* **27**, 8063-8068.
142. Schmid, F. X. (1983). Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates. *Biochemistry* **22**, 4690-4696.
143. Schmid, F. X. (1986). Fast-folding and slow-folding forms of unfolded proteins. In *Enzyme Structure Part L 1* edit. (Hirs, C. H. W. & Timasheff, S. N., eds.), Vol. 131, pp. 71-82. Academic Press, New York.
144. Mayor, U., Johnson, C. M., Daggett, V. & Fersht, A. R. (2000). Protein folding and unfolding in microseconds to nanoseconds by experiment and simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13518-13522.
145. McCallister, E. L., Alm, E. & Baker, D. (2000). Critical role of beta-hairpin formation in protein G folding. *Nat Struct Biol* **7**, 669-73.
146. Daggett, V. & Fersht, A. R. (2003). Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 18-25.
147. Netzer, W. J. & Hartl, F. U. (1997). Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388**, 343-349.
148. Hawkins, A. R. & Lamb, H. K. (1995). The Molecular-Biology of Multidomain Proteins - Selected Examples. *European Journal of Biochemistry* **232**, 7-18.
149. Tsunenaga, M., Goto, Y., Kawata, Y. & Hamaguchi, K. (1987). Unfolding and refolding of a type kappa immunoglobulin light chain and its variable and constant fragments. *Biochemistry* **26**, 6044-6051.
150. Jakob, R. P. (2004). Das Gen-3-Protein des Phagen fd: Stabilität, Faltungskinetik und Kristallisation. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
151. Jakob, R. P. & Schmid, F. X. (2008). Energetic coupling between native-state prolyl isomerization and conformational protein folding. *J. Mol. Biol.* **377**, 1560-1575.
152. Lorenz, S. H. (2006). Beschleunigung der Faltung des Gen-3-Proteins des Phagen fd durch *in vitro*-Evolution. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
153. Kiefhaber, T., Kohler, H. H. & Schmid, F. X. (1992). Kinetic Coupling Between Protein Folding and Prolyl Isomerization .1. Theoretical Models. *Journal of Molecular Biology* **224**, 217-229.
154. Schmid, F. X. & Baldwin, R. L. (1979). The rate of interconversion between the two unfolded forms of ribonuclease A does not depend on guanidinium chloride concentration. *Journal of Molecular Biology* **133**, 285-287.
155. Odefey, C., Mayr, L. M. & Schmid, F. X. (1995). Non-Prolyl Cis-Trans Peptide-Bond Isomerization as a Rate-Determining Step in Protein Unfolding and Refolding. *Journal of Molecular Biology* **245**, 69-78.
156. Drakenberg, T., Dahlqvist, K.-I. & Forsén, S. (1972). The barrier to internal rotation in amides. IV. N,N'-Dimethylamides; substituent and solvent effects. *J. Phys. Chem.* **76**, 2178-2183.
157. Jakob, R. P. & Schmid, F. X. (2009). Molecular determinants of a native-state prolyl isomerization. *J Mol Biol* **387**, 1017-31.
158. Jakob, R. P., Zoldák, G., Aumüller, T. & Schmid, F. X. (2009). Chaperone domains convert prolyl isomerases into generic catalysts of protein folding. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **106**, 20282-20287.
159. Scholz, C., Scherer, G., Mayr, L. M., Schindler, T., Fischer, G. & Schmid, F. X. (1998). Prolyl Isomerases Do Not Catalyze Isomerization of Non-Prolyl Peptide Bonds. *Biological Chemistry* **379**, 361-365.
160. Schmidpeter, P. A., Jahreis, G., Geitner, A. J. & Schmid, F. X. Prolyl isomerases show low sequence specificity toward the residue following the proline. *Biochemistry* **50**, 4796-803.

161. Kather, I., Jakob, R., Dobbek, H. & Schmid, F. X. (2008). Changing the determinants of protein stability from covalent to non-covalent interactions by in-vitro evolution: a structural and energetic analysis. *J. Mol. Biol.* **381**, 1040-1054
162. Stein, R. L. (1993). Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis- trans isomerization. *Advances in Protein Chemistry* **44**, 1-24.
163. Steegborn, C., Schneider-Hassloff, H., Zeeb, M. & Balbach, J. (2000). Cooperativity of a protein folding reaction probed at multiple chain positions by real-time 2D NMR spectroscopy. *Biochemistry* **39**, 7910-7919.
164. Bai, Y. W., Milne, J. S., Mayne, L. & Englander, S. W. (1993). Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange. *Proteins: Structure Function and Genetics* **17**, 75-86.
165. Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
166. Delbrück, M. v. (2009). Analyse des Faltungsmechanismus der N2-Domäne des Phagen-Gen-3-Proteins. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
167. Paci, E., Vendruscolo, M., Dobson, C. M. & Karplus, M. (2002). Determination of a transition state at atomic resolution from protein engineering data. *Journal of Molecular Biology* **324**, 151-163.
168. Fersht, A. R., Matouschek, A. & Serrano, L. (1992). The Folding of an Enzyme .1. Theory of Protein Engineering Analysis of Stability and Pathway of Protein Folding. *Journal of Molecular Biology* **224**, 771-782.
169. Hofmann, S. D. (2010). Optimierung der Bindungsfähigkeit filamentöser Phagen an die C-terminale Domäne des Rezeptors TolA. Masterarbeit, Universität Bayreuth.
170. Nilsson, N., Malmborg, A. C. & Borrebaeck, C. A. K. (2000). The phage infection process: A functional role for the distal linker region of bacteriophage protein 3. *J Virol* **74**, 4229-4235.
171. Bross, P., Bussmann, K., Keppner, W. & Rasched, I. (1988). Functional-Analysis of the Adsorption Protein of 2 Filamentous Phages with Different Host Specificities. *J Gen Microbiol* **134**, 461-471.
172. Wunderlich, M., Martin, A. & Schmid, F. X. (2005). Stabilization of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis* by evolutionary optimization of Coulombic interactions. *J Mol Biol* **347**, 1063-76.
173. Gallagher, T., Alexander, P., Bryan, P. & Gilliland, G. L. (1994). Two crystal structures of the B1 immunoglobulin-binding domain of streptococcal protein G and comparison with NMR. *Biochemistry* **33**, 4721-9.
174. Thoms, S., Max, K. E. A., Wunderlich, M., Jacso, T., Lilie, H., Reif, B., Heinemann, U. & Schmid, F. X. (2009). Dimer Formation of a Stabilized G beta 1 Variant: A Structural and Energetic Analysis. *Journal of Molecular Biology* **391**, 918-932.
175. Thoms, S. (2007). Stabilisierung des Gβ1-Proteins aus *Streptococcus* mittels gerichteter Evolution. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
176. Sturtevant, J. M. (1987). Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry. *Annual Review of Physical Chemistry* **38**, 463-488.
177. Byeon, I. J., Louis, J. M. & Gronenborn, A. M. (2003). A protein contortionist: core mutations of GB1 that induce dimerization and domain swapping. *J Mol Biol* **333**, 141-52.
178. Louis, J. M., Byeon, I. J. L., Baxal, U. & Gronenborn, A. M. (2005). The GB1 amyloid fibril: Recruitment of the peripheral beta-strands of the domain swapped dimer into the polymeric interface. *Journal of Molecular Biology* **348**, 687-698.
179. Jee, J., Byeon, I. J., Louis, J. M. & Gronenborn, A. M. (2008). The point mutation A34F causes dimerization of GB1. *Proteins* **71**, 1420-31.
180. Ghose, A. K. & Crippen, G. M. (1986). Atomic physiochemical parameters for three-dimensional structure-directed quantitative structure-activity relationships. I. Partition coefficients as a measure of hydrophobicity. *J. Comput. Chem.* **7**, 565-577.
181. Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N. & Wendoloski, J. J. (1998). Prediction of hydrophobic (lipophilic) properties of small organic molecules using fragmental methods: An analysis of ALOGP and CLOGP methods. *J. Phys. Chem. A* **102**, 3762-3772.
182. Steinkellner, G., Rader, R., Thallinger, G. G., Kratky, C. & Gruber, K. (2009). VASCo: computation and visualization of annotated protein surface contacts. *BMC Bioinformatics* **10**, 32.
183. Schwab, T., Skegrod, D., Mayans, O. & Sterner, R. (2008). A rationally designed monomeric variant of anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus* is as active as the dimeric wild-type enzyme but less thermostable. *J Mol Biol* **376**, 506-16.
184. Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. & Wierenga, R. K. (1997). A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* **36**, 9655-62.
185. Thoma, R., Hennig, M., Sterner, R. & Kirschner, K. (2000). Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure* **8**, 265-76.

186. McCallister, E. L., Alm, E. & Baker, D. (2000). Critical role of beta-hairpin formation in protein G folding. *Nature Structural Biology* **7**, 669-673.
187. Jacobs, D. M., Lipton, A. S., Isern, N. G., Daughdrill, G. W., Lowry, D. F., Gomes, X. & Wold, M. S. (1999). Human replication protein A: Global fold of the N-terminal RPA-70 domain reveals a basic cleft and flexible C-terminal linker. *Journal of Biomolecular Nmr* **14**, 321-331.
188. Robinson, C. R. & Sauer, R. T. (1998). Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5929-5934.
189. Baumgärtel, C. (2009). Die stabilisierende Mutation D36A in der  $\beta$ 1-Domäne des G-Proteins aus *Streptococcus* (G $\beta$ 1). Bachelorarbeit, Universität Bayreuth.
190. Clantin, B., Tricot, C., Lonhienne, T., Stalon, V. & Villeret, V. (2001). Probing the role of oligomerization in the high thermal stability of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase by site-specific mutants. *Eur J Biochem* **268**, 3937-42.
191. Jaenicke, R. & Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 738-748.
192. Kather, I., Bippes, C. A. & Schmid, F. X. (2005). A stable disulfide-free gene-3-protein of phage fd generated by in vitro evolution. *J Mol Biol* **354**, 666-78.

## 10. Anhang

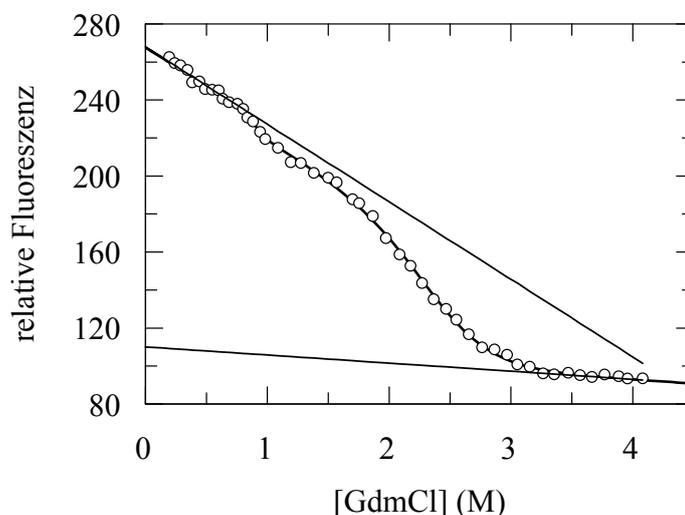


Abbildung 10.1: GdmCl-induzierter Gleichgewichtsübergang der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IIHY. Auftragung der relativen Fluoreszenz bei 325 nm nach Anregung bei 295 nm als Funktion der GdmCl-Konzentration. Der Übergang wurde gemäß eines Dreizustandsmodells ausgewertet. Die Messung von 2  $\mu$ M Protein wurde in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 25 °C durchgeführt. Die aus der Datenanalyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.4.2 aufgelistet.

Tabelle 10.1: Parameter der Analyse der Faltung der N1-Domäne des G3P\* mit veränderter erster Schleife.

N1-Domäne der Variante	$m_{RF}$ ( $M^{-1}$ )	$k_{RF}$ ( $s^{-1}$ )	$m_{EF}$ ( $M^{-1}$ )	$k_{EF}$ ( $s^{-1}$ )	$[GdmCl]_m$ (M)	$m$ ( $kJ mol^{-1} M^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $kJ mol^{-1}$ )
Isolierte N1	-1,205	302	1,062	1,421	2,4	5,6	13,3
N1 EGDS	-1,086	373	0,962	0,367	3,4	5,1	17,2
N1 T13I	-1,017	281	1,02	0,357	3,3	5,0	16,5
N1 T13I EGDS	-1,033	416	0,941	0,111	4,1	4,9	20,4
fd G3P* EGDS	-0,994	299	0,866	0,531	3,4	4,6	15,7
fd G3P* IIHY EGDS	-0,904	285	1,53	0,006	4,4	6,0	26,5

Aufgelistet sind die mikroskopischen Entfaltungs- ( $k_{EF}$ ) und Rückfaltungsraten ( $k_{RF}$ ) extrapoliert auf 0 M GdmCl sowie die entsprechenden kinetischen  $m$ -Werte nach Auswertung der in den Abbildungen 3.3.5 und 3.3.12 gezeigten Daten gemäß eines Zweizustandsmodells (Gleichung 28). Der Übergangsmittelpunkt  $[GdmCl]_m$ , die freie Energie der Entfaltung  $\Delta G$  sowie Kooperativität  $m$  wurden über die Gleichung 29 bzw. 30 berechnet. Die kinetischen Daten wurden, wie in den Abbildungen beschrieben, gemessen bzw. den entsprechenden Referenzen entnommen.

Tabelle 10.2: Parameter der Analyse der Faltung der isolierten IF1-N1-Domäne und der Chimäre.

N1-Domäne der Variante	$m_{RF}$ ( $M^{-1}$ )	$k_{RF}$ ( $s^{-1}$ )	$m_{EF}$ ( $M^{-1}$ )	$k_{EF}$ ( $s^{-1}$ )	$[GdmCl]_m$ (M)	$m$ ( $kJ mol^{-1} M^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $kJ mol^{-1}$ )
Isolierte IF1-N1	-1,309	791	1,031	0,099	3,8	5,8	22,3
Isolierte IF1-N1 <sub>DDKTL</sub> D	-1,398	298	1,117	0,823	2,3	6,3	14,6
fd G3P* IF1-N1 <sub>DDKTL</sub> D IHY	-1,329	205	1,098	0,855	2,3	6,0	13,6

Aufgelistet sind die mikroskopischen Entfaltungs- ( $k_{EF}$ ) und Rückfaltungsraten ( $k_{RF}$ ) extrapoliert auf 0 M GdmCl sowie die entsprechenden kinetischen  $m$ -Werte nach Auswertung der in den Abbildungen 3.4.2 und 3.4.3 gezeigten Daten gemäß eines Zweizustandsmodells (Gleichung 28). Der Übergangsmittelpunkt  $[GdmCl]_m$ , die freie Energie der Entfaltung  $\Delta G$  sowie Kooperativität  $m$  wurden über die Gleichung 29 bzw. 30 berechnet. Die kinetischen Daten wurden, wie in den Abbildungen beschrieben, gemessen. Die Daten für isolierte IF1-N1-Domäne wurden der Arbeit<sup>91</sup> entnommen.

Tabelle 10.3: Stabilitätsdaten der N2-Domäne in der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY aus Harnstoff-induzierter Entfaltung.

Variante	$[Harnstoff]_m$ (M)	$m$ ( $kJ mol^{-1} M^{-1}$ )	$\Delta G^{15^\circ C}$ ( $kJ mol^{-1}$ )
isolierte N2 Q129H	2,6	6,8	17,9
fd G3P* IIHY $\Delta\beta 6$	2,6	9,5	24,0
fd G3P* IF1-N1 <sub>DDKTL</sub> D IHY	4,1	9,9	40,1
fd G3P* IIHY	5,9	8,9	52,3

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte  $[Harnstoff]_m$ , die Kooperativitätsparameter  $m$  sowie die auf 0 M Harnstoff extrapolierten freien Enthalpien der Entfaltung  $\Delta G$  von N2 in verschiedenen G3P-Varianten bei 15 °C. Der Übergang der N2-Domäne in der Chimäre fd G3P\* IF1-N1<sub>DDKTL</sub>D IHY wurde nach Anregung bei 280 nm anhand der Fluoreszenz bei 300 nm gemessen. Die Analyse der Daten nach einem Zweizustandsmodell. Die Messung von 1  $\mu$ M Protein wurde in 0,1 M KP-Puffer, pH 7,0 mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 15 °C durchgeführt. Die Daten für isolierte N2 Q129H, WT fd G3P\* und für fd G3P\* IIHY  $\Delta\beta 6$  der Referenz<sup>83</sup> entnommen.

Tabelle 10.4: Konzentrationsabhängige Stabilitätsdaten aus den thermisch-induzierten Entfaltungsübergängen selektierter Varianten und WT-G $\beta$ 1.

Ursprung	Position					[Protein] ( $\mu$ M)	$T_M$ ( $^{\circ}$ C)	$\Delta H_{vH}$ (Monomer) (kJ mol $^{-1}$ )
	16	18	33	36	37			
WT-G $\beta$ 1	<i>Thr</i>	<i>Thr</i>	<i>Tyr</i>	<i>Asp</i>	<i>Asn</i>	1	51,0	181
						10	50,5	188
Selektion auf die Positionen 16, 33 und 37	Phe	<i>Thr</i>	Met	<i>Asp</i>	Leu	1	71,7	221
						10	72,4	253
	Leu	<i>Thr</i>	Leu	<i>Asp</i>	Ile	1	71,9	333
						10	75,6	342
Selektion auf die Positionen 16, 18, 33 und 37	Leu	Ile	<i>Tyr</i>	<i>Asp</i>	Leu	1	79,7	374
						10	83,3	395
	Leu	Ile	<i>Tyr</i>	Ala	Leu	1	87,4	387
						10	91,1	421
	Phe	Leu	Ile	<i>Asp</i>	Leu	1	80,8	291
						10	84,2	331
	Phe	Ile	Ile	<i>Asp</i>	Leu	1	84,3	337
						10	87,0	358

Aufgelistet sind für WT-G $\beta$ 1 und die mittels der *Proside*-Methode selektierten G $\beta$ 1-Varianten der Übergangsmittelpunkt  $T_M$  und die van't Hoff Enthalpien  $\Delta H_{vH}$ (Monomer) nach Auswertung der thermischen Übergänge gemäß des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$ . Für die Auswertung wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von 4000 J mol $^{-1}$  K $^{-1}$  angenommen. Die ursprünglichen AS an den fünf Positionen sind kursiv geschrieben. Die Daten von 1 bzw. 10  $\mu$ M Protein wurden in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 in Gegenwart von 1,5 M GdmCl mit einer Schichtdicke von 1 cm, einer Heizrate von 90  $^{\circ}$ C h $^{-1}$  und einer Dämpfung von 8 s anhand des CD-Signals bei 222,6 nm gemessen.

Tabelle 10.5: Konzentrationsabhängige Stabilitätsdaten aus den thermisch-induzierten Entfaltungsübergängen der Varianten 5-9, G $\beta$ 1-M2 und WT-G $\beta$ 1.

Variante	Position				[Protein] ( $\mu$ M)	$T_M$ ( $^{\circ}$ C)	$\Delta H_{vH}$ (Monomer) (kJ mol $^{-1}$ )
	15	16	18	37			
WT-G $\beta$ 1	<i>Glu</i>	<i>Thr</i>	<i>Thr</i>	<i>Asn</i>	1	51,0	181
					10	50,5	188
5	<i>Glu</i>	Leu	Ile	Leu	1	79,7	364
					10	82,8	376
6	Val	<i>Thr</i>	Ile	Leu	1	58,3	169
					10	57,9	180
7	Val	Leu	<i>Thr</i>	Leu	1	73,1	312
					10	76,8	335
8	Val	Leu	Ile	<i>Asn</i>	1	67,9	220
					10	67,8	211
9	<i>Glu</i>	Leu	<i>Thr</i>	Leu	1	67,6	254
					10	71,6	290
G $\beta$ 1-M2	Val	Leu	Ile	Leu	1	83,1	360
					10	86,7	391

Aufgelistet sind für WT-G $\beta$ 1 und die untersuchten G $\beta$ 1-Varianten der Übergangsmittelpunkt  $T_M$  und die van't Hoff Enthalpien  $\Delta H_{vH}$ (Monomer) nach Auswertung der thermischen Übergänge bei verschiedenen Proteinkonzentrationen gemäß des Zweizustandsmodells  $N \rightleftharpoons U$ . Für die Auswertung wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von 4000 J mol $^{-1}$  K $^{-1}$  angenommen. Die ursprünglichen AS an den vier Positionen sind kursiv geschrieben. Die Daten von 1 bzw. 10  $\mu$ M Protein wurden in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,0 in Gegenwart von 1,5 M GdmCl mit einer Schichtdicke von 1 cm, einer Heizrate von 90  $^{\circ}$ C h $^{-1}$  und einer Dämpfung von 8 s anhand des CD-Signals bei 222,6 nm gemessen.



	CGGTGATACACC	fd N2
IF1_NT_NdeI(+)	GGAATTCCATATGGCAACTACAGACGCTGAA TGTTTAAGTAAACT	Klonierung von N1 IF1 G3P* in fd, <i>NdeI</i> - Schnittstelle
BE_N1IF1_turnfd(+)	CGTTATGCAAATTTTGAAAACGTCATTTACGA AC	<i>Blunt End</i> , Austausch Schleife 1 IF1 N1 gegen DDKTL D Sequenz
BE_N1IF1_turnfd(-)	ATCTAAAGTTTTGTCGTCCTTCCAGACATTAC TTAATGTGCC	<i>Blunt End</i> , Austausch Schleife 1 IF1 N1 gegen DDKTL D Sequenz
BE_IF1N1_Pos45(-)	ATAACCGATACCAATACCCGAAAGTTCGTA	<i>Blunt End</i> , Substitution S50Q in IF1 N1
BE_IF1N1_S50Q(+)	GATAATGATACTCAGTGGAAATGGGCACTGGA CGCCTGTTCTGCTGCT	<i>Blunt End</i> , <i>Blunt End</i> , Substitutionen, S50Q in IF1 N1
BE_IF1N1E37N(-)	GTAATGCAGTTTTCAAAAATTTGCATA	<i>Blunt End</i> , Substitution E37N in IF1 N1
BE_IF1N1E37N(+)	CAACTTTCGGGTATTGGTATCGGTTATGATAA T	<i>Blunt End</i> , Substitution E37N in IF1 N1
Gb1H1BEY33Xb	GCGAACGACCTCGGT	<i>Blunt End</i> , Substitution Y33X in Gβ1-M2
Gb1M2BEY33Ta	AGTTTGTTTGAAGACTTTTTTC	<i>Blunt End</i> , Substitution Y33T in Gβ1-M2
Gb1M2BEY33Va	AACTTGTTTGAAGACTTTTTTC	<i>Blunt End</i> , Substitution Y33V in Gβ1-M2
Gb1M2BEY33La	AAGTTTGTTTGAAGACTTTTTTC	<i>Blunt End</i> , Substitution Y33L in Gβ1-M2
Gb1M2BEY33Ia	AATTTGTTTGAAGACTTTTTTC	<i>Blunt End</i> , Substitution Y33I in Gβ1-M2
Gb1M2BEY33Aa	GGCTTGTTTGAAGACTTTTTTC	<i>Blunt End</i> , Substitution Y33A in Gβ1-M2
TolA-N-Nde	GGAATTCCATATGGATGATATTTTCGGTGA	Klonierung von TolAC (AS 295-421), <i>NdeI</i> - Schnittstelle
TolAC_D210V_K212D (-)Cys_BamHI(-)	GAAGTGTTCAAAAACGCGCCATTGGTGTTCG ATCCGTGCGCGGCCGCACATCACCATCACCAT CACTAGTAAGGATCCCG	Klonierung von TolAC- Variante (AS 295-421), <i>BamHI</i> -Schnittstelle



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2007 bis Februar 2012 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Franz X. Schmid angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für die Möglichkeit, dieses herausfordernde Thema zu bearbeiten, und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bedanken. Er hatte durch seine Ratschläge und Ideen maßgeblichen Anteil am Entstehen dieser Arbeit.

Meinen Laborkolleginnen und -kollegen Barbara Eckert, Anne-Juliane Geitner, Roman Jakob, Insa Kather, Johanna Koch, Stefan Lorenz, Philipp Schmidpeter und Gabriel Zoldák danke ich für ihren fachlichen Rat, ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Für ihren Einsatz im Rahmen ihrer Mitarbeiterpraktika, Bachelor- und Masterarbeiten möchte ich Stefanie Hara, Christine Baumgärtel, Stefanie Hofmann, Maximilian Sauer und Anna Schneider danken.

Mein besonderer Dank gilt Anne-Juliane Geitner, Johanna Koch und Philipp Schmidpeter nicht nur für das Korrekturlesen der Arbeit, sondern vor allem auch für die vielen (nicht-) wissenschaftlichen Gespräche und Diskussionen, bei denen ich viel gelernt und noch mehr gelacht habe.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Jochen Balbach und vor allem Ulrich Weininger für die Durchführung der vielen und komplizierten NMR-Messungen zum G3P\* und deren Analyse sowie für viele interessante Diskussionen.

Für die angenehme Zusammenarbeit zur Bestimmung der Struktur von G $\beta$ 1-M2 möchte ich Klaas Max und Prof. Dr. Udo Heinemann danken. Herr Dr. Hauke Lilie, Universität Halle-Wittenberg, hat dankenswerterweise die analytische Ultrazentrifugation des Proteins durchgeführt.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern Susan und Bernhard danke ich ganz herzlich für ihre Geduld und vielfältige Unterstützung, nicht nur während meiner Doktorandenzeit.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Sebastian, der mich stets bestärkt hat, wenn ich an mir gezweifelt habe. Danke für deine großartige Unterstützung, dein Verständnis und dein Vertrauen.



## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich hab keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 29. Februar 2012