

**Von der Faltung zur Funktion:
Steuerung des Infektionsmechanismus filamentöser
Phagen durch Faltungsprozesse und Beschleunigung
oxidativer Faltung durch Thioloxygenasen**

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker

Stefan Lorenz

Bayreuth 2010

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2006 bis Juni 2010 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 Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Stephan Clemens

Promotionsgesuch eingereicht am: 29. Juni 2010

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 22. Oktober 2010

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Franz X. Schmid (Erstgutachter)

Prof. Dr. Birgitta Wöhl (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Andreas Fery (Vorsitzender)

Prof. Dr. Olaf Stemmann

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinfaltung: Von Levinthals Paradoxon zur modernen Energiehyperfläche	1
1.2	Proteinfaltung am Beispiel des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen fd: Ein <i>on pathway</i> Intermediat als funktionell wichtige Konformation	2
1.3	Proteinfaltung <i>in vivo</i>	4
1.3.1	Aggregation und Fehlfaltung von Proteinen stellen eine Gefahr für Zellen dar	4
1.3.2	Molekulare Chaperone	5
1.3.3	Faltungshelfer	5
1.4	Stabilität und Stabilisierung von Proteinen	9
1.5	Problemstellung	10
2	Materialien und Methoden	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide	12
2.1.2	Oligodesoxyribonukleotide	12
2.1.3	Nährmedien	12
2.1.4	Enzyme	13
2.1.5	Längenstandards	13
2.1.6	Chemikalien und Biochemikalien	13
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.8	Geräte	14
2.1.9	Computerprogramme	15
2.2	Elektrophoretische Methoden	15
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	15
2.2.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow	15
2.3	Isolierung und Reinigung von DNA	16
2.3.1	Präparation von doppelsträngiger DNA	16
2.3.2	Präparation von einzelsträngiger Phagen-DNA	16
2.3.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und Reinigung mit Silica	16
2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	17
2.4.1	PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	17
2.4.2	Kolonie-PCR	17
2.4.3	<i>BluntEnd</i> -Mutagenese	17
2.5	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	18
2.5.1	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	18
2.5.2	Herstellung und Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	18
2.6	Arbeiten mit Phagen	19
2.6.1	Propagation und Isolierung von Phagen	19
2.6.2	Infektion des F ⁺ Stamms <i>E. coli</i> XL1Blue bzw. I ⁺ Stamms <i>E. coli</i> ATCC 26075	19
2.6.3	Infektion des F Stamms <i>E. coli</i> HB2156	19
2.6.4	Bestimmung der Phageninfektiosität	20
2.6.5	Kompetitionsexperimente	20
2.7	Klonierung verschiedener Proteinvarianten	20
2.8	Konstruktion und Klonierung der Einkettenvarianten von DsbC	21

2.9	Test auf Überexpression eines Proteins	21
2.10	Fermentation	22
2.11	Proteinreinigung.....	22
2.11.1	Aufschluss	23
2.11.2	Reinigungsstrategie 1: Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen und Gelfiltrationschromatographie	23
2.11.3	Reinigungsstrategie 2: Reinigung von Proteinen anhand der SUMO-Fusionstechnologie.....	24
2.11.4	Reinigungsstrategie 3: Reinigung aus <i>inclusion bodies</i>	25
2.11.5	Reinigungsstrategie 4: Oxidative Faltung auf einer Affinitätschromatographiesäule	26
2.11.6	Reinigungsstrategie 5: Anionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie	27
2.12	Proteinmodifikation	27
2.13	Spektroskopische Charakterisierung.....	29
2.13.1	Circulardichroismus-Spektren.....	29
2.13.2	Fluoreszenzemissionsspektren	29
2.14	Bestimmung der konformationellen Proteinstabilität	29
2.14.1	Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge	29
2.14.2	Auswertung thermisch induzierter Entfaltungsübergänge	30
2.14.3	Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge.....	32
2.15	Kinetische Messungen	34
2.15.1	Kinetik nach manueller Mischung	34
2.15.2	Kinetik nach schneller Mischung.....	34
2.15.3	Auswertung der kinetischen Messungen.....	35
2.15.4	Kinetik der Assoziation mit TolA-C	35
2.15.5	Bindung des Faltungsintermediats von G3P* an TolA-C.....	37
2.15.6	Oxidative Faltung von IF _{SHSH} und die Beschleunigung durch Thioloxygenasen	37
2.15.7	Rückfaltung von scRNaseT1 S54G P55N	38
2.16	Test auf Chaperonaktivität.....	39
2.17	Kristallisation, Datensammlung und Strukturaufklärung.....	39
3	Ergebnisse und Diskussion.....	41
3.1	Das Gen-3-Protein des filamentösen Phagen IF1: Faltungsmechanismus und Bedeutung für die Infektion von <i>E. coli</i>	41
3.1.1	Die Domänen des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen IF1 sind eigenständige Faltungseinheiten	42
3.1.2	Die N1 Domäne des G3P des filamentösen Phagen IF1 bindet an den Oberflächenrezeptor TolA-C	48
3.1.3	Der Austausch der N2 Domäne ändert die Wirtsspezifität des Phagen fd	55
3.2	Vereinfachung des Infektionsmechanismus des Phagen fd durch Entkopplung der beiden Domänen in fd G3P* nach dem Vorbild von IF1 G3P*	56
3.2.1	Konstruktion eines fd G3P* mit strukturell und funktionell unabhängigen Domänen: Δβ6-G3P*	56
3.2.2	N1 und N2 in Δβ6-G3P* zeigen die gleiche thermodynamische Stabilität wie in isolierter Form.....	58
3.2.3	In Δβ6-G3P* sind N1 und N2 eigenständige Faltungseinheiten die sich gegenseitig nicht beeinflussen.....	61
3.2.4	In Δβ6-G3P* ist die Bindungsstelle für TolA-C voll zugänglich	65
3.2.5	Δβ6-G3P* als Vermittler der Phageninfektion.....	66

3.2.6	Die Domänenorganisation von $\Delta\beta$ -G3P* entspricht der in IF1 G3P*	70
3.3	Konstruktion eines Redox-sensitiven Phagenkonstrukts: G3P*-Clamp	71
3.3.1	Die Disulfidbrücke in G3P*-Clamp erhöht die thermodynamische Stabilität der N2 Domäne	72
3.3.2	Die N1 Domäne von G3P*-Clamp bindet im intermediären Faltungszustand nur bei reduzierter Disulfidbrücke an TolA-C	73
3.3.3	Die Infektiosität des Phagenkonstruktes fd -G3P*-Clamp ist über den Redoxzustand steuerbar	74
3.4	Stabilisierung der IF Domäne von SlpA durch den Einbau von Disulfidbrücken	75
3.4.1	Auswahl geeigneter Positionen für den Einbau stabilisierender Disulfidbrücken	75
3.4.2	Analyse der stabilisierten Varianten der IF Domäne von SlpA	76
3.5	Stabilisierung der IF Domäne von SlyD durch den Einbau einer Disulfidbrücke	79
3.5.1	Die stabilisierte IF Domäne ist nur in Gegenwart der Disulfidbrücke gefaltet	79
3.5.2	Analyse der Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen von IF _{SS}	82
3.5.3	Oxidative Faltung von IF _{SHSH}	85
3.6	Mia40, eine neuartige Thioloxidase	100
3.6.1	Kristallstruktur von γ Mia40	100
3.6.2	Oxidation von IF _{SHSH} durch Mia40	105
3.6.3	Mia40 besitzt Chaperonaktivität	105
3.6.4	Mia40 zeigt keine Disulfidisomeraseaktivität	107
4	Zusammenfassende Diskussion	114
4.1	Das Gen-3-Protein der filamentösen Phagen fd und IF1 vermittelt die Phageninfektion	114
4.1.1	Die Domänenanordnungen der Gen-3-Proteine und damit die Infektionsmechanismen der Phagen fd und IF1 sind unterschiedlich	114
4.1.2	Der Infektionsmechanismus des Phagen IF1 kann auf den Phagen fd übertragen werden	115
4.1.3	Die entsprechenden Domänen im Gen-3-Protein der Phagen IF1 und fd erfüllen analoge Aufgaben	116
4.1.4	Der Vergleich der Phagen IF1 und fd verdeutlicht evolutive Mechanismen	116
4.2	Die Chaperondomänen von SlpA und SlyD wurden durch die strukturbasierte Konstruktion von Disulfidbrücken stabilisiert	117
4.3	Chaperondomänen sind als Substratbindungsmodule für die Thioloxidasefunktion wichtig	119
4.4	Chaperondomänen sind als Substratbindungsmodule für die Disulfidisomerasefunktion wichtig	122
4.5	Mia40 ist eine neuartige Thioloxidase im Intermembranraum von Mitochondrien	123
4.5.1	Mia40 besitzt keine strukturelle Ähnlichkeit zu bekannten Thioloxidase	123
4.5.2	Mia40 assembliert bei rekombinanter Expression ein 2Fe-2S-Cluster	123
4.5.3	Mia40 zeigt eine hohe Chaperonaktivität	124
4.5.4	Mia40 zeigt <i>in vitro</i> keine Disulfidisomeraseaktivität	124
5	Zusammenfassung	125
6	Summary	128
7	Abkürzungsverzeichnis	130
8	Literaturverzeichnis	133
9	Anhang	138

1 Einleitung

1.1 Proteinfaltung: Von Levinthals Paradoxon zur modernen Energiehyperfläche

Wie ist es möglich, dass entfaltete Polypeptidketten mit ihrer enormen Vielfalt an Konformationen in dieselbe dreidimensionale Struktur falten? Gibt es einen einheitlichen Mechanismus bei der Faltung unterschiedlicher Polypeptidketten in die biologisch aktive Struktur und können wir diese irgendwann allein anhand der Aminosäuresequenz vorhersagen? Diese Fragen beschäftigen die Forschung seit Anfinsen vor mehr als 45 Jahren postulierte, dass die Information über die dreidimensionale native Struktur alleine in der Primärstruktur codiert ist¹. Sie wurden 2005 vom *Science Magazine* zu den 125 großen Fragen der Wissenschaft gezählt². Seit diesen Anfängen hat sich das Verständnis der Faltung einer ungeordneten Polypeptidkette hin zu der unter den gegebenen Bedingungen thermodynamisch stabilsten Konformation stetig weiterentwickelt.

1968 formulierte Cyrus Levinthal das nach ihm benannte Paradoxon, den scheinbaren Widerspruch zwischen der theoretisch nötigen Zeitspanne bei einer ungerichteten Suche nach der richtigen, nativen Struktur im gesamten Konformationsraum und der Geschwindigkeit mit der die Proteinfaltung tatsächlich stattfindet³. Als Lösung für dieses Problem schlug Anfinsen für jedes Protein festgelegte, sequentielle Faltungswege vor. Eine rasche Methodenentwicklung auf dem Feld der Molekularbiologie, Spektroskopie und Kristallographie ermöglicht seitdem stetig tiefere Einblicke in Mechanismen der Proteinfaltung⁴⁻⁷. Dadurch wurde die Idee der festgelegten Faltungswege von Levinthal dahingehend weiterentwickelt, dass es zum Einen nicht mehr nur eine, sondern viele Konformationen des entfalteten Proteins gibt und damit der entfaltete Zustand kein Plateau in einem Energieschema darstellt, sondern als Energiehyperfläche beschrieben werden kann. Zum Anderen werden während der Proteinfaltung nicht wahllos alle möglichen Wechselwirkungen ausgebildet und komplett wieder aufgelöst, wenn sie nicht dem nativen Zustand entsprechen. Vielmehr beruht das Prinzip der Faltung auf der Erhaltung teilweise korrekter Zwischenprodukte⁸⁻¹⁰. Die Faltung vom ungefalteten Zustand in den energetisch günstigsten Zustand folgt somit einem trichterartigen Energieprofil, dessen raue Flächen diese Zwischenprodukte widerspiegeln (Abbildung 1-1)¹¹.

Sehr kleine Proteine mit einer hohen Kontaktordnung, d.h. Proteine bei denen die Tertiärstruktur vor allem durch lokale Kontakte determiniert ist, falten häufig apparent nach einem Zweizustandsmodell, das Energieprofil der Faltung ist relativ glatt. Bei größeren Proteinen, insbesondere bei Multidomänenproteinen führt die Faltung zur nativen Struktur über intermediäre Zustände die auf dem Weg zur nativen Struktur liegen (*on pathway*) oder führt zu intermediären Zuständen, die für die Ausbildung der nativen Struktur teilweise wieder denaturiert werden müssen (*off pathway*). Die Forschung der letzten Jahre zeigte, dass Faltungsintermediate nicht nur Trittsteine auf dem Weg zur nativen Struktur sind, sondern

auch funktional wichtige Konformationen darstellen können, wie z.B. beim Gen-3-Protein des Phagen fd¹².

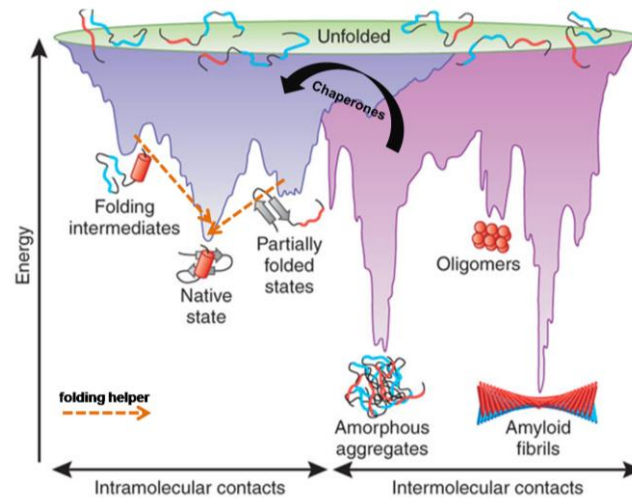


Abbildung 1-1: Vereinfachte Darstellung des Energieprofils für Proteinfaltung und Aggregation bzw. Fibrillenbildung. Die Oberfläche (grün) zeigt das große Ensemble entfalteter Konformationen, die durch die Ausbildung intramolekularer Kontakte zur nativen Struktur (blau) falten oder durch intermolekulare Wechselwirkungen aggregieren bzw. Fibrillen bilden (lila). Chaperone blockieren die Bildung von Aggregaten bzw. sind teilweise in der Lage Aggregate unter Bildung der nativen Moleküle aufzulösen. Faltungshelfer beschleunigen langsame Faltungsschritte durch die Verringerung der Aktivierungsenergie der Reaktion (Abbildung nach Hartl *et al.*¹¹)

1.2 Proteinfaltung am Beispiel des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen fd: Ein *on pathway* Intermediat als funktionell wichtige Konformation

Das Gen-3-Protein (G3P) des filamentösen Phagen fd ist ein Dreidomänenprotein, das in drei bis fünf Kopien an der Spitze filamentöser Phagen sitzt und die Infektion von *E. coli* Zellen vermittelt¹³. Die C-terminale Domäne verankert das G3P in der Phagenhülle, die mittlere Domäne (N2) bildet anfängliche Kontakte zu F Pili von *E. coli* Zellen aus und die N-terminale Domäne (N1) bindet an den sekundären bakteriellen Rezeptor, die C-terminale Domäne von TolA (TolA-C, siehe Abbildung 1-2)^{14, 15}. Im nativen Zustand bildet das N1N2 Fragment von G3P eine hufeisenförmige Struktur aus, in der die Interaktion der beiden globulären Domänen N1 und N2 über eine Gelenkregion vermittelt wird, wobei die Kontaktfläche zwischen N1 und N2 1000 \AA^2 beträgt (siehe Abbildung 1-2)^{16, 17}. In *in vitro* Faltungsstudien konnten die Faltungsvorgänge eines stabilisierten N1N2 Fragments von G3P (G3P*) aufgeklärt und mit der physiologischen Funktion korreliert werden. Es zeigte sich, dass G3P* die Infektion nicht durch die native, thermodynamisch stabilste Konformation vermittelt, sondern durch ein *on pathway* Faltungsintermediat des Proteins.

Der Faltungsprozess von G3P* ist komplex und umfasst einen sehr großen Zeitbereich. Zuerst faltet N1 im Millisekundenbereich. N2 faltet etwa hundertfach langsamer als N1 in zwei sequentiellen Reaktionen, wobei der erste Faltungsschritt hierbei der Faltung der globulären N2 Domäne entspricht und der zweite Schritt der losen Domänenassoziation von N1 und N2. Der letzte Faltungsschritt, der zur nativen Struktur führt, ist mit einer

Zeitkonstante von 6200 s nochmals um zwei Größenordnungen langsamer als die lose Domänenassoziation. Der letzte Faltungsschritt entspricht der festen Domänenassoziation, deren Geschwindigkeit durch eine langsame *trans*-nach-*cis* Isomerisierung an Pro213 in der Gelenkregion bestimmt wird. G3P* ist in der nativen Form thermodynamisch sehr stabil, weil N1 und N2 durch energetisch günstige Interaktion wechselseitig stabilisiert werden. So wird der Übergangsmittelpunkt der thermischen Entfaltung von N2 durch die Interaktion mit N1 in G3P von knapp 38 °C auf 62 °C erhöht¹⁸⁻²⁰.

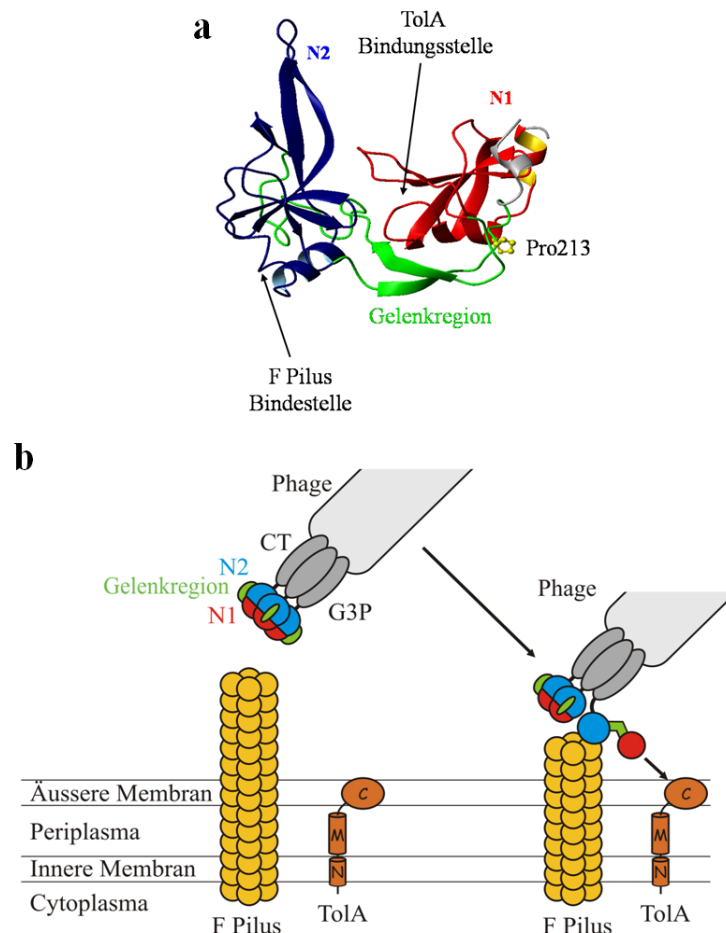


Abbildung 1-2: a) Kristallstruktur des N1N2 Fragments von G3P. In der Bänderdarstellung von G3P* ist die N1 Domäne in rot, der globuläre Teil der N2 Domäne in blau und die Gelenkregion in grün dargestellt. Die Aminosäure Pro213 ist im Stäbchenmodell dargestellt. Die Abbildung basiert auf der Kristallstruktur von Holliger *et al.* (PDB-Eintrag: 2G3P) und wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific, 2006) erstellt.

b) Die Rolle von G3P bei der Infektion von *E. coli* durch den Phagen fd. Gezeigt sind die ersten Schritte der Infektion: Die Bindung der N2-Domäne an die Spitze des F Pilus löst die Interaktion zwischen N1 und N2. Die N1 Domäne kann anschließend an die C-terminale Domäne des Rezeptors ToLA-C binden (Abbildung nach Eckert *et al.*¹²)

In der nativen, thermodynamisch stabilen Struktur ist die Bindungsstelle für ToLA-C auf N1 in der Grenzfläche zwischen N1 und N2 verborgen und damit nicht zugänglich. Während der Infektion von *E. coli* Zellen bindet N2 zunächst an den bakteriellen F Pilus. Auf noch ungeklärte Weise wird dieses Bindungssignal an die Gelenkregion weitergeleitet, die daraufhin partiell entfaltet und die Dissoziation von N1 und N2 zur Folge hat, wodurch die

Bindungsstelle für TolA-C auf N1 zugänglich wird. Die Entfaltung der Gelenkregion geht mit einer *cis*-nach-*trans* Isomerisierung von Pro213 einher. Die langsame *trans*-nach-*cis* Rückreaktion ist die molekulare Zeitschaltuhr, die bestimmt, wie lange der geöffnete, infektiöse Zustand erhalten und damit die TolA-C Bindungsstelle zugänglich bleibt¹².

G3P* existiert also *in vivo* in zwei Konformationen: Zum Einen im geschlossenen Zustand, in dem N1 und N2 miteinander interagieren und sich gegenseitig stabilisieren, wobei jedoch die Bindungsstelle für TolA-C in der Interaktionsfläche von N1 und N2 verborgen ist. Zum Anderen in der biologisch aktiven, aber labilen Form mit lose assoziierten Domänen und zugänglicher TolA-C Bindungsstelle. Von Eckert *et al.* wurde gezeigt, dass das langlebige Faltungsintermediat mit lose assoziierten Domänen aus den *in vitro* Faltungsstudien identisch mit der biologisch aktiven Form ist, die *in vivo* nach Bindung an den F Pilus vorhanden ist und die weitere Infektion vermittelt²¹.

1.3 Proteinfaltung *in vivo*

1.3.1 Aggregation und Fehlfaltung von Proteinen stellen eine Gefahr für Zellen dar

Unser Verständnis der Proteinfaltung beruht weitestgehend auf *in vitro* und *in silico* Studien. Diese gelten als gutes Modell für die Faltung naszierender Polypeptidketten *in vivo*, obwohl es einige Unterschiede zwischen den Bedingungen in der Zelle und dem Reaktionsgefäß gibt. Faltungsstudien *in vitro* werden zur Vermeidung von Aggregation typischerweise in verdünnten Lösungen durchgeführt. Im Cytosol dagegen findet die Faltung in Gegenwart von 300 - 400 g l⁻¹ Proteinen und anderen Makromolekülen statt²². Das resultierende Ausschlussvolumen verstärkt wesentlich die Affinität zwischen Proteinen. Insbesondere wird die Interaktion von Proteinen in nicht nativen Konformationen verstärkt, wodurch die Neigung zur Aggregatbildung zunimmt²³. Ein weiterer Faktor der in der Zelle hinzukommt, ist die relativ langsame Translationsrate (bei Bakterien etwa 15-75 Sekunden für ein Protein von 300 Aminosäuren)¹¹. Eine Faltung zur nativen Struktur ist aber erst möglich, wenn ein Großteil der Polypeptidkette translatiert ist und somit intramolekulare Wechselwirkungen eingehen kann. Nicht native Proteinketten präsentieren meist hydrophobe Oberflächen und gehen unter zellulären Bedingungen verstärkt intermolekulare Wechselwirkungen ein (Abbildung 1-1)⁶. Sind diese intermolekularen Wechselwirkungen ungeordnet, entstehen amorphe Aggregate. Sind die Wechselwirkungen, vor allem über das Peptidrückgrat, gerichtet und repetitiv, so entstehen vorwiegend Fibrillen²⁴. Fehlgefaltete Proteine bzw. Aggregate sind zytotoxisch und können schwere Krankheiten auslösen^{25, 26}.

Im Laufe der Evolution haben sich deshalb spezialisierte Proteine entwickelt, die für eine produktive Proteinfaltung in der Zelle sorgen. Sie werden allgemein in molekulare Chaperone und Faltungshelfer unterteilt.

1.3.2 Molekulare Chaperone

Als molekulare Chaperone (frz. „Anstandsdamen“) werden Proteine bezeichnet, die mit nicht nativen Proteinen interagieren, diese stabilisieren bzw. helfen in die native Konformation zu falten, aber anschließend nicht mehr mit der nativen Struktur assoziiert sind^{27, 28}. Chaperone sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, wie der *de novo* Faltung naszierender Proteine²⁹, Rückfaltung von Proteinen die durch Stress (z.B. chemischen oder oxidativen Stress, Hitze) entfaltet wurden, dem Aufbau von Proteinkomplexen³⁰, dem intrazellulärem Proteintransport³¹, der Bindung nicht nativer Substratproteine für Faltungshelfer³², sowie beim proteolytischen Abbau von Proteinen³³. Chaperone, die im weitesten Sinn an der Proteinbiogenese und *de novo* Faltung beteiligt sind, erkennen exponierte hydrophobe Flächen nicht nativer Proteine und begünstigen deren Faltung durch wiederholte Zyklen von Bindung und Freisetzung. Bei einigen Chaperonsystemen sind diese Zyklen ATP-reguliert, wie z.B. bei den Hitzeschockproteinen70 (Hsp70s) oder den Hsp60s, die auch Chaperonine genannt werden. Die Bindung von Chaperonen blockiert die Aggregation durch eine Verringerung der Konzentration zugänglicher Faltungsintermediate. Die dynamische, teils ATP-regulierte Freisetzung aus dem Chaperon-Protein Komplex ermöglicht die weitere Proteinfaltung. Chaperone liefern dabei dem faltenden Protein keine sterische Information, durch die dynamische Bindung wird lediglich die Effizienz der Faltung in der Zelle erhöht. Die Geschwindigkeit der Faltungsschritte bleibt somit unverändert. Die verschiedenen Chaperonsysteme, die die Proteinfaltung von der naszierenden Proteinkette am Ribosom bis zum vollständig gefalteten Protein unterstützen stehen in engem Kontakt zueinander und sind aufeinander abgestimmt¹¹.

1.3.3 Faltungshelfer

Intermediate akkumulieren häufig vor geschwindigkeitsbestimmenden Faltungsschritten, wie Isomerisierungsreaktionen an Peptidyl-Prolylbindungen oder der Ausbildung von Disulfidbrücken. Während Chaperone durch die dynamische Bindung an die partiell gefalteten Moleküle Aggregationseffekte blockieren, katalysieren Faltungshelfer langsame Faltungsschritte und verkürzen so die Lebensdauer aggregationsanfälliger Spezies. Die zwei großen Klassen von Faltungsenzymen, die Peptidyl-Prolylisomerasen und die Disulfidisomerasen, katalysieren unterschiedliche Prozesse, besitzen aber ein gemeinsames Bauprinzip. Eine oder zwei katalytische Domänen sind mit einer oder zwei Proteinbindungsdomänen oder Chaperondomänen kombiniert, die nicht in direkter Umgebung des aktiven Zentrums lokalisiert sind³⁴⁻³⁸. Chaperone binden an partiell gefaltete, nicht aber an native Proteine und sind so sehr gut als Bindungsmodule nicht nativer Substratmoleküle in Faltungshelfern geeignet, die nur mit partiell gefalteten Molekülen interagieren sollten³⁹. Chaperondomänen als Bindungsmodule in Faltungshelfern stellen somit einen einfachen Korrekturlesemechanismus dar.

1.3.3.1 Peptidyl-Prolylisomerasen

Die Peptidbindung besitzt partiellen Doppelbindungscharakter und zeigt daher eine planare Geometrie. Im Gegensatz zu Nicht-Prolylbindungen unterscheiden sich die *cis*- und *trans*-Konformation von Peptidyl-Prolylbindungen (Xaa-Pro-Peptidbindungen) wesentlich weniger in ihrer Energie, da aufgrund des Pyrrolidin-Rings des Prolins das C α der Aminosäure Xaa immer *cis*-ständig zu einem C-Atom (C α oder C δ) des Prolins ist. Als Konsequenz liegt der Anteil der Peptidbindungen in *cis*-Konformation in Oligopeptiden zwischen 10 und 30 %, abhängig von den flankierenden Aminosäuren⁴⁰. Bei Nicht-Prolylbindungen liegt er bei lediglich 0,1 bis 1 %⁴¹. In gefalteten Proteinen erlaubt die dreidimensionale Struktur meist nur eine Konformation von Peptidylbindungen, wobei etwa 7 % der Prolylbindungen *cis*-Konformation einnehmen⁴².

Die hohe Aktivierungsenergie von 80 kJ mol⁻¹ macht die Isomerisierungen von Peptidyl-Prolylbindungen zu sehr langsamen Faltungsreaktionen mit Zeitkonstanten zwischen 10 und 100 s bei 25 °C⁴³. Sie werden deshalb *in vivo* durch Peptidyl-Prolylisomerasen katalysiert. Es sind drei unabhängige Familien von Peptidyl-Prolylisomerasen bekannt, nämlich die Cyclophiline, Parvuline und FK506-Bindungsproteine (FKBPs).

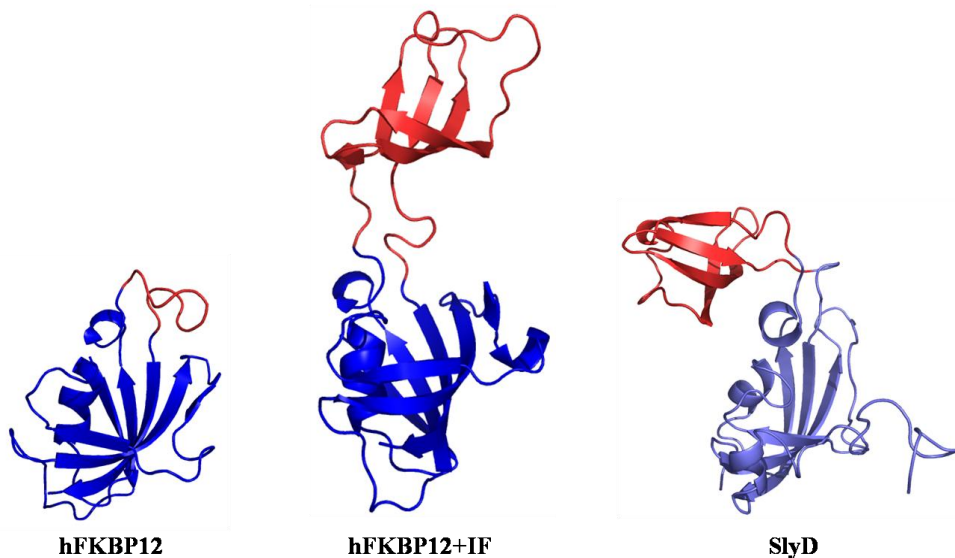


Abbildung 1-3: Tertiärstruktur von *hFKBP12*, von der Chimäre (*hFKBP12+IF*) aus *hFKBP12* und der Chaperondomäne (IF Domäne) aus SlyD und von SlyD. Die Strukturen von *hFKBP12* (PDB-Eintrag 1FKT) und von SlyD (PDB-Eintrag 2KFW) wurden mittels NMR Spektroskopie aufgeklärt, die der Chimäre mittels Kristallographie. Die FKBP Domäne ist in *hFKBP12* und in der Chimäre dunkelblau, in SlyD hellblau, die IF Domäne in SlyD und der Chimäre rot dargestellt. Die Sequenz in *hFKBP12*, die in der Chimäre gegen die IF Domäne von SlyD ersetzt wurde ist ebenfalls rot dargestellt. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific, 2006) erstellt.

Die meisten Peptidyl-Prolylisomerasen, die in die zelluläre Proteinfaltung involviert sind enthalten eine katalytische Domäne, die homolog zu humanem FKBP12 (*hFKBP12*, siehe Abbildung 1-3) ist⁴⁴. Beispiele hierfür sind die bakteriellen Peptidyl-Prolylisomerasen SlyD (*sensitive to lysis*), Triggerfaktor und FkpA, sowie der eukaryotische Faltungshelfer FKBP52.

Der Vergleich der Isomeraseaktivitäten von hFKBP, SlyD sowie einer Chimäre aus hFKBP und der Chaperondomäne von SlyD (siehe Abbildung 1-3) zeigt, dass das Vorhandensein einer zusätzlichen Chaperondomäne die Katalyse der Proteinfaltung erheblich verbessert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass durch die Chaperondomäne die Substratspezifität der FKBP Domäne bezüglich der Aminosäure vor Prolin erheblich verringert wird und dadurch Peptidyl-Prolylisomerasen in der Lage sind die Rückfaltung einer größeren Bandbreite von Substraten zu katalysieren^{32,44}.

1.3.3.2 Thioloxygenasen/Isomerasen

Ein weiterer langsamer Reaktionsschritt während der Proteinfaltung ist die Ausbildung von Disulfidbrücken. Das Cytosol weist bei Prokaryoten und auch bei Eukaryoten aufgrund des Glutathion/Glutaredoxin-Systems ein reduzierendes Milieu auf, deshalb erfolgt die Oxidation von Disulfiden erst nach Translokation der Polypeptidkette in Kompartimente mit oxidierenden Bedingungen. Native Disulfidbrücken tragen in der Regel enorm zur thermodynamischen Stabilität eines Proteins bei, daher ist es vielen Proteinen erst nach Ausbildung der Disulfidbrücken möglich in die native Struktur zu falten⁴⁵.

Thioloxygenasen katalysieren die Ausbildung von Disulfiden. Besitzt ein Protein mehr als zwei Cysteine ist eine Fehlverbrückung der Disulfide möglich. Disulfidisomerasen sind in der Lage nicht native Disulfidbrücken zu reduzieren, so dass sich diese umlagern, oder bei vollständiger Reduktion erneut oxidiert werden können. Triebkraft hierfür ist die Reaktionsenthalpie der Proteinfaltung. Der Großteil der bis *dato* bekannten Thioloxygenasen enthält neben einer Chaperondomäne bzw. hydrophoben Substratbindungsstelle eine oder mehrere redoxaktive Thioredoxindomänen^{34,36,46}. Das katalytische Disulfid der Thioloxygenasen mit der Sequenz Cys-Xaa-Xaa-Cys besitzt aufgrund der strukturellen Umgebung ein höheres Reduktionspotential als reduzierte Disulfide entfalteter Substratproteine. Daher ist das katalytische Disulfid in der Lage Elektronen vom Substratprotein aufzunehmen, d.h. Cysteine des Substratproteins werden unter Bildung einer Disulfidbrücke oxidiert und die Thioloxygenase dabei selbst reduziert⁴⁷.

In Bakterien werden Substratproteine nach dem Transport in den periplasmatischen Raum durch die Thioloxygenase DsbA oxidiert. Nach dieser Reaktion wird reduziertes DsbA durch das membranständige Protein DsbB reoxidiert, die Elektronen dabei über Ubichinon direkt in die Atmungskette eingespeist. DsbA oxidiert Substratproteine relativ unspezifisch, wodurch nicht native Disulfide entstehen können. Diese werden durch die Disulfidisomerase DsbC teilweise reduziert, und können sich dadurch in die native Konformation umlagern. Funktionales DsbC liegt *in vivo* reduziert vor, es wird durch das Membranprotein DsbD reduziert, welches über die Membran hinweg die Elektronen vom cytosolischen Thioredoxinsystem (TrxA) übernimmt⁴⁷.

In Eukaryoten findet oxidative Proteinfaltung vor allem im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Während bei Prokaryoten mit DsbA und DsbC zwei getrennte Systeme Oxidation

und Isomerisierung übernehmen, vermittelt im ER die Proteindisulfidisomerase (PDI) beide Aufgaben. Unterschiedliche Reduktionspotentiale der beiden aktiven Zentren in PDI befähigen sie dazu. Elektronen der Substratproteine werden von PDI über ein FAD des Proteins Ero1 auf den terminalen Akzeptor Sauerstoff weitergeleitet ⁴⁸.

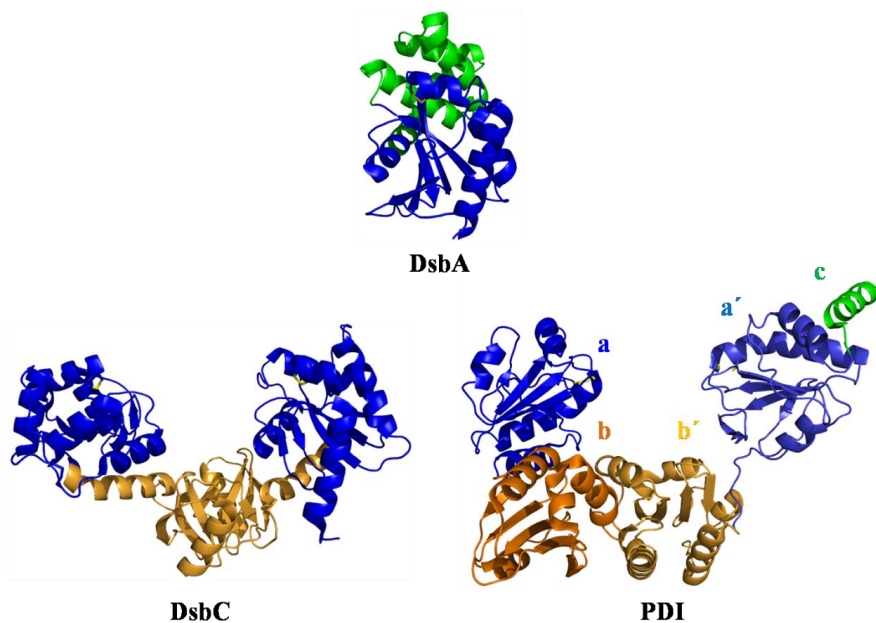


Abbildung 1-4: Bänderdarstellung der Tertiärstruktur von DsbA, DsbC und PDI (PDB-Einträge: 1FVK, 1EEJ, 2B5E). Redoxaktive Thioredoxindomänen sind jeweils blau (bei PDI: a und a' Domäne blau und hellblau) eingefärbt. Die zusätzliche helikale Domäne in DsbA ist in grün, die Dimerisierungsdomäne von DsbC orange, die beiden Chaperondomänen b und b' in PDI dunkel- und hellorange, sowie die C-terminale Extension grün dargestellt. Cysteine der aktiven Zentren sind im Stäbchenmodell dargestellt und Schwefelatome gelb markiert. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific, 2006) erstellt.

DsbA, DsbC und PDI zeigen strukturelle Ähnlichkeiten (siehe Abbildung 1-4), obwohl die Aminosäuresequenzen keine Homologie aufweist ^{36, 46, 49}. Bei allen drei Proteinen sind die aktiven Zentren in Thioredoxindomänen lokalisiert, die in Abbildung 1-4 blau markiert sind. Auffallend ist zudem die konvergente Evolution der Disulfidisomerasen DsbC und PDI in Bezug auf ihre Quartärstruktur. Beide Proteine sind U-förmig, wobei die Schenkel des U jeweils von einer katalytisch aktiven Thioredoxindomäne und die Furche des U bei beiden Proteinen durch Chaperondomänen gebildet werden, die strukturell nicht verwandt sind. Im Homodimer DsbC ist die Chaperondomäne gleichzeitig Dimerisierungsdomäne, bei PDI ist die hydrophobe Furche aus zwei Thioredoxindomänen ohne Redoxaktivität aufgebaut.

Erst vor kurzem wurde herausgefunden, dass es nicht nur im ER, sondern auch im Intermembranraum (IMS) von Mitochondrien ein Thioloxydasesystem gibt. Interessanterweise zeigt die primäre Thioloxydase des IMS, Mia40, keine strukturelle Ähnlichkeit zu DsbA oder DsbC, obwohl das IMS äquivalent zum bakteriellen Periplasmaraum ist. Im Gegensatz zu allen anderen bekannten Thioloxydasen besitzt Mia40 keine Thioredoxindomäne, sondern besteht aus zwei antiparallelen α -Helices, die durch zwei strukturelle Disulfidbrücken

verbunden sind. Zusätzlich zu diesem Proteinkern verfügt Mia40 über einen Schwenkarm, auf dem sich das katalytische Motiv Cys-Pro-Cys befindet. Eine weitere Funktion von Mia40, die mit der Thioloxydaseaktivität verknüpft ist, ist die Unterstützung des gerichteten Imports von Substratmolekülen in den IMS^{50,51}.

1.4 Stabilität und Stabilisierung von Proteinen

Haupttriebkraft für die Faltung eines Proteins in seine biologisch aktive, dreidimensionale Struktur und ausschlaggebend für seine Stabilität ist der hydrophobe Effekt, d.h. die entropisch günstige Abschirmung hydrophober Bereiche in der nativen Struktur vom polaren Lösungsmittel⁵². Die kovalente Quervernetzung der Polypeptidkette durch Disulfidbrücken kann ebenfalls große Beiträge zur Proteinstabilität liefern⁵³. Weiterhin wirkt die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals sowie Coulombscher Interaktionen stabilisierend auf ein Protein, wobei die Beiträge hier enthalpischer Natur sind^{9,54}.

Diesen stabilisierenden Interaktionen wirken die Verringerung der Kettenentropie bei der Faltung, sowie eventuell vorhandene elektrostatischen Abstoßungen entgegen. Die so resultierende geringe Nettostabilität der Proteine ist *in vivo* von Vorteil: Durch die marginale Stabilität ist eine einfache Regulation der Proteinhomöostase durch Abbau der Proteine möglich, dem zumeist eine Entfaltung der Proteine vorangeht⁵⁵. Zudem geht mit einer geringen Stabilität eine erhöhte Proteindynamik einher, die für Bindungs- und Katalysereaktionen bzw. für die Funktion generell wichtig ist⁵⁶. Weiterhin ist es für lebende Systeme evolutionär von Vorteil, wenn Proteine nicht stabiler sind als tatsächlich notwendig⁵⁷. Die Entwicklung neuer Funktionen ist bei einem Protein an der Stabilitätsgrenze einfacher, weil dann nur wenige Mutationen genügen um eine Strukturänderung und so eine neue Funktion zu induzieren. Ein Beleg hierfür, ist die Arbeit von Alexander *et al.*, in der gezeigt wurde, wie ein funktionales Protein in eine andere Struktur mit ebenfalls geänderter Funktion durch nur eine Punktmutation überführt werden konnte⁵⁸.

Für biotechnologische, medizinische oder therapeutische Zwecke sind jedoch häufig thermodynamisch stabilere Proteine notwendig. Diese können zum Teil aus thermophilen Organismen gewonnen werden. Alternativ können aber auch Proteine aus mesophilen Organismen mittels *in vitro* Evolution oder rationalem Design stabilisiert werden⁵⁹. Für das rationale Design können alle oben aufgeführten günstigen Wechselwirkungen vermehrt oder verstärkt werden. Das Auffinden für die Stabilität sensibler Aminosäurepositionen kann auf verschiedene Arten erfolgen: durch einen Sequenzvergleich mit Proteinen aus thermophilen Organismen, computergestützte Verfahren, anhand der B-Faktor Analyse von Kristallstrukturen sowie durch den Sequenzvergleich einer Vielzahl homologer Proteine zur Identifizierung von konservierten Bereichen⁶⁰⁻⁶³.

So konnten Proteine durch Optimierung der Coulombschen Wechselwirkungen oder durch Verbesserung der van-der-Waals Interaktionen stabilisiert werden, indem die Packung im

Proteininneren verbessert wurde⁶⁴. Eine Stabilisierung von Proteinen durch die Veränderung der Sequenz in Sekundärstrukturelementen hin zu den statistisch häufigsten Sequenzen in bekannten Proteinstrukturen (*consensus design*) führt neben einer Verbesserung der Molekülgeometrie meist zu einer Optimierung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen und so zu einer Stabilisierung des Proteins⁶³. Desweiteren können Disulfidbrücken zur Erhöhung der thermodynamischen Stabilität eingeführt werden. Neben der entropischen Wirkung auf den entfaltenen Zustand, stabilisieren Disulfidbrücken aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften den nativen Zustand enthalpisch, da sie mit anderen hydrophoben Resten im Proteininneren interagieren. Der Verlust einer Disulfidbrücke ist deshalb mit einem großen Verlust an Stabilität verknüpft⁶⁵. Der Umkehrschluss gilt aber nicht zwangsweise. Da Disulfidbrücken hohe Anforderungen an die Kettengeometrie und die Umgebung stellen, fällt die Nettostabilisierung durch den Einbau von Disulfidbrücken häufig gering aus. Aufgrund der geringen Erfolgsquoten werden Disulfidbrücken häufiger für funktionale Untersuchungen eingesetzt, bei der Domänen oder Bindungspartner kovalent verknüpft werden^{66, 67}.

1.5 Problemstellung

Die Infektion von *E. coli* durch filamentöse Phagen ist ein gutes Modellsystem, um die Bedeutung der Stabilität und des Faltungsmechanismus eines Proteins (hier von G3P) *in vitro* für seine Funktion *in vivo* aufzuklären. Für G3P des Phagen fd wurde gezeigt, dass ein langlebiges Faltungsintermediat und nicht die thermodynamisch stabilste Konformation die Infektion vermittelt. In dieser Arbeit sollte die thermodynamische Stabilität und der Faltungsmechanismus des G3P des homologen Phagen IF1 analysiert werden. Der Vergleich der Daten mit denen vom G3P des Phagen fd soll zeigen, ob die homologen Proteine der Phagen fd und IF1 trotz geringer Gesamtsequenzähnlichkeit einen ähnlichen Faltungs- und damit Infektionsmechanismus besitzen.

Während der Analysen wurde klar, dass die N1 Domäne von G3P des Phagen IF1 ebenfalls an den bakteriellen Oberflächenrezeptor TolA-C bindet. Um Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zur Bindung von TolA-C an die N1 Domäne von fd G3P festzustellen, wurde die Affinität von N1 zu TolA-C bestimmt, sowohl isolierte IF1 N1 als auch im Komplex mit TolA-C kristallisiert und die Struktur gelöst. Zudem wurde dieser Komplex auch in Lösung mittels NMR-Spektroskopie untersucht. *In vivo* Experimente mit verschiedenen Phagenkonstrukten, bei denen Domänen des G3P gegeneinander ausgetauscht wurden, zeigten, inwieweit sich die Domänen von G3P des Phagen fd und IF1 komplementieren bzw. ein Austausch die Wirtsspezifität der Phagen ändert.

Die *in vitro* Charakterisierung von IF1 G3P ergab, dass die beiden N-terminalen Domänen im nativen Zustand unabhängig voneinander sind, im Gegensatz zum G3P des Phagen fd. Um herauszufinden, weshalb die Proteine der homologen Phagen einen unterschiedlichen Faltungsmechanismus aufweisen, wurde ein fd G3P mit unabhängigen Domänen wie in IF1

G3P konstruiert. Damit konnten die Auswirkungen der Domänen-Entkopplung auf die thermodynamische Stabilität *in vitro* sowie auf die Infektionseigenschaften des Phagen *in vivo* überprüft und zu der des Ausgangsphagen in Bezug gesetzt werden.

Im gegenwärtigen Modell der Infektion von *E. coli* durch den Phagen fd erfolgt eine Domänendissoziation nach Bindung an den bakteriellen Pilus. Zur Überprüfung dieses Modells wurde eine Disulfidbrücke in fd G3P eingebaut, die die Domänen kovalent miteinander verknüpft und somit die Domänendissoziation verhindern sollte. Entsprechend wurde die Auswirkung der Disulfidbrücke im oxidierten und reduzierten Zustand auf die thermodynamische Stabilität des Proteins *in vitro* sowie auf die Infektiosität *in vivo* untersucht.

Die Chaperondomäne (IF Domäne) der Peptidyl-Prolylisomerase SlpA sollte ebenfalls durch den Einbau von Disulfidbrücken entropisch stabilisiert und der Erfolg der Stabilisierung durch thermodynamische Charakterisierung der Varianten überprüft werden. In weiterführenden Experimenten soll mit den stabilisierten Varianten die Korrelation von Proteindynamik und Chaperoneigenschaften korreliert werden.

Die Chaperondomäne der Peptidyl-Prolylisomerase SlyD ist in isolierter Form ungefaltet. In der Struktur des Gesamtproteins werden die Termini der Chaperondomäne in räumliche Nähe zueinander gebracht und die Domäne soweit entropisch stabilisiert, dass sie konformationell faltet. Um die Eigenschaften der isolierten Domäne mit denen im Gesamtprotein vergleichen zu können, wurde eine Disulfidbrücke in die Chaperondomäne eingebaut, welche die Termini kovalent verknüpft und ebenfalls durch die entropische Stabilisierung eine Faltung ermöglicht. Die Analysen ergaben, dass die Domäne nur unter oxidierenden Bedingungen, d. h. in Gegenwart der Disulfidbrücke, gefaltet vorliegt, nicht aber unter reduzierenden Bedingungen. Diese Eigenschaft macht die stabilisierte Chaperondomäne zu einem geeigneten Substratprotein um die Katalyse der oxidativen Proteinfaltung durch Thioloxygenasen und Disulfidisomerasen zu charakterisieren. Die lange bekannten Thioloxygenasen DsbA, DsbC, PDI wurden hergestellt und die Aktivität gegenüber dem Substratprotein bestimmt. Vom Homodimer DsbC wurde ein aktives Zentrum in einer Einkettenvariante ausgeschaltet und die verbleibende Enzymaktivität bestimmt. Der Einfluss der kovalenten Verknüpfung auf die Struktur der Einkettenvariante im Vergleich zum wildtypischen Homodimer DsbC sollte durch röntgenkristallographische Aufklärung der Struktur analysiert werden.

Die Struktur der neuartigen Thioloxygenase Mia40 sollte ebenfalls durch Röntgenkristallographie ermittelt werden. Für Mia40 wurden bisher überwiegend *in vivo* Daten erhoben. Deshalb sollte eine Grundcharakterisierung der Aktivität als Thioloxygenase, der Chaperoneigenschaften und Disulfidisomerasequalitäten erfolgen. Dafür wurde auch ein neuer Disulfidisomerasetest mit einer verbesserten Sensitivität etabliert, der auf Fluorophor-markierten Oligonukleotiden und fehlverbrückter RNaseT1 beruht.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Für die Phagenpropagation, die Produktion von Plasmid-DNA und die Expression von Proteinen wurden folgende *E. coli*-Stämme verwendet.

XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) supE44</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
	<i>relA1 lac [F⁻proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	
BL21 (DE3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
HB2156	<i>supE thi-1 Δ(lac-pro-AB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_K⁻, m_K⁺)</i>	Riechmann <i>et al.</i> ⁶⁸
ATCC 27065	I ⁺ Wirtsstamm des filamentösen Phagen IF1	ATCC (Washington, USA)

Der F⁺ Stamm *E. coli* XL1Blue wurde zur Phagenpropagation, Phageninfektion und zur Produktion von Plasmid-DNA verwendet, der I⁺ Stamm *E. coli* ATCC 27065 wurde zu Infektionsexperimenten bezüglich der Wirtsspezifität der Phagenkonstrukte genutzt, der F⁻ Stamm *E. coli* HB2156 zur Phageninfektion F Pilus-freier Zellen. *E. coli* BL21 (DE3) diente zur Expression von Proteinen.

Der in dieser Arbeit verwendete filamentöse Phage fd basiert auf dem Phagemid fCKCBS ⁶⁹. Zur Expression der verschiedenen Proteine und deren Varianten wurde der Vektor pET11a, für die Expression von DsbA und DsbC die auf pET11a basierenden Vektoren pDsbC, pDsbAcyt und pDsbA2 W76F W126F verwendet, die freundlicherweise von Prof. Dr. R. Glockshuber (ETH Zürich) bereitgestellt wurden.

2.1.2 Oligodesoxyribonukleotide

Die zur Erstellung der jeweiligen Phagen- und Proteinkonstrukte, sowie die zur Klonierung der diversen Proteine verwendeten Oligodesoxyribonukleotide sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 9-9). Alle Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen.

2.1.3 Nährmedien

dYT-Medium: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton

Nährböden: dYT-Medium mit 1,5% (w/v) Agar-Agar

Je nach Bedarf wurden dem autoklavierten Nährmedium sterilfiltrierte Antibiotika-Stammlösungen zugesetzt. Die Endkonzentration betrug 300 µg/ml bei Ampicillin (Amp) bzw. 25 µg/ml bei Chloramphenicol (Cm).

2.1.4 Enzyme

<i>Taq</i> -, <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Restriktionsendonukleasen	
T4-DNA-Ligase, T4-Polynukleotidkinase	
Alkalische Phosphatase aus Krabben (SAP)	
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	
Chymotrypsin, Lysozym	

2.1.5 Längenstandards

Bench Mark™ Protein Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)
pUC19 DNA / <i>MspI</i> (<i>HpaII</i>)-Marker	
Lambda DNA / <i>Eco130I</i> (<i>StyI</i>)-Marker	

2.1.6 Chemikalien und Biochemikalien

Ammoniumhydrogencarbonat, Chloroform/Isoamylalkohol, Dithiothreitol DTT, Imidazol, PEG-8000	Fluka (Seelze, D)
FlexiPrepKit™	GE Healthcare (Freiburg, D)
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Gerbu (Gaiberg, D)
Guanidiniumchlorid (GdmCl, ultrapure)	ICN Biomedicals (Aurora, USA)
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid (TCEP)	Roth (Karlsruhe, D)
Ampicillin, Adenosin-5'-Triphosphat (ATP), Agarose, 30% Acrylamidlösung („Rotiphorese 30“), Chloramphenicol, Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), EDTA, Ethidiumbromid, Kanamycin, Phenol, Roti-Load- Proteinauftragspuffer, <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenethylendiamin (TEMED), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	
Ammoniumperoxodisulfat (APS), Desoxycholat, Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, D)
Coomassie Brilliant Blue G-250, Glutathion ox. (GSSG, > 98%), Glutathion red. (GSH, > 99%), Iodacetat (99 %), 5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure (1,5-IAEDANS, > 90%), Natriumcitrat, Silica S-5631, N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -(2-ethan)-sulfonsäure (HEPES), Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Index-Screen</i>	(Hampton Research, Laguna Niguel, USA)
<i>PEG/Ionen-Screen I, II</i>	
<i>Precipitant Synergy Screen</i>	(Emerald BioSystems, Bainbrid- ge Island, USA)
<i>Wizard random sparse matrix crystallization screen I-III</i>	

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma VWR (Darmstadt, D) im Reinheitsgrad p. A. bezogen. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde mit einer Seralpur-

Reinstwasseranlage deionisiert (ddH₂O, Leitfähigkeit < 0,1 µS/cm). Puffer für spektroskopische Messungen wurden durch 0,45 µm-Nylonfilter filtriert und vor Gebrauch jeweils mindestens 20 min entgast.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Membranfilter (0,22 µm und 0,45 µm)	Roth (Karlsruhe, D)
NAP TM -10- und NAP TM -5-Säulen (Sephadex TM G-25 DNA Grade), HiLoad Superdex TM 75 (16/60) <i>prep grade</i> - und HiLoad Superdex TM 75 (26/60) <i>prep grade</i> -Gelfiltrationssäule	GE Healthcare (Freiburg, D)
Ni-NTA-Superflow-Agarose	Qiagen (Hilden, D)
Spectra/Por-Dialyseschläuche (Ausschlussgrenze 3,5 kD)	Spectrum (Los Angeles, USA)

2.1.8 Geräte

X.17MV Sequential <i>stopped-flow</i> Spektrofluorimeter	Applied Photophysics (Leatherhead, UK)
Transilluminator 302 nm	Bachhofer (Reutlingen, D)
Sonifier B15 Ultraschall Desintegrator	Branson (Heusenstamm, D)
Christ Alpha 1-4 Gefriertrocknungsanlage	Christ (Osterode, D)
Kühlzentrifuge „Sorvall RC5B Plus“	DuPont (Bad Homburg, D)
Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, D)
Thermoschüttler “Thermomixer 5436”	
FPLC-Anlage, 2050 MIDGET Electrophoresis Unit	GE Healthcare (Freiburg, D)
ÄKTA-FPLC	
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil	Hellma (Mühlheim, D)
Zentrifuge “Laborfuge 400R“	Heraeus (Hanau, D)
Hitachi-Fluoreszenzspektrophotometer F-4010	Hitachi (Tokio, Japan)
Jasco-Fluoreszenzspektrophotometer (FP-6500)	Jasco (Groß-Umstadt, D)
Refraktometer	Krüss (Hamburg, D)
Bio-Print Darkroom CN-UV / WL	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
Microfluidizer M-110L	Microfluidics (Newton, USA)
Thermocycler PTC 100 (Mini-Cycler)	MJ Research (Watertown, USA)
Easyject Prima Elektroporationsapparatur	Peqlab (Erlangen, D)
Seralpur PRO 90 CN Reinstwasser-Anlage	Seral (Ransbach-Baumbach, D)
Cary 100 Bio UV-VIS-Spektrophotometer	Varian (Darmstadt, D)
WTW pH 537 Microprocessor pH-Meter	WTW (Weilheim, D)

2.1.9 Computerprogramme

Biocapt	LTF-Labortechnik (Wasserburg, D)
BioEdit	Hall, T. (Ibis Therapeutics, Carlsbad, USA)
Coot	Emsley <i>et al.</i> ⁷⁰
Grafit 3.0, Grafit 5.0	Erithacus Software (Staines, UK)
PHENIX	Adams <i>et al.</i> ⁷¹
PyMOL	DeLanoScientific LLC (San Francisco, USA)
Swiss-Pdb Viewer Version 3.7	GlaxoSmithKline (München, D), ⁷²

2.2 Elektrophoretische Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (1x): 40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH^{20 °C} 8,0

Probenpuffer (6x): 4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Die analytische Auftrennung sowie die präparative Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese, wobei die Konzentration an Agarose (0,6 - 2,0% (w/v)) je nach Größe der zu analysierenden Fragmente variierte. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{6}$ Volumen Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 30 min lang in 0,5x TAE-Puffer bei einer Spannung von 6 V pro cm Elektrodenabstand. Die DNA-Banden wurden in einer Ethidiumbromid-Lösung (ca. 2 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5x TAE-Puffer) 5 min lang gefärbt, kurz in 0,5x TAE-Puffer entfärbt und mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt.

2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow

Trenngel: 2,5% (w/v) Acrylamid (Stammlösung mit 37,5:1 Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid), 1 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,45, 0,1% (w/v) SDS

Sammelgel: 4,2% (w/v) Acrylamid (Stammlösung s.o.), 0,75 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,45, 0,07% (w/v) SDS

Probenpuffer (4x): 0,2 M Tris/HCl, pH^{RT} 7,0, 120 mM DTT, 40 mM EDTA, 15% (w/v) SDS, 48% (w/v) Glycerin, 0,04% (w/v) Bromphenolblau

Anodenpuffer: 0,2 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,9

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin, 0,1% (w/v) SDS, pH^{RT} 8,25

Färbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 25% Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 10% (v/v) Essigsäure,

Das von Schägger und von Jagow eingeführte Verfahren zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht eine gute Trennung kleiner Proteine durch Verwendung des Folgeions Tricin ⁷³. Die Proben (etwa 2,5 µg) wurden mit Probenpuffer versetzt, 15 min im kochenden Wasserbad erhitzt und abzentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer MIDGET-Vertikal-Elektrophorese-Apparatur bei

einer Stromstärke von 25 mA für das Sammelgel und 45 mA für das Trenngel. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel 2 h lang in der Färbelösung gefärbt und mehrere Stunden entfärbt.

2.3 Isolierung und Reinigung von DNA

2.3.1 Präparation von doppelsträngiger DNA

Für die Isolierung von doppelsträngiger Phagen- und Plasmid-DNA wurde der FlexiPrepKit™ (GE Healthcare, Freiburg, D) verwendet. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht in 5 ml dYT-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum bei 37 °C angezogen. 1,5 ml der Kultur wurden abzentrifugiert und gemäß den Angaben des Herstellers behandelt. Die Zellen werden hierbei im alkalischen Milieu⁷⁴ aufgeschlossen, die DNA an eine Anionenaustauschermatrix gebunden und mit 50 µl ddH₂O eluiert.

2.3.2 Präparation von einzelsträngiger Phagen-DNA

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, 1 mM EDTA

Zur Isolierung einzelsträngiger Phagen-DNA wurde das nach 2.6.1 erhaltene Phagenpellet in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Phagenhülle wurde durch Zugabe von 50 µl Phenol/Tris, starkes Schütteln (30 s) und Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 1 min) abgetrennt. Die ssDNA-haltige Oberphase wurde zusätzlich durch Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) unter den gleichen Bedingungen gewaschen. Die Präzipitation der ssDNA erfolgte mit 300 µl Ethanol / 3 M Na-Acetat (25:1), pH 5,2, 15 min lang bei RT. Nach 10-minütiger Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C) wurde die präzipitierte ssDNA mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, 10 min bei RT getrocknet und in 20 µl ddH₂O resuspendiert.

2.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und Reinigung mit Silica

PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Waschpuffer: 50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 2,5 mM EDTA, 50% Ethanol, pH^{RT} 7,5

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

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten (2.2.1) wurde die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten, und das Gelstück mit dem gleichen Volumen 6 M NaI 5 min lang unter Schütteln bei 55 °C aufgeschmolzen. Nach Zugabe einer entsprechenden Menge Silica-Suspension (1 mg bindet ca. 3 µg DNA) wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Das Silica wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Waschpuffer restlos abgenommen. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe eines der eingesetzten Silica-Suspension entsprechenden Volumens ddH₂O und 5-minütiger Inkubation bei 45 °C. Nach kurzer Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) wurde der DNA-haltige Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das gleiche Verfahren wurde zur Entsalzung von DNA angewendet.

2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.4.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Pfu-Polymerase-Puffer (10x): 0,2 M Tris/HCl, pH^{25 °C} 8,0, 0,1 M KCl, 0,1 M (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA

DNA-Fragmente wurden mit *Pfu*-Polymerase amplifiziert, da diese Polymerase im Gegensatz zur fehleranfälligeren *Taq*-Polymerase eine 3'-Exonuclease-Aktivität besitzen. Die PCR erfolgte in 1x Puffer mit 400 µM dNTPs, je 400 nM Primer und 0,5 µl Templat-DNA (ca. 100 ng/µl). Die Reaktion wurde nach Aufheizen auf 95 °C durch Zugabe von 3 U *Pfu*-Polymerase gestartet („hot start“). Die PCR erfolgte nach 2-minütiger Inkubation bei 95 °C in 30 Zyklen aus Strangtrennung (95 °C), Hybridisierung (je nach verwendetem Primerpaar 45 - 55 °C) und Polymerisation (72 °C). Anschließend wurde eine 10-minütige Polymerisation bei 72 °C durchgeführt und der Erfolg der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.2.1).

2.4.2 Kolonie-PCR

MgCl₂-freier *Taq*-Polymerase Puffer (10x): 0,1 M Tris/HCl, pH^{25 °C} 9,0, 0,5 M KCl, 1 % Triton X-100

Die Kolonie-PCR ermöglicht den Nachweis bestimmter DNA-Fragmente, indem einzelne Kolonien einer PCR mit *Taq*-Polymerase unterzogen werden. Da die PCR ausschließlich dem analytischen Nachweis dient, ist die höhere Fehlerrate der *Taq*-Polymerase hier nicht hinderlich. Ein 50 µl-PCR-Ansatz enthielt 5 µl Mg-freien Puffer (10x), 5 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl dNTPs (10 mM), je 1 µl Primer (10 µM), 1 U *Taq*-Polymerase und 36 µl ddH₂O. Zellen einzelner Kolonien wurden in den PCR-Ansatz transferiert und 50 µl dYT-Medium mit dem restlichen Zellmaterial angeimpft, um mögliche positive Klone weiter kultivieren zu können. Die PCR erfolgte unter den in 2.4.1 angegebenen Bedingungen und wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.2.1). Die Kolonie-PCR wurde auch eingesetzt, um infizierte Kolonien in den Konkurrenzexperimenten auf die jeweiligen Phagen testen zu können (2.6.5).

2.4.3 *BluntEnd*-Mutagenese

Pfu-Polymerase-Puffer (10x): 0,2 M Tris/HCl, pH^{25 °C} 8,0, 0,1 M KCl, 0,1 M (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA

T4-PNK-Puffer (10x): 0,7 M Tris/HCl, pH^{25 °C} 7,6, 0,1 M MgCl₂, 5 mM DTT

T4-DNA-Ligase-Puffer (10x): 250 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% PEG-8000

Durch *BluntEnd*-Mutagenese wurden Mutationen in Plasmide oder in das Phagen genom eingeführt. Hierbei wird mit Hilfe von gegenläufigen Primern das gesamte Phagen genom bzw. Plasmid amplifiziert und anschließend zirkularisiert. Die PCR erfolgte unter den in 2.4.1 angegebenen Bedingungen mit 3 U *Pfu*-Polymerase, wobei auf eine ausreichende Polymerisationszeit (2 min pro kb DNA-Länge) geachtet werden muss.

Das lineare PCR-Fragment wurde im 30 μ l-Ansatz phosphoryliert. Hierzu wurden 24 μ l gereinigtes PCR-Produkt (2.3.3) mit 3 μ l 10x T4-PNK-Puffer und 3 μ l 10 mM ATP sowie 2 μ l T4-Polynukleotidkinase (10 U/ μ l) 2 h lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das entsalzte, phosphorylierte Fragment durch Ligation zirkularisiert. 27 μ l PCR-Produkt wurden mit 3 μ l 10x T4-DNA-Ligase-Puffer und 1 μ l T4-DNA-Ligase (5 U/ μ l) 2 h bei 18 °C inkubiert. Die Templat-DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* geschnitten. *DpnI* erkennt seine Zielsequenz GATC nur bei N6-Methylierung des Adenins und spaltet deshalb spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA. Die *in vitro* mittels PCR synthetisierte DNA weist im Gegensatz zu der aus *E. coli* präparierten DNA diese Modifikation nicht auf und wird daher nicht geschnitten. Die Restriktion mit 1 μ l *DpnI* (20 U/ μ l) bei 37 °C erfolgte nach 20-minütiger Inaktivierung der Ligase (bei 65 °C). Anschließend wurden elektrokompetente *E. coli* XL1Blue-Zellen mit 5 μ l des Ansatzes transformiert (2.5.1), und die DNA einzelner Kolonien wurde durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen, D) auf die gewünschte Sequenz überprüft.

2.5 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.5.1 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 500 ml dYT-Medium mit 1 ml einer ÜNK von *E. coli* XL1Blue angeimpft und bis zu einer $OD_{600} \approx 0,7$ bei 30 °C angezogen. Die Kultur wurde 15 min lang auf Eis inkubiert und anschließend einmal mit sterilem ddH₂O und zweimal mit 10 % (v/v) Glycerin gewaschen (Zentrifugation für jeweils 10 min bei 5000 rpm und 4 °C). Das gewaschene Zellpellet wurde in 1,5 ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert und in 40 μ l-Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die zu transformierende DNA wurde 15 min lang gegen ddH₂O mikrodialysiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, der dialysierte Ansatz zugegeben und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation der Zellen erfolgte durch einen elektrischen Puls (2500 V, ca. 5 ms). Sofort nach dem Elektropuls wurden 700 μ l dYT-Medium zugegeben, und die Zellen 30 min lang bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellen kurz abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Bakterienpellet im restlichen Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf Nährböden mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.5.2 Herstellung und Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen wurden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen in 500 ml dYT-Medium bei 30 °C bis zu einer $OD_{600} \approx 0,7$ angezogen. Die Zellsuspension wurde 15 min lang auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C). Danach wurde das Bakterienpellet in 40 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml 80 mM CaCl₂, 20% (v/v) Glycerin aufgenommen und in 200 μ l-Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 5 μ l Plasmid zu 200 μ l kompetenten Zellen gegeben und 30 min lang auf Eis inkubiert. Nach einem 45 s-Hitzepuls bei 42 °C wurden 700 μ l dYT-Medium zugegeben, und die Zellen 30 min lang bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, der

Überstand größtenteils abgenommen und die Zellen im restlichen Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf Nährböden mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.6 Arbeiten mit Phagen

2.6.1 Propagation und Isolierung von 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 Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄, ad 1 l ddH₂O

Zur Phagenpropagation wurden 5 ml einer *E. coli* XL1Blue-Kultur (OD₆₀₀ ≈ 1,0) in dYT-Medium mit 50 µl Phagensuspension (ca. 10¹⁰ - 10¹¹ cfu/ml) infiziert. Nach 30 min wurden 25 µg/ml Cm zugegeben. Die verwendeten Phagen vermitteln Cm-Resistenz, jedoch ist eine 30-minütige Inkubation für die Expression der Chloramphenicolacetyltransferase nötig. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. 1,5 ml dieser ÜNK wurden bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand durch einen Membranfilter (0,22 µm) sterilfiltriert. Die Phagen wurden anschließend gefällt, indem 1,2 ml des Überstands mit 250 µl PEG-Lösung 15 min lang bei RT inkubiert wurden. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Phagenpellet durch erneute Zentrifugation vom restlichen Medium abgetrennt und in 50 µl PBS-Lösung + 0,01% NaN₃ resuspendiert.

2.6.2 Infektion des F⁺ Stamms *E. coli* XL1Blue bzw. I⁺ Stamms *E. coli* ATCC 26075

Zum Test der Infektiosität der verschiedenen Phagenvarianten gegenüber F⁺ Zellen wurde der *E. coli* Stamm XL1Blue infiziert. Zu 495 µl einer *E. coli*-Kultur mit OD₆₀₀ ≈ 1 wurden 5 µl Phagensuspension (bei der Infektion der ATCC 26075 Zellen wurde aufgrund der geringen Infektionsrate das Verhältnis angepasst) gegeben und 5 min bei 37 °C bzw. 25 °C geschüttelt. Um Phagen abzutrennen, die nach dieser Zeit noch nicht infiziert hatten, wurde der Ansatz zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 2 min), das Zellpellet mit 500 µl dYT-Medium gewaschen, anschließend in 500 µl dYT-Medium resuspendiert und weitere 30 min bei 37° inkubiert.

Ausgehend von 10 µl des Infektionsansatzes wurde eine Verdünnungsreihe (Verdünnungen jeweils zehnfach) in dYT-Medium auf Eis erstellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 2 µl auf dYT^{Cm}-Nährboden aufgetragen und bei 37 °C inkubiert. Aus der Zahl der gebildeten Kolonien kann unter Berücksichtigung des entsprechenden Verdünnungsfaktors der Phagentiter (cfu/ml) bestimmt werden.

2.6.3 Infektion des F⁻ Stamms *E. coli* HB2156

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH^{RT} 8,0

Für die Infektion von F⁻ Zellen wurde der Bakterienstamm *E. coli* HB2156⁶⁸ verwendet. Die Phagen wurden gemäß 2.6.1 präpariert und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Infektion erfolgte in dYT-Medium in Gegenwart von 50 mM CaCl₂. Zu 450 µl *E. coli* HB2156 wurden 25 µl 1 M CaCl₂ und 25 µl Phagensuspension gegeben. Der Ansatz wurde zur Infektion 5 min lang bei 25 °C geschüttelt,

die restlichen Phagen durch kurze Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 2 min) abgetrennt, das Zellpellet gewaschen und der Phagentiter (*cfu/ml*) anhand von Verdünnungsreihen bestimmt (2.6.2).

2.6.4 Bestimmung der Phageninfektiosität

Die Infektiosität der verschiedenen Phagenkonstrukte wurde relativ zu den jeweiligen Referenzphagen bestimmt. Die entsprechenden Phagen wurden wie unter 2.6.1 beschrieben isoliert.

Um die relative Phagenkonzentration bestimmen zu können, wurde aus einem Teil der Phagensuspensionen die ssDNA präpariert (2.3.2). Der DNA-Gehalt der verschiedenen Phagensuspensionen wurde anhand der Absorption bei 260 verglichen. Entsprechend den relativen DNA-Konzentrationen wurden Suspensionen gleicher Phagenkonzentration hergestellt und diese für die Bestimmung der relativen Infektiosität (2.6.2) verwendet.

2.6.5 Konkurrenzexperimente

Um die Infektiosität des Phagen fd mit verschiedenen Phagenkonstrukten vergleichen zu können, wurden sogenannte Konkurrenzexperimente durchgeführt, bei denen jeweils zwei Phagenvarianten im gleichen Ansatz um die Infektion von *E. coli* XL1Blue konkurrierten. Hierzu wurden sterilfiltrierte Suspensionen gleicher Phagenkonzentration in einem bestimmten Verhältnis (meist 1:1) gemischt. Jeweils 5 µl der Phagemischung wurden 5 min lang mit 495 µl *E. coli* XL1Blue bei 25 °C inkubiert (*m.o.i* > 1). Überschüssige Phagen wurden durch Zentrifugation abgetrennt, das Zellpellet mit dYT-Medium gewaschen und anschließend in 500 µl dYT-Medium aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 25 °C wurde der Ansatz verwendet, um 5 ml dYT^{Cm}-Medium anzupipfen. Nach 8 h Phagenpropagation wurden die Phagen aus dieser Kultur präpariert (2.6.1) und für eine weitere Infektion eingesetzt. Es wurden vier bis zehn Zyklen aus Infektion, Phagenpropagation und -präparation durchgeführt. Nach jeder Infektionsrunde wurde eine geeignete Verdünnung der ÜNK auf dYT^{Cm}-Nährmedium ausplattiert und die jeweilige Phagenvariante in einzelnen Klonen mittels Kolonie-PCR (2.4.2) identifiziert. Der PCR-Ansatz enthielt die Primer BE Delta N1(+) und g3p_124S125L_Beb. Anhand der Größe des PCR-Produkts konnten die Phagenvarianten identifiziert werden. Es wurden mindestens 48 Klone pro Infektionsrunde getestet.

2.7 Klonierung verschiedener Proteinvarianten

T4-DNA-Ligase-Puffer (10x): 250 mM Tris/HCl, pH^{25 °C} 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP,
5 mM DTT, 25% PEG-8000

Die Gene von Proteinen, die rekombinant produziert werden sollten, wurden mit Hilfe der entsprechenden Restriktionsenzyme in den Expressionsvektor pET11a bzw. in das Phagen genom kloniert. Hierzu wurden die entsprechenden Genfragmente mittels PCR aus vorhandenen Expressionklonen, aus dem *E. coli* Genom bzw. aus dem Hefegenom amplifiziert und jeweils entsprechend 2.3.3 gereinigt. Die isolierte Vektor-DNA sowie das Genfragment wurden anschließend durch die entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, indem sie mit $\frac{1}{10}$ Volumen des jeweiligen Puffers (10x), gegebenenfalls mit $\frac{1}{100}$ Volumen BSA (100x), und 10 U des Restriktionsenzym 2 h lang bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur (meist 37 °C) inkubiert

wurden. Fragment und Vektor wurden nach 2.3.3 gereinigt und wie oben angegeben mit dem zweiten Restriktionsenzym geschnitten. Die Restriktionsansätze wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und das geschnittene Genfragment sowie die linearisierte Vektor-DNA aus dem Gel eluiert (2.3.3). Die Ligation mit dem geschnittenen Vektor erfolgte im 20 µl-Ansatz. 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x), 9 µl geschnittenes Genfragment und 7 µl Vektor wurden mit 2 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) mindestens 2 h lang bei 18 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde mikrodialysiert und *E. coli* XL1Blue mit 5 µl des Ansatzes gemäß 2.5.1 transformiert. Die Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR (2.4.2) auf im Vektor eingebaute Fragmente untersucht. Positive Klone wurden kultiviert und die Plasmid-DNA durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen, D) auf den entsprechenden Genotyp überprüft. Von positiven Klonen wurde eine Glycerinkultur (300 µl 87 % Glycerin + 600 µl der Kultur) angelegt. Die erstellten Expressionklone sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

2.8 Konstruktion und Klonierung der Einkettenvarianten von DsbC

Die Disulfidisomerase DsbC bildet ein Homodimer aus. Um selektiv ein aktives Zentrum des Homodimers ausschalten zu können, wurden die beiden Einheiten des Homodimers kovalent miteinander verknüpft. Hierzu wurde der Genabschnitt des späteren N-terminalen DsbC Fragments mittels KPCR (2.4.2) mit der Primern DsbC_NdeI_His6(+) und DsbC-(GGSE)(-) und der Genabschnitt der späteren C-terminalen DsbC Fragmente mit den Primern DsbC_BamHI(-) und DsbC-(GGSE)₂₀(+), DsbC-(GGSE)₁₇(+) oder DsbC-(GGSE)₁₄(+) amplifiziert. Die Primer kodieren für eine KpnI Restriktionsschnittstelle, über die zwei Genfragmente ligiert werden können, sowie für den Linker zwischen den späteren DsbC Monomeren. Die Genfragmente wurden gereinigt und mit einer Kombination der Restriktionsenzyme NdeI/KpnI bzw. KpnI/BamHI geschnitten. Anschließend wurden je zwei passende Genfragmente über die KpnI Restriktionsschnittstelle ligiert und gereinigt. Danach wurde dieses Genfragment mit einer Kombination der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI verdaut und in den Vektor pET11a ligiert (2.7). Das resultierende Plasmid wurde in *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert (2.5.1). Anhand von KPCR (2.4.2) und Sequenzierung der Gensequenz wurde sichergestellt, dass der Vektor das gewünschte Konstrukt enthielt. Zur Expression wurde der Vektor in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert (2.5.2).

Um ein aktives Zentrum auszuschalten, wurde vor Amplifizierung der Genfragmente in das Gen von DsbC mittels *BluntEnd*-Mutagenese (2.4.3) zwei Punktmutationen zur Inaktivierung von DsbC eingeführt. Es wurde nun wie oben beschrieben vorgegangen, wobei ein wildtypisches DsbC-Gen und die inaktive Variante des DsbC-Gens amplifiziert, geschnitten und miteinander ligiert wurden.

2.9 Test auf Überexpression eines Proteins

dYT-Medium: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton

Um zu überprüfen, ob eine Überexpression der verschiedenen Proteine im Vektor pET11a möglich ist, wurden 5 ml dYT^{Amp}-Medium mit dem jeweiligen *E. coli* BL21 (DE3) Stamm angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ ≈ 0,7 wurde 1 ml der Kultur mit OD₆₀₀ = 1 abzentrifugiert und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur restlichen Kultur wurde IPTG (Endkonzentration 1 mM) zur Induktion der Überexpression gegeben und weitere 4 h bei 37 °C

geschüttelt. Anschließend wurde erneut die OD_{600} bestimmt und 1 ml mit $OD_{600} = 1$ abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 50 μ l 1x-Probenpuffer resuspendiert und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (2.2.2). Eine Überexpression konnte anhand der Intensität der Bande mit dem entsprechenden Molekulargewicht vor und nach Induktion festgestellt werden.

2.10 Fermentation

dYT-Medium: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton

Die Proteine wurden cytoplasmatisch in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Die Fermentation erfolgte in 2 l dYT^{Amp}-Medium bei 37 °C. Bei einer $OD_{600} \approx 0,7$ wurde die Überexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 4,5 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (GS3-Rotor, 5000 rpm, 10 min, 4 °C).

2.11 Proteinreinigung

In Tabelle 2-1 sind die Proteinvarianten zusammengestellt, die rekombinant produziert, gereinigt und anschließend *in vitro* charakterisiert wurden.

Tabelle 2-1: Zusammenstellung der rekombinant produzierten Protein, sowie deren Reinigungshilfen (Reinigungs-tag) und die Strategie, nach der die Proteine gereinigt wurden.

Protein	Aminosäuren	Reinigungs-tag	Reinigungsstrategie
IF1 G3P*	1-264	N-terminaler His ₆ -tag	4
N1 Domäne (IF1 G3P*)	1-65	SUMO-Fusion	2a
N2 Domäne (IF1 G3P*)	84-264	C-terminaler His ₆ -tag	4
fd G3P*	1-218	C-terminaler His ₆ -tag	3
$\Delta\beta$ 6-G3P*	1-218	C-terminaler His ₆ -tag	3
N1 Domäne (fd G3P*)	1-68	N-terminaler His ₆ -tag	3
<i>E.c.</i> TolA-C	295-421	C-terminaler His ₆ -tag	4
G3P*-Clamp	1-218	C-terminaler His ₆ -tag	3
IF Domäne von <i>E.c.</i> SlpA	73-132	C-terminaler His ₆ -tag	4
IF Domäne von <i>E.c.</i> SlyD	76-130	Sumo-Fusion	2b
<i>E.c.</i> DsbA*	1-189	-	5
	1-189	SUMO-Fusion	2a
yPDI	1-530	N-terminaler His ₆ -tag	1
yPDI a'c	360-530	N-terminaler His ₆ -tag	1
<i>E.c.</i> DsbC	1-236	Sumo-Fusion	2a
<i>E.c.</i> DsbC-sc		N-terminaler His ₆ -tag	1
yMia40	290-403	SUMO-Fusion	3
	290-352	N-terminaler His ₆ -tag	1

2.11.1 Aufschluss

2.11.1.1 Unter nativen Bedingungen

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM DTT

Das Zellpellet aus 2.10 wurde in 100 ml Lysepuffer resuspendiert und mit Hilfe eines Microfluidizers unter Eiskühlung aufgeschlossen. Die Zelltrümmer und (falls vorhanden) *inclusion bodies* wurden durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 15000 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert.

2.11.1.2 Unter denaturierenden Bedingungen

Entfaltungspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, 6 M GdmCl, 50 mM GSH

Das Zellpellet aus 2.10 wurde in 100 ml Entfaltungspuffer aufgenommen und bei Eiskühlung für 1 h auf einem Magnetrührer inkubiert. In GdmCl unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 15000 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert.

2.11.2 Reinigungsstrategie 1: Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen und Gelfiltrationschromatographie

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 20 mM Imidazol

Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 500 mM Imidazol

Gelfiltrationspuffer: 100 mM K-Phosphat, 100 mM KCl, pH 7,0

Die Proteine wurden durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarosematrix und anschließender Gelfiltrationschromatographie gereinigt. Hierzu wurde der Überstand aus 2.11.1.1 mit 50 mM MgCl₂ versetzt, um das im Puffer enthaltene EDTA zu komplexieren. Der Ansatz wurde filtriert und mit einer Flussrate von 3 ml/min auf eine mit Ni-NTA-Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen. Nichtbindende Proteine wurden durch Waschen mit 20 mM Imidazol bei einer Flussrate von 2,5 ml/min entfernt. Die Elution des Proteins erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM.

Die proteinhaltigen Fraktionen aus der Affinitätschromatographie wurden vereinigt und in mehreren Läufen in 5 ml-Aliquots auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad Superdex 75 (16/60) *prep grade*-Säule aufgetragen. Das Protein wurde mit einer Flussrate von 1,7 ml/min eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen aus der Gelfiltration wurden vereinigt. Bei 4 °C wurden sie mit einem Zentrifugalfilter (Amicon Ultra, Millipore) mit einem Ausschlussgewicht von 5 kDa bei 3700 rpm konzentriert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.11.3 Reinigungsstrategie 2: Reinigung von Proteinen anhand der SUMO-Fusionstechnologie

2.11.3.1 a) Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 20 mM Imidazol

Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 500 mM Imidazol

Die SUMO-Fusionsproteine wurden durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarosematrix gereinigt. Hierzu wurde der Zentrifugationsüberstand aus 2.11.1.1 staubfiltriert und mit 50 mM MgCl₂ versetzt, um das im Puffer enthaltene EDTA zu komplexieren. Der Ansatz wurde mit einer Flussrate von 3 ml/min auf eine mit Ni-NTA-Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen. Nichtbindende Proteine wurden durch Waschen mit 20 mM Imidazol bei einer Flussrate von 2,5 ml/min entfernt. Die Elution des Proteins erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM.

2.11.3.2 b) Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen und oxidativer Rückfaltung

Ni-NTA-Entfaltungspuffer: 50 mM Tris/HCl pH^{RT} 8, 100 mM KCl, 15 mM β-Mercaptoethanol, 6 M GdmCl

Ni-NTA-Rückfaltungspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 5 mM GSH, 1 mM GSSG

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 20 mM Imidazol

Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 500 mM Imidazol

Die SUMO-Fusionsproteine wurden durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarosematrix gereinigt. Hierzu wurde der Zentrifugationsüberstand aus 2.11.1.2 staubfiltriert.

Entfaltetes Mia aus 2.11.1.2 wurde vor der Affinitätschromatographie mit einem Überschuss an EDTA versetzt, und 2 h lang bei 35 °C inkubiert, um das von Mia40 gebundene 2Fe-2S-Cluster zu komplexieren. Anschließend wurde der Ansatz mit einer entsprechenden Menge an MgCl₂ versetzt um vor der Affinitätschromatographie überschüssiges EDTA zu komplexieren.

Anschließend wurden die Ansätze auf eine mit Ni-NTA-Entfaltungspuffer äquilibrierte Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Nichtbindende Proteine wurden durch Waschen mit bei einer Flussrate von 2,5 ml/min entfernt. Das reduzierte, entfaltete Protein wurde mit 10 Säulenvolumen Ni-NTA-Rückfaltungspuffer und einer Flussrate von 2 ml/min auf der Säule rückgefaltet. Die Elution des Proteins erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM.

2.11.3.3 Proteolyse des SUMO-Fusionsproteins und erneute Affinitätschromatographie

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl

Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 500 mM Imidazol

Das Fusionsprotein wurde in einem Dialyseschlauch (3,5 kDa) zusammen mit 1 ml Ulp1 („SUMO-Protease“) bei 4 °C in 4 l Puffer A über Nacht dialysiert. Während der Dialyse wurde das Imidazol entfernt und das Protein durch Ulp1 hydrolytisch von SUMO abgespalten. Ulp1 besitzt wie das SUMO-Protein einen His₆-tag und kann somit über eine erneute Ni-NTA-Chromatographie vom gewünschten Protein abgetrennt werden. Die Affinitätschromatographie erfolgt wie in 2.11.3.1 beschrieben.

2.11.3.4 Gelfiltrationschromatographie

Gelfiltrationspuffer: 100 mM K-Phosphat, 100 mM KCl, pH 7,0

Die proteinhaltigen Fraktionen aus der Affinitätschromatographie wurden vereinigt und in mehreren Läufen in 5 ml-Aliquots auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad Superdex 75 (16/60) *prep grade*-Säule aufgetragen. Das Protein wurde mit einer Flussrate von 1,7 ml/min eluiert. Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden bei 4 °C mit einem Zentrifugalfilter (Amicon Ultra, Millipore) mit einem Ausschlussgewicht von 5 kDa bei 3700 rpm konzentriert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.11.4 Reinigungsstrategie 3: Reinigung aus *inclusion bodies*

2.11.4.1 Waschen der *inclusion bodies*

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM DTT

Waschpuffer: 1 mM EDTA, 1 mg/ml Desoxycholat, 20 mM DTT, pH^{RT} 8,0

Das Pellet aus 2.11.1.1 wurde in 15 ml Waschpuffer mit 0,2 mg/ml Lysozym gründlich resuspendiert und abzentrifugiert. Um Zelltrümmer vollständig zu entfernen, wurden die *inclusion bodies* auf die gleiche Weise noch dreimal mit je 10 ml Waschpuffer ohne Lysozym und dreimal mit je 10 ml Lysepuffer gewaschen.

2.11.4.2 Reduktive Entfaltung und oxidative Rückfaltung

Entfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, 1 mM EDTA, 6 M GdmCl, 50 mM GSH

Rückfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,5, 1 mM EDTA, 0,5 mM GSSG

Die *inclusion bodies* wurden zunächst in 5 ml 0,1 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,5, 1 mM EDTA, 50 mM GSH gewaschen, um das DTT aus den vorherigen Waschschrritten zu entfernen. Das Pellet wurde dann in 15 ml Entfaltungspuffer resuspendiert und die *inclusion bodies* 2 h unter reduktiven Bedingungen entfaltet. Die oxidative Rückfaltung wurde durch zehnfache Verdünnung in Rückfaltungspuffer initiiert und der Ansatz mindestens 6 h lang bei RT inkubiert. Anschließend wurde das bei der Rückfaltung auftretende Aggregat abzentrifugiert (SS34-Rotor, 16000 rpm, 20 min, 4 °C).

2.11.4.3 Affinitätschromatographie und Gelfiltration

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 20 mM Imidazol

Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 500 mM Imidazol

Gelfiltrationspuffer: 100 mM K-Phosphat, 100 mM KCl, pH 7,0

Der Rückfaltungsansatz aus 2.11.4.2 wurde durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarosematrix und anschließender Gelfiltrationschromatographie gereinigt. Hierzu wurde der Rückfaltungsansatz mit 50 mM MgCl₂ versetzt, um das im Puffer enthaltene EDTA zu komplexieren. Der Ansatz wurde auf eine mit Ni-NTA-Puffer A äquilibrierte Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Nichtbindende Proteine wurden durch Waschen mit 20 mM Imidazol bei einer Flussrate von 2,5 ml/min entfernt. Die Elution des Proteins erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM.

Die proteinhaltigen Fraktionen aus der Affinitätschromatographie wurden vereinigt und in mehreren Läufen in 5 ml-Aliquots auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad Superdex 75 (16/60) *prep grade*-Säule aufgetragen. Das Protein wurde mit einer Flussrate von 1,7 ml/min eluiert. Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden bei 4 °C mit einem Zentrifugalfilter (Amicon Ultra, Millipore) mit einem Ausschlussgewicht von 5 kDa bei 3700 *rpm* konzentriert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.11.5 Reinigungsstrategie 4: Oxidative Faltung auf einer Affinitätschromatographiesäule

2.11.5.1 Affinitätschromatographie und oxidative Faltung

Ni-NTA-Entfaltungspuffer: 50 mM Tris/HCl pH^{RT} 8, 100 mM KCl, 15 mM β-Mercaptoethanol, 6 M GdmCl

Ni-NTA-Rückfaltungspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 5 mM GSH, 1 mM GSSG

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 20 mM Imidazol

Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 100 mM KCl, 500 mM Imidazol

Der Zentrifugationsüberstand aus 2.11.1.2 wurde staubfiltriert. Anschließend wurde der Ansatz auf eine mit Ni-NTA-Entfaltungspuffer äquilibrierte Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Nichtbindende Proteine wurden durch Waschen mit Ni-NTA-Entfaltungspuffer bei einer Flussrate von 2,5 ml/min entfernt. Das reduzierte, entfaltete Protein wurde mit 10 Säulenvolumen Ni-NTA-Rückfaltungspuffer und einer Flussrate von 2 ml/min auf der Säule rückgefaltet. Anschließend wurde das Protein wie unter 2.11.2 beschrieben eluiert.

2.11.5.2 Gelfiltrationschromatographie

Gelfiltrationspuffer: 100 mM K-Phosphat, 100 mM KCl, pH 7,0

Die proteinhaltigen Fraktionen aus der Affinitätschromatographie wurden vereinigt und in mehreren Läufen in 5 ml-Aliquots auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad Superdex 75 (16/60)

prep grade-Säule aufgetragen. Das Protein wurde mit einer Flussrate von 1,7 ml/min eluiert. Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden bei 4 °C mit einem Zentrifugalfilter (Amicon Ultra, Millipore) mit einem Ausschlussgewicht von 5 kDa bei 3700 rpm konzentriert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.11.6 Reinigungsstrategie 5: Anionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie

Anionenaustausch-Puffer A: 20 mM Tris/HCl, pH 7,7

Anionenaustausch-Puffer B: 20 mM Tris/HCl, pH 7,7, 1 M NaCl

Gelfiltrationspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 7,0

Das Protein wurde in einem Zwei-Stufen-Verfahren durch Anionenaustausch-Chromatographie und anschließender Gelfiltrationschromatographie gereinigt. Hierzu wurde der Überstand der Zentrifugation aus 2.11.1.1 gegen Anionenaustausch Puffer A dialysiert. Das Dialysat wurde mit Anionenaustausch-Puffer A auf das doppelte Volumen verdünnt und mittels einer P1-Pumpe auf eine mit Puffer A äquilibrierte Fractogel EMD TMAE-650 (M)-Säule bei einer Flußrate von 5 ml/min aufgetragen. Nach 60minütigem Waschen wurden gebundene Proteine durch einen linearen NaCl-Gradienten von 0 - 0,6 M NaCl in 90 min eluiert. Noch gebundene Proteine wurden mit 1 M NaCl von der Säule gewaschen. DsbA-haltige Fraktionen wurden mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese identifiziert, vereinigt und in mehreren Läufen in 5 ml-Aliquots auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad Superdex 75 (16/60) prep grade-Säule aufgetragen. Das Protein wurde mit einer Flussrate von 1,7 ml/min eluiert. Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden bei 4 °C mit einem Zentrifugalfilter (Amicon Ultra, Millipore) mit einem Ausschlussgewicht von 5 kDa bei 3700 rpm konzentriert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.12 Proteinmodifikation

2.12.1 Modifikation von TolA-C

Um die Assoziation von TolA-C mit IF1 G3P*, dem Faltungsintermediat von G3P*-Clamp oder der isolierten N1-Domäne von fd G3P* bzw. IF1 G3P* durch Förster-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Experimente analysieren zu können, wurde TolA-C mit dem Fluoreszenzfarbstoff AEDANS markiert (TolA-C_AEDANS). Die Modifikation erfolgte durch eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit dem C-terminal angefügten Cystein in TolA-C (AS 295 - 421 + Cys-(Ala)₃-(His)₆). Zur Markierung wurde das Iodacetamid-Derivat des Farbstoffs eingesetzt. In einer nukleophilen Substitutionsreaktion ersetzt das Thiolation des Cysteins dabei das Iodatom, wobei ein stabiler Thioether gebildet wird.

Vor der eigentlichen Modifikation erfolgte zunächst eine Reduktion des eventuell oxidierten Cysteins mittels TCEP. Hierzu wurden 6 mg TolA-C in 840 µl 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, gelöst, mit 30 µl 0,1 M TCEP und 30 µl 0,1 M EDTA versetzt und 1 h lang bei RT inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 2 M Tris/HCl, pH^{RT} 8,0, auf pH 7,8 eingestellt, 2 mg IAEDANS (gelöst in 100 µl N,N-Dimethylformamid) bzw. 2 mg Iodacetat zum Ansatz gegeben, und der Reaktionsansatz 5 h lang bei RT geschüttelt. Nach Zentrifugation (30 min, 4 °C, 13000 rpm) wurde nicht umgesetztes IAEDANS bzw. Iodacetat durch zwei aufeinanderfolgende Gelfiltrationsschritte an einer NAPTM-10-Säule entfernt. Das modifizierte Protein wurde schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.12.2 Reduktion der IF Domäne von SlyD mit stabilisierender Disulfidbrücke

TCEP Lösung:	500 mM TCEP in ddH ₂ O
Stammlösung IF Domäne:	939 µM IF _{SS} , 100 mM K-Phosphat, pH 7,8, 1 mM EDTA
Entfaltungspuffer:	100 mM K-Phosphat, pH 7,8, 1 mM EDTA, 8 M GdmCl, 2,5 mM TCEP
Lagerungspuffer:	100 mM K-Phosphat pH 7,8, 1 mM EDTA, 4,5 M GdmCl

Die IF Domäne von SlyD mit stabilisierender Disulfidbrücke liegt nach der Reinigung in oxidiert, nativer Form vor. Für Untersuchungen der oxidativen Faltung der IF-Domäne wurde diese reduziert. Hierfür wurden 370 µl der Stammlösung mit 70 µl TCEP Lösung und 562 µl Entfaltungspuffer versetzt und 45 min bei 45 °C inkubiert. Anschließend wurde das niedermolekulare TCEP mittels Gelfiltrationschromatographie in zwei sukzessiven Läufen an einer NAPTM-10-Säule abgetrennt. Es wurde jeweils 1 ml der Probe auf die in Lagerpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und der Durchbruch verworfen. Anschließend wurde die reduzierte IF Domäne mit jeweils 1,4 ml Lagerungspuffer von der Säule eluiert. Das Eluat wurde mit Lagerungspuffer auf eine Konzentration von 45 µM IF-Domäne verdünnt und in 300 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.12.3 Oxidation der Thioloxygenasen und Disulfidisomerasen

Lagerungspuffer:	100 mM K-Phosphat, pH 7,8, 1 mM EDTA
GSSG-Stammlösung:	100 µM GSSG in ddH ₂ O

Um sicherzustellen, dass für Untersuchungen der Katalyse der oxidativen Faltung die katalytischen Zentren der Thioloxygenasen und Disulfidisomerasen vollständig oxidiert vorlagen, wurden 500 µl der Faltungshelferstammlösung (ca. 300 µM) mit 500 µl GSSG Stammlösung versetzt und bei 35 °C 45 min lang inkubiert. Anschließend wurde das niedermolekulare GSSG mittels Gelfiltrationschromatographie in zwei sukzessiven Läufen an einer NAPTM-10-Säule abgetrennt. Es wurde jeweils 1 ml der Probe auf die in Lagerungspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und der Durchbruch verworfen. Anschließend wurde die oxidierten Faltungshelfer mit jeweils 1,4 ml Lagerungspuffer von der Säule eluiert. Die vollständig oxidierten Proteine wurden in Lagerungspuffer bei -80 °C gelagert.

2.12.4 Herstellung von fehlverbrückter (*scrambled*) RNase T1 S54G P55N

Zunächst wurde eine Stammlösung (500 µM) von entfalteter RNase T1 S54G P55N in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, 5 M GdmCl, 1 mM EDTA mit 50 mM TCEP versetzt und zur vollständigen Reduktion 45 min lang bei 35 °C inkubiert. Anschließend wurde das niedermolekulare TCEP mittels Gelfiltrationschromatographie in zwei sukzessiven Läufen an einer NAPTM-10-Säule abgetrennt. Die nun reduzierte und entfaltete RNase T1 in 0,1 M K-P, pH 7,0, 1 mM EDTA, 5 M GdmCl wurde mit 50 mM GSSG versetzt und 8 h lang bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das niedermolekulare GSSG mittels Gelfiltrationschromatographie in zwei sukzessiven Läufen an einer NAPTM-10-Säule abgetrennt und dabei gleichzeitig die fehlverbrückte RNase T1 S54G P55N in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM KCl umgepuffert. Es wurden Aliquots zu 200 µl von 100 µM fehlverbrückter RNase T1 S54G P55N bei -80°C gelagert.

2.13 Spektroskopische Charakterisierung

2.13.1 Circular dichroismus-Spektren

Nah- und Fern-UV-Circulardichroismus-(CD)-Spektren wurden an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter in temperierbaren Quarzküvetten aufgenommen. Fern-UV-CD-Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 10 μM in 10 mM K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Schichtdicke von 0,1 cm gemessen. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 20 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm und einer Dämpfung von 1 s. Es wurden jeweils zehn Einzelspektren gemessen, gemittelt und das Pufferspektrum subtrahiert. Aus der gemessenen Elliptizität kann mit Gleichung 2-1 die molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\theta]_{\text{MRW}}$ berechnet werden.

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}}} \quad \text{Gl. 2-1}$$

$[\theta]_{\text{MRW}}$: molare Elliptizität pro Aminosäurerest (in $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$); θ : gemessene Elliptizität (in Grad); c: Konzentration des Proteins (in M); d: Schichtdicke (in cm); N_{AS} : Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

2.13.2 Fluoreszenzemissionsspektren

Alle Fluoreszenzemissionsspektren wurden an einem Jasco-Fluoreszenzspektrophotometer (FP-6500) in temperierbaren Fluoreszenzrührküvetten der Schichtdicke 1 cm bei 15 bzw. 25 °C aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug meist 1 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0. Die Spektren wurden mit einer Geschwindigkeit von 120 nm/min und einer Dämpfung von 0,5 s aufgenommen. Die Anregungsbandbreite betrug 3 nm, die Emissionsbandbreite 5 nm. Die Fluoreszenzspektren wurden nach Anregung bei 280 nm zwischen 300 und 450 nm bzw. nach Anregung bei 295 nm zwischen 305 und 450 nm aufgenommen. Für TolA-C_AEDANS wurden die Emissionsspektren zwischen 300 und 550 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Die Spektren wurden jeweils um die Pufferfluoreszenz korrigiert.

2.14 Bestimmung der konformationellen Proteinestabilität

2.14.1 Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge

2.14.1.1 Circular dichroismus

Die Messung thermisch-induzierter Entfaltungsübergänge erfolgte in einem Jasco J-600 Spektropolarimeter mit PTC-348 WI Peltier-Element bei einer Proteinkonzentration von 4 μM im Wellenlängenbereich von 230-220 nm und 1 μM bei 210 nm. Die Übergänge wurden bei einer Bandbreite von 1 nm, einer Dämpfung von 8 s und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen.

2.14.1.2 Absorption

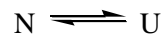
Die Messung der thermischen Entfaltung der Proteinvarianten G3P* $\Delta\beta 6$ und G3P* $\Delta\beta 6$ -VNG wurde über die Absorption in einem HP8452-Diodenarray-Spektrophotometer durchgeführt. Die Entfaltung wurde über die Absorption bei 296 nm verfolgt. Bei 296 nm tragen sowohl Tyrosine

als auch Tryptophane zur Absorption bei. Die Übergänge wurden bei Proteinkonzentrationen von 5-10 μM in 0,1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7,0 und 1 cm Schichtdicke gemessen.

2.14.2 Auswertung thermisch induzierter Entfaltungsübergänge

2.14.2.1 Auswertung nach dem Zweizustandsmodell

Entsprechend dem Zweizustandsmodell steht der native Zustand eines Proteins ohne Intermediate mit dem denaturierten Zustand im Gleichgewicht. Die Gleichgewichtskonstante K_U der Entfaltung kann aus einer physikalischen Eigenschaft y bestimmt werden (Gleichung 2-2). Die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_D kann mit Hilfe von Gleichung 2-3 bestimmt werden.



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

$$\Delta G_D = -RT \ln K_U \quad \text{Gl. 2-3}$$

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; ΔG_D : freie Enthalpie der Entfaltung (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$); R : allgemeine Gaskonstante; T : Temperatur (in K)

Die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_D wurde durch Integration des Enthalpie- und des Entropieterms zwischen T_M und T erhalten (Gleichung 2-4). Gleichung 2-5 gibt die lineare Änderung der Messgröße des nativen und des entfalteteten Proteins an.

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_D(T_M) \cdot \frac{T_M - T}{T_M} - \Delta C_p \cdot \left[T_M - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_M}\right) \right] \quad \text{Gl. 2-4}$$

$$y_{\text{N,U}} = y_{\text{N,U}}^0 + m_{\text{N,U}} \cdot T \quad \text{Gl. 2-5}$$

$\Delta G_D(T)$: freie Enthalpie des thermischen Übergangs (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$); ΔH_D : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei T_M (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$); T_M : Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs (in K); T : Temperatur (in K); ΔC_p : Änderung der molaren Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), $m_{\text{N,U}}$: Steigung der Grundlinie des nativen bzw. denaturierten Proteins

Die Kombination der Gleichungen 2-2 bis 2-5 liefert Gleichung 2-6. Der Mittelpunkt des thermischen Übergangs T_M und die van't Hoff-Enthalpie ΔH_D wurden anhand Gleichung 2-6 durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 3.0 bzw. Grafit 5.0 berechnet.

$$y(T) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot T + (y_U^0 + m_U \cdot T) \cdot e^{\left\{ -\frac{\Delta H_D(T_M)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_M} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[1 - \frac{T_M}{T} + \ln \left(\frac{T_M}{T} \right) \right] \right\}}{1 + e^{\left\{ -\frac{\Delta H_D(T_M)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_M} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[1 - \frac{T_M}{T} + \ln \left(\frac{T_M}{T} \right) \right] \right\}}} \quad \text{Gl. 2-6}$$

$y(T)$: 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); ΔH_D : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei T_M (in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$); ΔC_p : Änderung der molaren Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck (in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$); T : Temperatur (in K); R : allgemeine Gaskonstante

Aus den erhaltenen Werten für den Übergangsmittelpunkt T_M und die van't Hoff-Enthalpie ΔH_D kann die konformationelle Stabilität des Proteins berechnet werden ⁷⁵ (Gleichung 2-7).

$$\Delta G_D = \Delta H_D \cdot \left(1 - \frac{T}{T_M} \right) - \Delta C_p \left[T_M - T + T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_M} \right) \right] \quad \text{Gl. 2-7}$$

2.14.2.2 Auswertung nach dem Dreizustandsmodell

Bei der Auswertung thermischer Übergänge gemäß dem Dreizustandsmodell ⁷⁶ müssen die beiden Gleichgewichtskonstanten der Entfaltung K_1 und K_2 berücksichtigt werden.



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 Gesamtmenge an Protein (P) setzt sich dabei aus den Anteilen des nativen Proteins (N), des Intermediats (I) und des denaturierten Proteins (U) zusammen (Gleichung 2-9). Aus den Gleichungen 2-8 und 2-9 ergibt sich dann Gleichung 2-10 für die Berechnung des Anteils an denaturiertem Protein U.

$$[\text{P}] = [\text{N}] + [\text{I}] + [\text{U}] \quad \text{Gl. 2-9}$$

$$[\text{U}] = \frac{K_1 \cdot K_2 \cdot [\text{P}]}{K_1 \cdot K_2 + K_1 + 1} \quad \text{Gl. 2-10}$$

Der apparente Anteil des denaturierten Proteins y_{app} ergibt sich aus der Summe der Anteile des denaturierten Proteins (X_U) und des Intermediats (X_I) (Gleichung 2-11), wobei z die optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem denaturierten Zustand angibt.

$$y_{\text{app}} = [X_U] + z \cdot [X_I]; \quad [X_U] = \frac{[U]}{[P]}; \quad [X_I] = \frac{[U]}{K_2 \cdot [P]} \quad \text{Gl. 2-11}$$

Aus der Kombination der Gleichungen 2-8 bis 2-11 erhält man Gleichung 2-12, welche die Entfaltung anhand der Messgröße $y(T)$ in Abhängigkeit von der Temperatur beschreibt. Die Berechnung der Schmelztemperaturen für die beiden Domänen des G3P* sowie der van't Hoff-Enthalpien erfolgte gemäß Gleichung 2-17. Die Auswertung wurde durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 3.0 bzw. Grafit 5.0 durchgeführt.

$$y(T) = y_N^0 + m_N T + \frac{1}{1 + K_2 + \frac{1}{K_1}} \cdot (K_2 + z) \cdot \left[y_U^0 + m_U T - (y_N^0 + m_N T) \right] \quad \text{Gl. 2-12}$$

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

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

$y(T)$: Messgröße, gemessene Elliptizität in Grad; y_N, y_U : Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins, 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; $T_{M,1}, T_{M,2}$: Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs der N2- ($T_{M,1}$) bzw. der N1-Domäne ($T_{M,2}$) (in K); $\Delta H_{D,1}, \Delta H_{D,2}$: van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei $T_{M,1}$ bzw. $T_{M,2}$ (in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$); $\Delta C_{p,1}, \Delta C_{p,2}$: Differenz der molaren Wärmekapazitäten des denaturierten und nativen Proteins der N2- ($\Delta C_{p,1}$) bzw. der N1-Domäne ($\Delta C_{p,2}$) (in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$); z : optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem entfaltenen Zustand; T : Temperatur (in K); R : allgemeine Gaskonstante

Aus den erhaltenen Werten für den Übergangsmittelpunkt T_M und der van't Hoff-Enthalpie ΔH_D kann die konformationelle Stabilität des Proteins mit Hilfe von Gleichung 2-12 berechnet werden⁷⁵.

2.14.3 Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge

2.14.3.1 Konzentrationsbestimmung von GdmCl und Harnstoff

Für die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung wurden GdmCl und Harnstoff eingesetzt. Die jeweilige Konzentration wird dabei aus der Differenz der Brechungsindices des Puffers in Gegenwart und Abwesenheit von GdmCl bzw. Harnstoff berechnet (Gleichung 2-13 und 2-14).

$$[\text{GdmCl}] = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot (\Delta n)^2 - 91,6 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2-13}$$

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot (\Delta n)^2 + 185,56 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2-14}$$

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

2.14.3.2 Messung Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltungsübergänge

Die Entfaltung der Proteine wurde abhängig von ihrer Stabilität entweder durch Harnstoff oder das stärkere Denaturierungsmittel GdmCl induziert und anhand der Änderung der Proteinfluoreszenz verfolgt. Die Messungen erfolgten in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 15 bzw. 25 °C an einem Jasco FP-6500 Spektrofluorimeter in temperierbaren 1 cm-Fluoreszenzrührküvetten. 1 µM Protein wurden in einem Gesamtvolumen von 1000 µl mit unterschiedlichen Konzentrationen an Denaturierungsmittel 1 h lang bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Es wurde jeweils bei der größten Signaländerung gemessen, die anhand von Fluoreszenzspektren bei unterschiedlicher Denaturierungsmittelkonzentration bestimmt wurde. Die Bandbreite der Anregungswellenlänge betrug dabei 3 nm, die der Emissionswellenlänge 5 nm. Die exakte Denaturierungsmittelkonzentration der einzelnen Proben wurde nach refraktometrischer Bestimmung der Brechungsindices mit Hilfe von Gleichung 2-13 bzw. 2-14 bestimmt. Die Messwerte wurden jeweils um die Pufferfluoreszenz korrigiert.

2.14.3.3 Auswertung Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltungsübergänge

Für die Auswertung experimenteller Daten aus CD- und Fluoreszenzmessungen nach einem Zwei-Zustands-Modell wurde das lineare Extrapolationsmodell angenommen, welches die lineare Abhängigkeit der Proteinstabilität von der Denaturierungsmittelkonzentration beschreibt (Gl. 2-15).

$$\Delta G_D = \Delta G_D(\text{H}_2\text{O}) + m \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 2-15}$$

$\Delta G_D(\text{H}_2\text{O})$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels, m : Kooperativität des Entfaltungsübergangs, $[\text{D}]$: Denaturierungsmittelkonzentration

Für die spektroskopischen Eigenschaften von N und U wird ebenfalls eine lineare Abhängigkeit vom Denaturierungsmittel gemäß Gleichung 2-16 angenommen.

$$y_{\text{N,U}} = y_{\text{N,U}}^0 + m_{\text{N,U}} \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 2-16}$$

$y_{\text{N,U}}^0$: spektroskopische Eigenschaft des nativen bzw. entfalteten Proteins in Abwesenheit von Denaturierungsmittel, $m_{\text{N,U}}$: Steigung der Basislinie des nativen bzw. denaturierten Proteins

Die Kombination der Gleichungen 2-2, 2-3, 2-15 und 2-16 ergibt nach Santoro und Bolen⁷⁷ Gleichung 2-17, welche die Entfaltung anhand der Meßgröße y_{obs} in Abhängigkeit von der Konzentration des Denaturierungsmittels beschreibt. Die Parameter wurden mit dem Programm Grafit 3.0 durch nicht-lineare Regression an die experimentellen Daten angeglichen.

$$y_{\text{obs}}([\text{D}]) = \frac{y_{\text{N}}^0 + m_{\text{N}}[\text{D}] + (y_{\text{U}}^0 + m_{\text{U}}[\text{D}]) \cdot e^{-\frac{\Delta G_{\text{U}}(\text{H}_2\text{O}) + m[\text{D}]}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G_{\text{U}}(\text{H}_2\text{O}) + m[\text{D}]}{RT}}} \quad \text{Gl. 2-17}$$

y_{obs} : Meßgröße bei Vorliegen einer Mischung von N und U; y_{N} , y_{U} : Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins, wobei y^0 jeweils auf $[\text{D}] = 0$ M extrapolierte Werte angibt; m_{N} , m_{U} : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; $[\text{D}]$: Denaturierungsmittelkonzentration; $\Delta G_{\text{U}}(\text{H}_2\text{O})$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels; R : allgemeine Gaskonstante; T : Temperatur in K

Die Auswertung von Entfaltungsübergängen mit einem biphasischen Verlauf wurden gemäß einem Dreizustandsmodell ausgewertet. Das Modell basiert auf einer gekoppelten Monomerisierung und Entfaltung nach Beasty *et al.*⁷⁶.

Für die Entfaltung gelten damit die Gleichungen 2.8 - 2.10. Für die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung ergibt sich daraus Gleichung 2-18.

$$y(D) = y_N^0 + m_N \cdot [D] + \frac{1}{1 + K_2 + \frac{1}{K_1}} \cdot (K_2 + z) \cdot (y_U^0 + m_U \cdot [D] - (y_N^0 + m_N \cdot [D])) \quad \text{Gl. 2-18}$$

$$K_1 = K_{NI} = \exp\left(\frac{-\Delta G_{1,H_2O}^0 + m_1[D]}{RT}\right)$$

$$K_2 = K_{IU} = \exp\left(\frac{-\Delta G_{2,H_2O}^0 + m_2[D]}{RT}\right)$$

$y(D)$: Meßgröße, gemessene Fluoreszenz; y_N, y_U : Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins, wobei y^0 jeweils auf 0 M Denaturierungsmittel extrapolierte Werte angibt; m_N, m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; $\Delta G_{1,H_2O}, \Delta G_{2,H_2O}$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels; $[D]$: Konzentration des Denaturierungsmittels; z : optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem entfalteten Zustand; T : Temperatur in K; R : allgemeine Gaskonstante

Gleichung 2-18 ermöglicht die Bestimmung der freien Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels und des Kooperativitätsparameters m für die beiden Übergänge.

2.15 Kinetische Messungen

2.15.1 Kinetik nach manueller Mischung

Langsame Ent- und Rückfaltungsreaktionen von Proteinen wurden nach manueller Mischung anhand der zeitlichen Fluoreszenzänderung an einem Jasco FP-6500 Spektrofluorimeter bestimmt. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 1 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C in Fluoreszenzrührküvetten der Schichtdicke 1 cm durchgeführt. Die Ent- und Rückfaltung wurden dabei durch 20fache Verdünnung von 20 μM nativem bzw. denaturiertem Protein (in 5 M GdmCl bzw. 6 M Harnstoff) in verschiedenen GdmCl- bzw. Harnstoff-Konzentrationen initiiert. Die Reaktionen wurden durch geeignete Wahl der Anregungs- und Emissionswellenlänge bei der maximalen Fluoreszenzänderung beobachtet. Die Messungen erfolgten dabei jeweils bei einer Dämpfung von 0,5 s und einer Bandbreite von 3 nm bzw. 5 nm für Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge.

2.15.2 Kinetik nach schneller Mischung

Schnelle Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen wurden nach *stopped-flow*-Mischung an einem Applied Photophysics DX.17MV Sequential *stopped-flow*-Spektrofluorimeter untersucht. Die Messungen wurden bei 25 °C mit einer Proteinkonzentration von 1 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, durchgeführt, wobei Messzelle, Vorschubspritzen und Schlauchverbindungen temperiert wurden. Vor jeder Messung wurden die Lösungen 5 min lang in den Vorschubspritzen temperiert. Die

Vorschubspritzen wurden mit einem Vorschubdruck von 2,5 bar bewegt. 11 μM natives bzw. denaturiertes Protein (in 5,5 M GdmCl bzw. 6,6 M Harnstoff) wurde dabei elffach in Puffer verschiedener GdmCl- bzw. Harnstoff-Endkonzentrationen verdünnt. Die Kinetik wurde dann anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz (spektrale Bandbreite je nach Filter, der dem Photomultiplier vorgelagert ist) nach Anregung bei 280 nm bzw. 295 nm verfolgt. Die Bandbreite des Anregungsspalts betrug 10 nm, die Schichtdicke der Beobachtungszelle 2 mm. Die am Photomultiplier eingestellte Spannung wurde für die einzelnen Proteine angepasst, um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Für jede GdmCl- bzw. Harnstoff-Konzentration wurden zehn Einzelmessungen durchgeführt, gemittelt und nach Gleichung 2-23 bzw. 2-24 analysiert.

2.15.3 Auswertung der kinetischen Messungen

Die Auswertung kinetischer Messungen erfolgte durch Angleich einfach- oder mehrfachexponentieller Kurvenverläufe (Gleichung 2-19) an die experimentellen Daten.

$$y(t) = y_0 + \sum_{i=0}^n A_i \cdot \exp(-k_i \cdot t); \quad k_i = 1/\tau_i \quad \text{Gl. 2-19}$$

$y(t)$: Fluoreszenzsignal zur Zeit t ; y_0 : Fluoreszenzsignal zur Zeit $t = 0$ s; A_i : Amplitude der Signaländerung; k_i : Rate der Signaländerung (in s^{-1}); τ_i : Zeitkonstante der Signaländerung (in s)

In manchen Fällen wurde obige Gleichung durch einen linearen Anteil ergänzt, wodurch Photo- und Aggregationseffekte während längerer Messzeiten berücksichtigt werden konnten (Gleichung 2-20).

$$y(t) = y_0 + m \cdot t + \sum_{i=0}^n A_i \cdot \exp(-k_i \cdot t); \quad k_i = 1/\tau_i \quad \text{Gl. 2-20}$$

$y(t)$: Fluoreszenzsignal zur Zeit t ; y_0 : Fluoreszenzsignal zur Zeit $t = 0$ s; A_i : Amplitude der Signaländerung; k_i : Rate der Signaländerung (in s^{-1}); m : Steigung des linearen Anteils; τ_i : Zeitkonstante der Signaländerung (in s)

Der Angleich an die Daten erfolgte mit dem Programm Grafit 3.0 bzw. Grafit 5.0. Die apparente Geschwindigkeitskonstante λ berücksichtigt die Beiträge der Ent- und der Rückfaltungsreaktion. Das lineare Zweizustandsmodell beschreibt die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante λ von der Denaturierungsmittelkonzentration (Gleichung 2-21).

$$\lambda = k_{\text{NU}} \cdot \exp(m_{\text{NU}} \cdot [\text{D}]) + k_{\text{UN}} \cdot \exp(m_{\text{UN}} \cdot [\text{D}]) \quad \text{Gl. 2-21}$$

λ : apparente Geschwindigkeitskonstante; k_{NU} , k_{UN} : extrapolierte Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in s^{-1}); m_{NU} , m_{UN} : kinetische Kooperativitätsparameter (in M^{-1}); $[\text{D}]$: Denaturierungsmittelkonzentration (in M)

2.15.4 Kinetik der Assoziation mit Tola-C

Die Wechselwirkung von Tola-C mit der isolierten N1-Domäne bzw. verschiedenen G3P*-Varianten wurde nach *stopped-flow*-Mischung an einem Applied Photophysics DX.17MV Sequential *stopped-flow*-Spektrofluorimeter gemessen. Die Assoziation wurde durch 11fache Verdünnung von

5,5 μM TolA-C_AEDANS mit G3P*-\(\Delta\beta6\), IF1 G3P* oder den isolierten N1 Domänen von fd und IF1 G3P* initiiert. Die Endkonzentration an TolA-C-AEDANS betrug 0,5 μM , die Endkonzentration der Titranten variierte zwischen 0 und 20 μM . Die Messungen wurden in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C durchgeführt. Die Komplexbildung konnte anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 460 nm beobachtet werden. Die Anregung erfolgte bei 280 nm mit einer Bandbreite von 10 nm in einer Beobachtungszelle der Schichtdicke 2 mm. Streu- und Fluoreszenzlicht unterhalb von 460 nm wurde durch eine, mit einer Lösung von p-Nitroanilin in Ethanol (2 mg/ml) gefüllten, 5 mm-Küvette vor dem Photomultiplier absorbiert. Am Photomultiplier wurde eine Gegenspannung von 750 V angelegt, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Es wurden jeweils zehn Einzelmessungen durchgeführt, gemittelt und analysiert, indem an die experimentellen Daten monoexponentielle Funktionen angeglichen wurden und so die Amplituden und Raten der Reaktion bestimmt wurden.

Der Amplitudenverlauf in Abhängigkeit der Titrantenkonzentration kann gleich einer Gleichgewichtstitration analysiert werden um die Dissoziationskonstante K_D der beiden Reaktionspartner zu bestimmen.

Bei der Bindung von N1 an TolA-C_AEDANS (TolA*) gilt folgendes Gleichgewichtsschema:



Die Dissoziationskonstante K_D berechnet sich dann nach Gleichung 2-22:

$$K_D = \frac{[\text{N1}] \cdot [\text{TolA}^*]}{[\text{N1} \cdot \text{TolA}^*]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad \text{Gl. 2-22}$$

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

Unter Berücksichtigung der Massenerhaltung, d.h. $[\text{N1}] = [\text{N1}]_0 - [\text{N1} \cdot \text{TolA}^*]$ und $[\text{TolA}^*] = [\text{TolA}^*]_0 - [\text{N1} \cdot \text{TolA}^*]$ (wobei $[\text{N1}]_0$ und $[\text{TolA}^*]_0$ die Gesamtkonzentration an N1 bzw. TolA-C-AEDANS bezeichnen) erhält man aus Gleichung 2-23 die Konzentration des N1-TolA-C-AEDANS-Komplexes.

$$[\text{N1} \cdot \text{TolA}^*] = \frac{[\text{N1}]_0 + [\text{TolA}^*]_0 + K_D}{2} \pm \sqrt{\frac{([\text{N1}]_0 + [\text{TolA}^*]_0 + K_D)^2}{4} - [\text{N1}]_0 [\text{TolA}^*]_0} \quad \text{Gl. 2-23}$$

Für die Fluoreszenz von TolA-C-AEDANS gilt:

$$F = F_0 + \Delta F \cdot \frac{[\text{N1} \cdot \text{TolA}^*]}{[\text{TolA}^*]_0} \quad \text{Gl. 2-24}$$

F: gemessene Fluoreszenz, F_0 : Fluoreszenz des freien TolA-C-AEDANS, ΔF : maximale Fluoreszenzänderung bei vollständiger Bindung

Bei Kombination der Gleichungen 2-23 und 2-24 erhält man Gleichung 2-25, die an die Fluoreszenzänderung als Funktion der Proteinkonzentration angepasst werden kann, um Werte für die Dissoziationskonstante K_D zu erhalten. Die Analyse gemäß Gleichung 2-25 erfolgte mit dem Programm Grafit3.

$$F = F_0 + \frac{\Delta F}{[TolA^*]_0} \left(\frac{[N1]_0 + [TolA^*]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([N1]_0 + [TolA^*]_0 + K_D)^2}{4} - [N1]_0[TolA^*]_0} \right) \quad \text{Gl. 2-25}$$

2.15.5 Bindung des Faltungsintermediats von G3P* an TolA-C

Phagenkonstrukte, die G3P*-Clamp als Vermittler der Phageninfektion besitzen, zeigen eine vom Oxidationszustand der Disulfidbrücke von G3P*-Clamp abhängige Infektiosität. Die unterschiedlichen Infektiositäten wurden mit der Affinität des Faltungsintermediats von G3P*-Clamp in oxidiert und reduzierter Form gegenüber TolA-C *in vitro* korreliert.

Hierzu wurden 10 μ l 1,01 mM G3P*-Clamp in 50 μ l 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0 und 5 M GdmCl in Gegenwart oder in Abwesenheit von 25 mM TCEP 5 h lang bei 40 °C inkubiert. Die Rückfaltung wurde durch 25fache Verdünnung in entgastem und mit N₂ gesättigtem Puffer (0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, 1 mM EDTA) auf Eis initiiert. Nach 10 minütiger Rückfaltung auf Eis wurde die Affinität gegenüber TolA-C_AEDANS, wie für die isolierte N1 Domäne beschrieben (2.15.4), ermittelt. Die Ergebnisse aus diesem Experiment wurden qualitativ verglichen.

2.15.6 Oxidative Faltung von IF_{SHSH} und die Beschleunigung durch Thioloxygenasen

IF_{SHSH} wurde als Substrat genutzt, um die Aktivität verschiedener Thioloxygenasen zu charakterisieren. Hierzu wurden variierende Konzentrationen der Thioloxygenasen eingesetzt, um jeweils 1 μ M IF_{SHSH} zu oxidieren. Die Oxidation und die nachfolgende, sehr schnelle konformationelle Faltung konnte anhand der intrinsischen Fluoreszenzänderung von IF_{SHSH} beobachtet werden.

2.15.6.1 Oxidative Faltung von IF_{SHSH} nach manueller Mischung

Variierende Konzentrationen an Thioloxygenasen wurden in 978 μ l 0,1 M K-Phosphat, pH 6,4 – 7,8 vorgelegt und 3 min lang in einer Fluoreszenzrührküvette bei 15 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 22 μ l der IF_{SHSH} Stammlösung (45 μ M IF_{SHSH} in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,8, 1 mM EDTA, 4,5 M GdmCl) gestartet. Die Zunahme der Fluoreszenz bei 335 nm wurde nach Anregung bei 295 nm bei einer Spaltbreite von je 3 nm detektiert. Die Auswertung erfolgte durch Angleich von monoexponentiellen Funktionen an die Datenpunkte, auf diese Weise wurden die Raten der Reaktionen bestimmt.

2.15.6.2 Oxidation von IF_{SHSH} nach *stopped flow* Mischung

Schnelle oxidative Rückfaltungsreaktionen von IF_{SHSH} wurden an einem Applied Photophysics DX.17MV Sequential *stopped flow* Spektrofluorimeter untersucht. Die Messungen erfolgten in 0,1 M K-Phosphat, pH 6,4 – 7,8 (pH Wert nach Mischung) bei 15 °C. Die Rückfaltungsreaktion

konnte anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 320 nm beobachtet werden. Die Anregung erfolgte bei 295 nm mit einer Bandbreite von 10 nm in einer Beobachtungszelle der Schichtdicke 2 mm. Streu- und Fluoreszenzlicht unterhalb von 320 nm wurde durch eine, mit Aceton gefüllte 5 mm-Küvette vor dem Photomultiplier absorbiert. Am Photomultiplier wurde eine geeignete Gegenspannung angelegt, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Es wurden jeweils zehn Einzelmessungen durchgeführt, gemittelt und analysiert, indem den Datenpunkten monoexponentielle Funktionen angeglichen wurden und so die Reaktionsraten bestimmt wurden (2.15.3).

Die Rückfaltungsreaktion wurde nach 11-facher Verdünnung einer IF_{SHSH} Stammlösung (11 μM IF_{SHSH} in 0,1 M K-Phosphat, pH 6,4 – 7,8, 1 mM EDTA, 3 M GdmCl) mit variierenden Konzentrationen an Thioloxygenasen in 0,1 M K-Phosphat, pH 6,4-7,8 initiiert. Die Endkonzentration an IF_{SHSH} betrug 1 μM, die der Faltungshelfer variierte zwischen 1 und 8 μM.

2.15.7 Rückfaltung von scRNase T1 S54G P55N

Mit fehlverbrückter (*scrambled*, *sc*) RNase T1 S54G P55N (siehe 2.12.4) als Substrat wurde getestet ob diverse Faltungshelfer auch Disulfidisomeraseaktivität besitzen. Der Messparameter des Tests ist die Reaktivierung von scRNase T1 S54G P55N, die in fehlverbrückter Form nur 1 % der Aktivität des nativen Proteins zeigt. Die Aktivität von RNase T1 wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei Hydrolyse des chemisch synthetisierten Oligonukleotids Cy5-(dA)₄-rG-(dA)₄-Alexa488 (Dr. Tobias Aumüller, Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Prof. Dr. G. Fischer) bestimmt. Der Disulfidisomerase-Test wurde in einer diskontinuierlichen Versuchsanordnung durchgeführt, d.h. die Isomerisierung von scRNase T1 S54G P55N und der Aktivitätstest nach bestimmten Inkubationszeiten mit Faltungshelfern liefen in getrennten Reaktionsgefäßen ab.

Für den Isomerisierungsansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 2 ml 1 μM des zu testenden Faltungshelfers in 50 mM Tris/HCl, pH^{15°C} 8,0, 0,1 M KCl, 5 mM GSH und 5 mM GSSG 15 min lang bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 μl Stammlösung von scRNase T1 S54G P55N (100 μM in 50 mM Tris/HCl, pH^{15°C} 8,0, 0,1 M KCl) gestartet. In bestimmten Zeitintervallen wurden Proben aus diesem Reaktionsansatz gezogen und die RNase T1 Aktivität anhand der Hydrolyse der Oligonukleotide bestimmt. Die Aktivitätsmessung erfolgte nach 20facher Verdünnung des Isomerisierungsansatzes in 50 mM Essigsäure, pH 5,0 mit 10 nM Oligonukleotiden bei 25 °C. Die Fluoreszenz wurde nach Anregung bei 488 nm bei 517 nm detektiert. Die Geschwindigkeit des Substratumsatzes wurde bestimmt, indem an die Datenpunkte monoexponentielle Funktionen angeglichen wurden (2.15.3) und so die Reaktionsrate ermittelt wurde. Die Geschwindigkeit des Substratumsatzes als Funktion der Inkubationsdauer des Rückfaltungstests ist ein Maß für die Aktivität der Disulfidisomerase

2.16 Test auf Chaperonaktivität

Reaktionspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH^{15 °C} 7,5, 1 mM EDTA
Citratsynthase: 30 µM in 50 mM Tris/HCl, pH^{15 °C} 7,5, 20 mM DTE, 6,0 M GdmCl

Die Chaperoneigenschaften der verschiedenen Faltungshelfer wurden mit Hilfe des Citratsynthasetests untersucht ⁷⁸. Chemisch-denaturierte Citratsynthase neigt bei einer Verdünnung in 100 mM Tris/HCl zur Aggregation. Diese Aggregation wurde in An- und Abwesenheit der Faltungshelfer über die Zunahme der Streulichtintensität bei 360 nm an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer verfolgt, die Bandbreite betrug bei Anregung und Emission 1,5 nm. Der zeitliche Verlauf der Streulichtintensität wurde in Fluoreszenzrührküvetten 100 s lang gemessen. Die Dämpfung betrug 0,5 s. Die Aggregation der Citratsynthase wurde durch 200-fache Verdünnung in 100 mM Tris/HCl, pH^{15 °C} 7,5 in Abwesenheit bzw. Anwesenheit mikromolarer Faltungshelferkonzentrationen induziert. Die Konzentration an Citratsynthase betrug jeweils 0,15 µM in Endbedingungen von 100 mM Tris/HCl, pH^{15 °C} 7,5, 30 mM Guanidiniumchlorid, 0,1 mM DTE und variierender Konzentrationen der Faltungshelfer. Die Auswertung des Citratsynthasetests erfolgte qualitativ.

2.17 Kristallisation, Datensammlung und Strukturaufklärung

Zur Ermittlung geeigneter Kristallisationsbedingungen wurden für jedes zu kristallisierende Protein folgende kommerziell erhältlichen Lösungssammlungen getestet: *Index-Screen* (Hampton Research, Laguna Niguel, USA), *PEG/Ionen-Screen I, II* (Hampton Research, Laguna Niguel, USA), *Precipitant Synergy Screen* (Emerald BioSystems, Bainbridge Island, USA) und *Wizard random sparse matrix crystallization screen I-III* (Emerald BioSystems, Bainbridge Island USA). Bei der Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen wurde jeweils mit einer hohen und einer niedrigen Proteinkonzentration im Konzentrationsbereich von 8 bis 37 mg/ml gearbeitet. Die Ansätze erfolgten im Dampfdiffusionsverfahren nach der *sitting drop* Methode in Pipettierplatten mit je 96 Vertiefungen, wobei in jeder Kristallisationsvertiefung 1 µl Proteinlösung in 0,05 M Tris/HCl, pH^{15 °C} 7,0 mit je einem 1 µl Pufferlösung gemischt wurde. Das Volumen des Pufferreservoirs betrug je 80 µl.

Geeignete Kristallisationsbedingungen wurden anschließend ebenfalls im Dampfdiffusionsverfahren in der *hanging drop* Methode durch Variation der Proteinbedingungen, der Salzkonzentration, der Präzipitanskonzentration oder durch Zugabe von Kryoprotektantien optimiert. Die Optimierung der Kristallisationsansätze erfolgte in Gewebekulturschalen mit 24 Vertiefungen (16 mm Innendurchmesser). Die Vertiefungen wurden mit runden Deckgläsern (18 mm Durchmesser) verschlossen, wobei der obere Rand der Vertiefung der Gewebe-Kulturschalen vor Abdeckung mit den Deckgläsern mit viskosem Silikonöl eingefettet wurde. Es wurden je 2 µl Proteinlösung in 0,05 M Tris/HCl, pH^{15 °C} 7,0, mit je 2 µl Pufferlösung gemischt, das Volumen des Pufferreservoirs betrug 500 µl. Die Kristallisation erfolgte bei 15 °C. Die finalen Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 2-2 angegeben. Proteinkristalle wurden im Kristallisationspuffer plus 15 % Kryoprotektans (MPD) in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Röntgenkristallographischen Daten wurden an der Strahlanlage BL14.2 (BESSY, Berlin, Germany) aufgenommen. Die Daten wurden mit dem Programmpaket XDS prozessiert und skaliert, anschließend wurden das Phasenproblem mittels *molecular replacement* gelöst und die Struktur in iterativen Zyklen von Modellbau und Verfeinerungsrechnung durch die Programme Coot ⁷⁰ und PHENIX ⁷¹ vervollständigt.

Tabelle 2-2: Auflistung der kristallisierten Proteine und die zur Kristallisation verwendeten Proteinkonzentrationen sowie die finalen Kristallisationsbedingungen.

Protein	Konzentration (mg/ml)	Kristallisationsbedingungen
IF1 N1 (PDB-Eintrag 2X9A)	18 mg/ml	0,1 M CaCl ₂ , 0,1 M Imidazol pH 6,5, 5 % MPD, 3 M NaCl
Komplex IF1 N1/TolA-C (PDB-Eintrag 2X9B)	8 mg/ml	0,1 M Na-Citrate pH 4,5, 5 % MPD, 20 % PEG3350
DsbC-sc-17*	20 mg/ml	0,2 M MgCl ₂ , 0.1 M Tris/HCl, pH ^{15°C} 8,5, 20 % PEG8000
yMia40	33 mg/ml	0,55 M MgCl ₂ , 0,1 M Na-Cacodylat, pH 6,5, PEG3350

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Das Gen-3-Protein des filamentösen Phagen IF1: Faltungsmechanismus und Bedeutung für die Infektion von *E. coli*

Die filamentösen Phagen der Stämme fd und IF1 gehören innerhalb der Familie der *Inoviridae* zur Gattung der *Inoviren*, die gramnegative Bakterien als Wirt nutzen. Viren dieser Gattung besitzen einen ähnlichen Aufbau und Replikationszyklus. Aufgrund der engen Verwandtschaft weisen die homologen Proteine dieser Phagenstämme eine hohe Sequenzidentität auf. Die Aminosäuresequenzen der Hüllproteine G6P, G7P, G8P und G9P der beiden Phagen sind bis zu 80 % identisch (Tabelle 9-1). Auch die Aminosäuresequenzen der homologen G1P und G4P, die für die Assemblierung und Freisetzung der Phagenpartikel aus den Bakterien notwendig sind, sind zu 64 bzw. 52 % identisch. Abweichend von dieser generell hohen Ähnlichkeit zeigen lediglich G2P und G5P, die beide mit der Phagen DNA wechselwirken, jeweils nur geringe Verwandtschaften (Sequenzidentität 14 bzw. 10 %).

Das G3P ist bei beiden Phagen essentiell für die Infektion von *E. coli* Zellen. Die Ähnlichkeit der Domänen innerhalb von G3P der Phagen IF1 und fd korreliert mit der Funktion der Domänen: Sowohl die C-terminalen Domänen, die das G3P in der Phagenhülle verankern, als auch die N1 Domänen, die an den bakteriellen Oberflächenrezeptor TolA-C binden, sind einander ähnlich (Sequenzidentität von 40 bzw. 31 %). Die N2 Domänen haben unterschiedliche Bindungspartner. Die N2 Domäne des Phagen fd bindet an den F Pilus, die des Phagen IF1 an den I Pilus. Den unterschiedlichen Bindungspartnern folgend, zeigen die Aminosäuresequenzen auch keine Verwandtschaft (Sequenzidentität unter 10 %).

Im G3P des Phagen fd wechselwirken die beiden N-terminalen Domänen miteinander, wobei die Interaktion durch eine Gelenkdomäne vermittelt wird. Im Verlauf der Infektion wird die Domäneninteraktion durch die Bindung von N2 an den F-Pilus aufgelöst, wodurch die Bindungsstelle für den terminalen Rezeptor TolA-C auf der Oberfläche von N1 zugänglich wird. Die Rückfaltung dieser offenen infektiösen Konformation in die geschlossene Form wird durch die langsame *trans*-nach-*cis* Isomerisierung von Pro213 in der Gelenkregion kontrolliert (siehe 1.2). Der Sequenzvergleich des N-terminalen Fragments von fd G3P und IF1 G3P liefert keinen Hinweis auf eine Domäneninteraktion in IF1; in IF1 G3P scheint eine dem fd G3P homologe Gelenkregion zu fehlen und N1 und N2 lediglich über einen aus 20 Aminosäuren bestehenden Linker verbunden zu sein (siehe Abbildung 3-1). Die Domänenorganisation und Proteinfaltung des aus den beiden N-terminalen Domänen bestehenden Fragmentes von IF1 G3P (im Folgenden IF1 G3P*) wurde mittels thermodynamischer und kinetischen Untersuchungen analysiert.

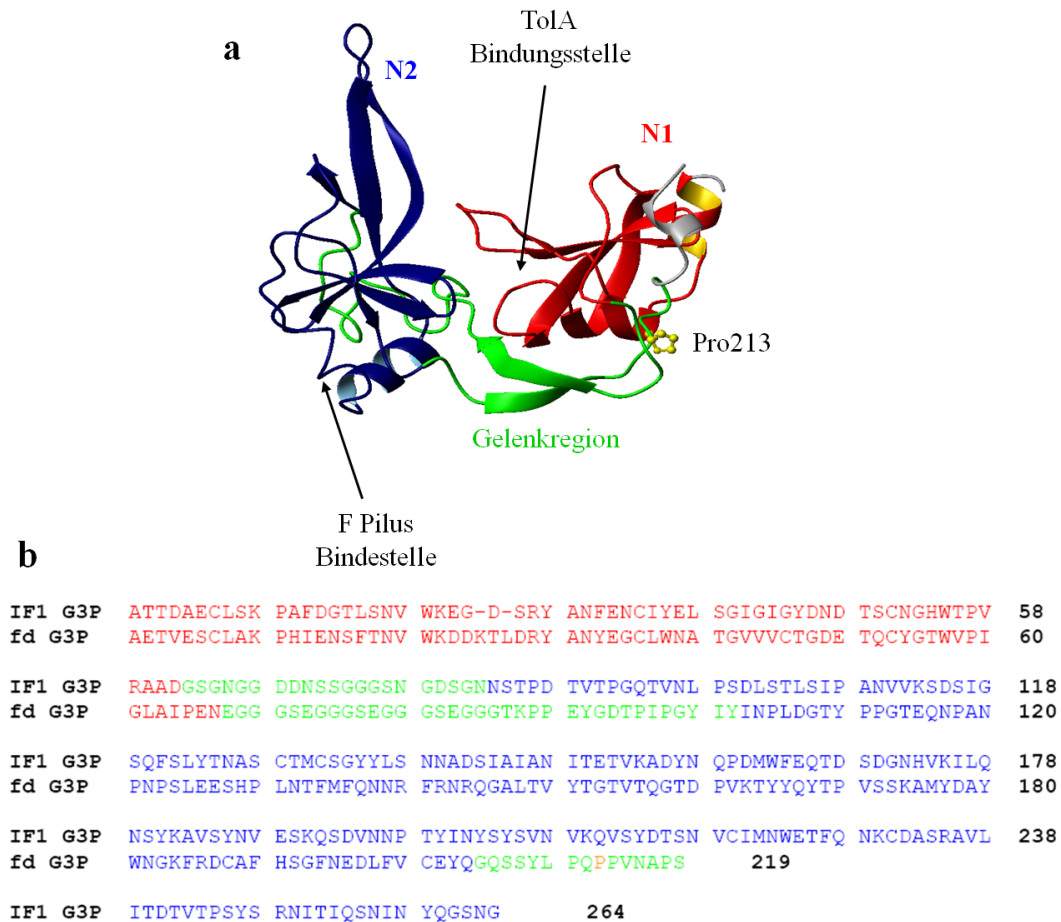


Abbildung 3-1: Tertiärstruktur von fd G3P* und Aminosäuresequenzvergleich von fd und IF1 G3P*. (a) In der Bänderdarstellung von G3P* ist die N1 Domäne in rot, der globuläre Teil der N2 Domäne in blau und die Gelenksubdomäne in grün dargestellt. Die Aminosäure Pro213 ist im Stäbchenmodell dargestellt. Die Abbildung basiert auf der Kristallstruktur von Holliger *et al.* (PDB-Eintrag: 2G3P) und wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific, 2006) erstellt.

(b) Aminosäuresequenzvergleich von fd G3P* und IF1 G3P*. Die Aminosäuren von N1 sind rot, die Verbindung zwischen N1 und N2 grün und N2 blau dargestellt.

3.1.1 Die Domänen des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen IF1 sind eigenständige Faltungseinheiten

3.1.1.1 N1 und N2 zeigen die gleiche thermodynamische Stabilität im Zweidomänenprotein IF1 G3P* und als isolierte Domänen

Im vollständig gefalteten fd G3P* interagieren N1 und N2 miteinander und stabilisieren sich so gegenseitig. Dies ist vor allem für die N2 Domäne von Bedeutung, da sie in Abwesenheit der N1 Domäne nur eine marginale Stabilität besitzt⁷⁹. Um zu untersuchen, ob eine derartige günstige Interaktion der Domänen auch im IF1 G3P* besteht, wurden IF1 G3P* (Aminosäuren 1-264, siehe Abbildung 3-1b), sowie die isolierte N1 (Aminosäuren 1-65) und N2 (Aminosäuren 84-264) Domäne exprimiert und gereinigt. Alle drei Proteine liegen gefaltet vor und zeigen eine kooperative Entfaltung. Die thermische Entfaltung isolierter N1 und N2

Domäne wurde anhand der Änderung des CD Signals bei 222 nm beobachtet. Bei dieser Wellenlänge kann die Abnahme der Helizität im Verlauf der Entfaltung verfolgt werden.

Im Zweidomänenprotein IF1 G3P* konnte die Entfaltung von N1 und N2 selektiv anhand des CD-Signals bei 230 bzw. 222 nm verfolgt werden. Aufgrund der Größe und des helikalen Anteils von N2 im Gesamtprotein wird bei der Entfaltung von IF1 G3P* nur der Übergang von N2 bei 222 nm beobachtet. N1 besitzt einen höheren T_M (67 °C) als N2 (53 °C), jedoch eine niedrigere Kooperativität der Entfaltung ($\Delta H_{vH} = 232 \text{ kJ mol}^{-1}$ vs. 548 kJ mol^{-1}). Dies spiegelt den Unterschied in der Größe zwischen N1 (65 Aminosäuren) und N2 (181 Aminosäuren) wider. Die Auswertung der Übergangskurven zeigt, dass die T_M - und die ΔH_{vH} -Werte der einzelnen Domänen nicht durch die Anwesenheit der jeweils anderen Domäne beeinflusst sind (siehe Abbildung 3-2, Tabelle 9-2).

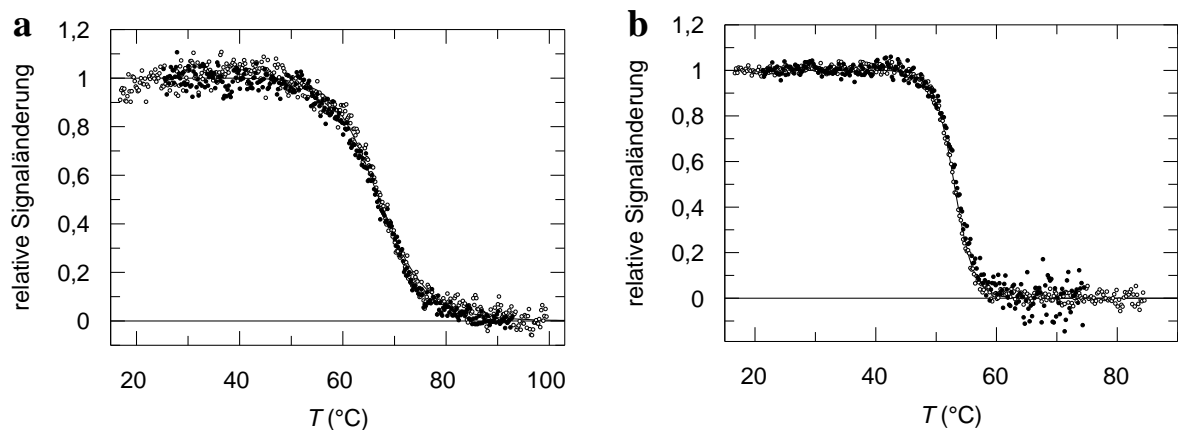


Abbildung 3-2: Thermische Entfaltung von IF1 G3P* und den isolierten Domänen N1 und N2. (a) Überlagerung der thermischen Entfaltungskurven der isolierten N1 Domäne (○) und von N1 innerhalb von IF1 G3P* (●). Aufgetragen ist die relative Änderung des CD-Signals bei 222 nm bzw. 230 nm gegen die Temperatur nach Auswertung nach einem Zweizustandsmodell. (b) Überlagerung der thermischen Entfaltungskurven der isolierten N2 Domäne (○) und von N2 innerhalb von IF1 G3P* (●). Aufgetragen ist die relative Änderung des CD-Signals bei 222 nm bzw. 230 nm gegen die Temperatur nach Auswertung nach einem Zweizustandsmodell. Die Übergänge wurden mit $4 \mu\text{M}$ Protein in $0,1 \text{ M}$ K-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Dämpfung von 8 s gemessen. Die aus der Analyse erhaltenen T_M -Werte sowie die thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 9-2 aufgeführt.

Im Gegensatz zur N2 Domäne des Phagen IF1 besitzt die isolierte N2 Domäne des Phagen fd nur eine geringe Stabilität. Obwohl die untersuchte N2 Domäne von einem bereits stabilisierten fd G3P* stammt, zeigt sie einen T_M von nur 38 °C und eine Entfaltungsenthalpie (ΔH_{vH}) von 310 kJ mol^{-1} . In fd G3P* wird N2 durch die Interaktion mit N1 stark stabilisiert und der T_M steigt auf 61 °C . Die Enthalpie der Entfaltung erhöht sich deutlich auf 640 kJ mol^{-1} . Der Grund dafür ist die Kopplung der Entfaltung von N2 an die Domänendissoziation und die Entfaltung der Gelenkregion, wodurch die kooperative Faltungseinheit vergrößert ist. Sowohl die isolierte fd N1 als auch N1 im Zweidomänenprotein haben ihren Übergangsmittelpunkt bei 67 °C . Die N2 Domäne in fd

G3P* ist bei dieser Temperatur bereits entfaltet und folglich sind stabilisierende Interaktionen bereits aufgelöst, wenn N1 entfaltet^{79, 80}.

Die Stabilität von IF G3P* und von dessen isolierten Domänen wurde auch gegenüber dem Denaturierungsmittel GdmCl ermittelt (Abbildung 3-3). Die Entfaltungskurve von IF G3P* ist zweiphasig mit Übergangsmittelpunkten von 1,42 und 3,6 M GdmCl und m -Werten von 8,6 bzw. 19,4 kJ mol⁻¹ M⁻¹. Für die isolierten Domänen wurden aus der Analyse der Entfaltungskurven gemäß einem Zweizustandsmodell dieselben Parameter erhalten (siehe Tabelle 9-2).

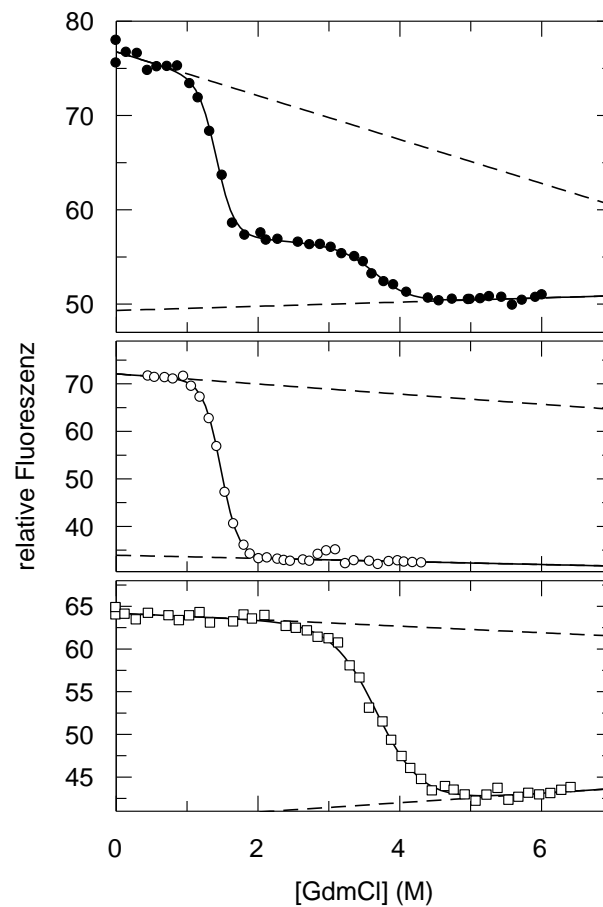


Abbildung 3-3: GdmCl-induzierte Gleichgewichtsentfaltung von IF1 G3P* und den isolierten Domänen bei 25 °C. Es ist die relative Fluoreszenz von IF1 G3P* bei 340 nm (●), der isolierten N2 Domäne bei 360 nm (○) und der isolierten N1 Domäne bei 325 nm (□) jeweils nach Anregung bei 280 nm als Funktion der GdmCl Konzentration dargestellt. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich der Daten an ein Dreizustandsmodell bei IF1 G3P* und an ein Zweizustandsmodell bei den isolierten Domänen. Die durchbrochenen Linien zeigen die Basislinien für die nativen und entfalteten Proteine. Die Proteinkonzentrationen betragen jeweils 0,5 µM in 0,1 M K-Phosphat (pH 7,0).

Die Analyse der thermischen sowie der GdmCl-induzierten Entfaltungsübergänge zeigt, dass die isolierten Domänen die gleiche thermodynamische Stabilität besitzen wie im Zweidomänenprotein IF1 G3P*. Die Entfaltungsübergänge der Proteine liefern somit keinen Hinweis auf eine Domäneninteraktion in IF1 G3P*.

3.1.1.2 Die N1 und N2 Domäne in IF1 G3P* sind in ihren Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken voneinander unabhängig

Die Rückfaltungs- und Entfaltungskinetiken des Zweidomänenproteins G3P bieten einen sensitiven Test auf eventuell vorhandene Domäneninteraktionen: Während der Entfaltung müssen diese Interaktionen erst gelöst werden, bevor die einzelnen Domänen entfalten können. Um in den nativen Zustand rückzufalten, müssen die Interaktionen während oder nach der konformationellen Faltung der einzelnen Domänen ausgebildet werden. Tatsächlich ist die Entfaltung der N1 Domäne in fd G3P* durch deren Interaktion mit der Gelenkregion mehr als 2000fach verlangsamt (von 28 ms auf 71 s). Analog folgt auf die konformationelle Faltung der einzelnen Domänen noch ein langsamer Faltungsschritt, der die Domänenassoziation darstellt¹⁸.

Es wurden die Kinetiken der Entfaltung und der Rückfaltung für die isolierten Domänen N1 und N2, sowie für das Zweidomänenprotein IF1 G3P* gemessen. In Abbildung 3-4 sind exemplarisch die Rückfaltungsreaktionen von N1 und N2 in 0,6 M GdmCl sowie deren Entfaltungsreaktionen in 6 M GdmCl dargestellt. Die apparenten Faltungsraten der isolierten Domänen und von IF1 G3P* sind als Funktion der GdmCl Konzentration in Form einer Chevronauftragung in Abbildung 3-5 gezeigt. Die N1 Domäne faltet und entfaltet bei allen GdmCl Konzentrationen sehr schnell und die apparenten Faltungsraten sind unabhängig von der Anwesenheit der N2 Domäne. N2 faltet und entfaltet etwas langsamer und die Rückfaltungsraten zeigen einen biphasischen Reaktionsverlauf unterhalb von 1 M GdmCl. Auch bei N2 sind die Faltungsreaktionen und Rückfaltungsreaktionen unabhängig davon, ob N2 isoliert oder als Teil von IF1 G3P* vorliegt (siehe Abbildung 3-5).

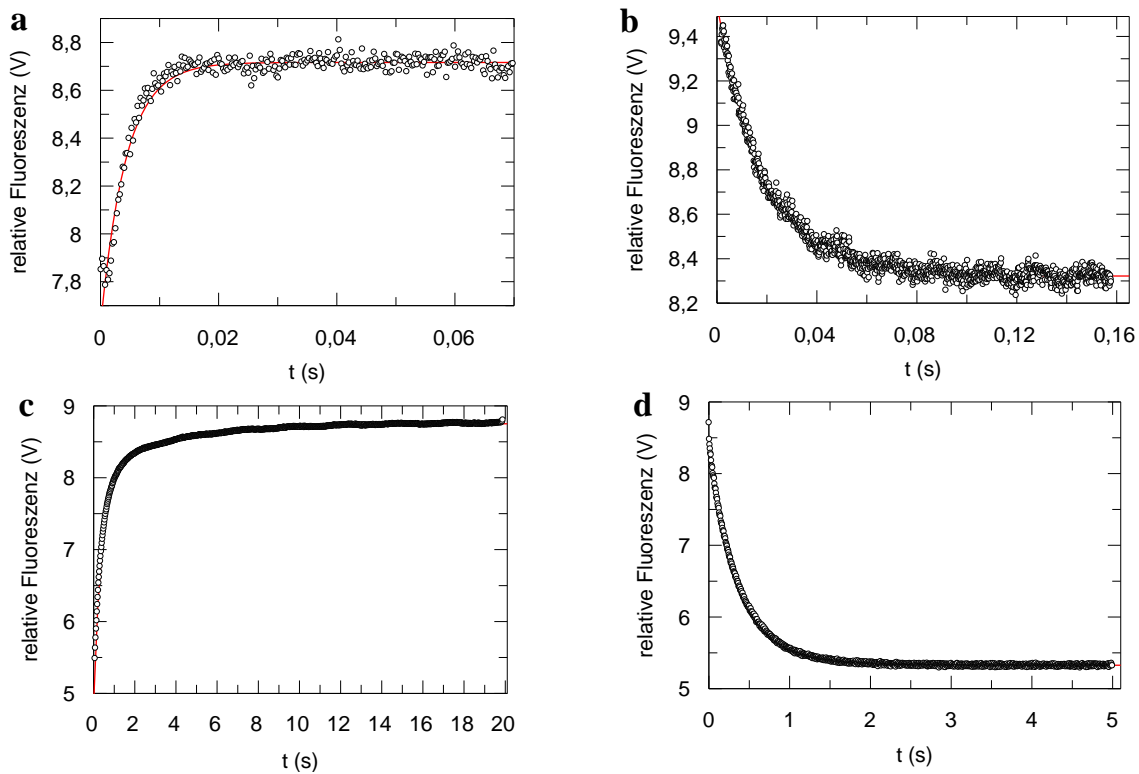


Abbildung 3-4: Rückfaltungskinetik in 0,6 M GdmCl (a, c) und Entfaltungskinetik (b, d) in 6 M GdmCl der isolierten N1 (a, b) und N2 Domäne (c, d). Die durchgezogenen Linien repräsentieren in (a), (b) und (d) den Angleich einer monoexponentiellen Funktion an die experimentellen Datenpunkte mit Zeitkonstanten τ von 0,02 s, 0,004 s und 0,37 s. In (c) folgen die experimentellen Daten einem biexponentiellen Reaktionsverlauf mit den Zeitkonstanten τ von 2 und 0,2 s. Die Faltungsreaktionen wurden an einer *stopped-flow* Apparatur anhand der integralen Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Die Proteinkonzentration bei allen Messungen betrug 0,5 μ M in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0.

Die Auswertung der Chevronauftragungen im Bereich von 0 bis 6 M GdmCl gemäß einem Zweizustandsmodell bestätigt die Schlussfolgerung, dass die beiden Domänen in IF1 G3P* unabhängige Faltungseinheiten darstellen, deren Faltungsreaktionen sich gegenseitig nicht beeinflussen (siehe Tabelle 3-1, Abbildung 3-5). Es wurden unter keinen Bedingungen zusätzliche Faltungsreaktionen detektiert, die eine Domänenassoziation oder Domänen dissoziation im Zweidomänenprotein IF1 G3P* widerspiegeln könnten. Die thermodynamischen Stabilitäten und die Faltungsreaktionen zeigen, dass sich N1 und N2 in IF1 G3P unabhängig wie Perlen an einer Schnur verhalten.

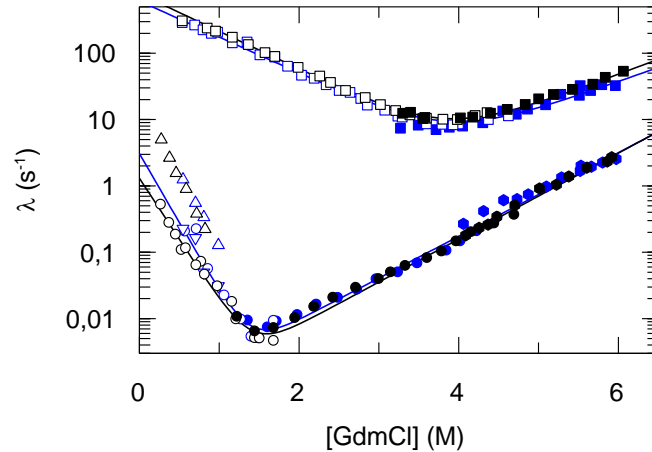


Abbildung 3-5: Es sind die apparenten Entfaltungsraten (ausgefüllte Symbole) und Rückfaltungsraten (offene Symbole) der isolierten N1 (\square , \blacksquare) und N2 Domäne (Δ , \circ , \bullet) und der N1 (\square , \blacksquare) und N2 (Δ , \circ , \bullet) Domäne im Zweidomänenprotein IF1 G3P* als Funktion der GdmCl Konzentration dargestellt. Die langsamen Faltungskinetiken der N2 Domäne wurden nach zehnfacher Verdünnung in Handmischexperimenten anhand der Fluoreszenzänderung bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Schnelle Faltungskinetiken der N2 Domäne (apparente Faltungsraten größer als $0,1 \text{ s}^{-1}$) und die Faltungsreaktionen der N1 Domäne wurden anhand der integralen Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm in *stopped flow* Experimenten gemessen. Die durchgezogenen Linien (schwarz: isolierte Domänen, blau: Domänen in IF1 G3P*) entsprechen einem Angleich an die experimentellen Daten gemäß einem Zweizustandsmodell. Die aus dem Angleich erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3-1 aufgelistet. Die Proteinendkonzentrationen bei allen Messungen betrug $0,5 \mu\text{M}$ in $0,1 \text{ M}$ K-Phosphat, pH 7,0.

Tabelle 3-1: Parameter aus der Analyse der Chevrouauftragung der isolierten Domänen N1 und N2 sowie des Zweidomänenproteins IF1 G3P*

	k_{UN} (s^{-1})	k_{NU} (s^{-1})	m_{UN} (M^{-1})	m_{NU} (M^{-1})	m ($\text{kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	$[\text{GdmCl}]_{\text{M}}$ (M)	$\Delta G_{\text{D}}^{25^\circ\text{C}}$ (kJ mol^{-1})
<u>Domänen in IF1 G3P*</u>							
N1	613,4	0,10610	-1,25	0,98	5,5	3,9	21,5
N2	3,07	0,00053	-4,79	1,45	15,5	1,4	21,5
<u>isolierte Domänen</u>							
N1	791,2	0,09867	-1,31	1,03	5,8	3,8	22,3
N2	1,31	0,00041	-4,24	1,49	14,2	1,4	20,0

Die kinetischen Daten wurden durch Fluoreszenzmessung in *stopped-flow*- und Handmisch-Experimenten bestimmt. Angegeben sind die extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung k_{UN} und der Entfaltung k_{NU} , sowie die kinetischen m -Werte der Rückfaltung m_{UN} und der Entfaltung m_{NU} . Am Übergangsmittelpunkt sind die Ent- und Rückfaltungsraten identisch ($[\text{GdmCl}]_{\text{M}} = \ln(k_{\text{NU}}/k_{\text{UN}})/(m_{\text{UN}} - m_{\text{NU}})$). Der Kooperativitätsparameter m wird aus den kinetischen m -Werten berechnet ($m = R T (m_{\text{NU}} - m_{\text{UN}})$). Die freie Enthalpie der Entfaltung $\Delta G_{\text{D}}^{25^\circ\text{C}}$ berechnet sich aus den extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten ($\Delta G_{\text{D}}^{25^\circ\text{C}} = -R T \ln(k_{\text{NU}}/k_{\text{UN}})$). Die Daten wurden gemäß einem Zweizustandsmodell ausgewertet.

3.1.2 Die N1 Domäne des G3P des filamentösen Phagen IF1 bindet an den Oberflächenrezeptor TolA-C

3.1.2.1 Die Bindungsstelle von N1 in IF1 G3P* für den Phagenrezeptor TolA-C ist vollständig zugänglich

Im vollständig gefalteten Zweidomänenprotein fd G3P* wird die Bindungsstelle für den terminalen Rezeptor TolA-C durch die Assoziation der Domänen blockiert. Natives fd G3P* kann deshalb kein TolA-C binden, obwohl die isolierte N1 Domäne eine hohe Affinität für TolA-C zeigt^{12, 80}. Trotz einer Sequenzidentität von nur 31 % zur N1 Domäne von fd interagiert auch die N1 Domäne von IF1 mit TolA-C. Um die Affinität von N1 zu TolA-C quantifizieren zu können, wurde TolA-C mit dem Fluoreszenzfarbstoff AEDANS markiert. Der Reaktionsverlauf der Komplexbildung wurde anhand des Energieübertrags der endogenen Tryptophanreste von N1 auf TolA-C_AEDANS während der Bindung verfolgt (Abbildung 3-6). N1 im Zweidomänenprotein IF G3P* und die isolierte N1 Domäne binden TolA-C mit nahezu derselben Kinetik und derselben Affinität. Die Analyse der Bindungskinetiken unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung (Abbildung 3-6b) liefert die mikroskopischen Raten der Assoziation und Dissoziation, sowie die Dissoziationskonstante K_D aus dem Quotienten der mikroskopischen Raten. Die Dissoziationskonstante K_D kann zudem auch aus der Abhängigkeit der Reaktionsamplituden der Komplexbildung von der N1 Konzentration berechnet werden (Abbildung 3-6c).

Die mikroskopische Rate der Assoziation k_{on} ist durch die Gegenwart der N2 Domäne in IF1 G3P* nur leicht verringert (von $0,24 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf $0,15 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und die Dissoziationskonstante K_D steigt geringfügig von $4,4$ auf $7,0 \mu\text{M}$. Der Vergleich dieser Werte zeigt, dass die Bindungsstelle auf N1 in IF1 G3P* für den sekundären Rezeptor TolA-C zugänglich ist und zudem die Bindung von TolA-C an N1 durch die N2 Domäne nicht gestört wird. Die Bindungsstelle von TolA-C ist nicht wie bei fd G3P* in der Interaktionsfläche zwischen N1 und N2 verborgen und demzufolge benötigt der Phage IF1 auch keine zusätzliche Aktivierung seines IF G3P*.

Die K_D -Werte aus der Analyse der Amplituden ($4,4$ und $7,1 \mu\text{M}$, siehe Abbildung 3-6c) und aus der Analyse der kinetischen Daten ($3,3$ und $7,0 \mu\text{M}$, siehe Abbildung 3-6b) sind miteinander konsistent. Im Vergleich zur isolierten N1 Domäne von fd G3P* (K_D -Wert $0,5 \mu\text{M}$ ¹²) besitzt die N1 Domäne von IF1 jedoch eine zehnfach niedrigere Affinität für TolA-C. Vermutlich ist eine niedrigere Affinität von IF1 N1 ausreichend, da die Bindungsstelle in IF1 G3P* permanent zugänglich ist. In fd G3P* dagegen muss die Bindung an TolA-C gegen die intramolekulare Interaktion zwischen der N1 und N2 Domäne konkurrieren, die vermutlich auch nach der Domänenöffnung und der Pro213 *cis*-nach-*trans* Isomerisierung nicht vollständig aufgehoben ist.

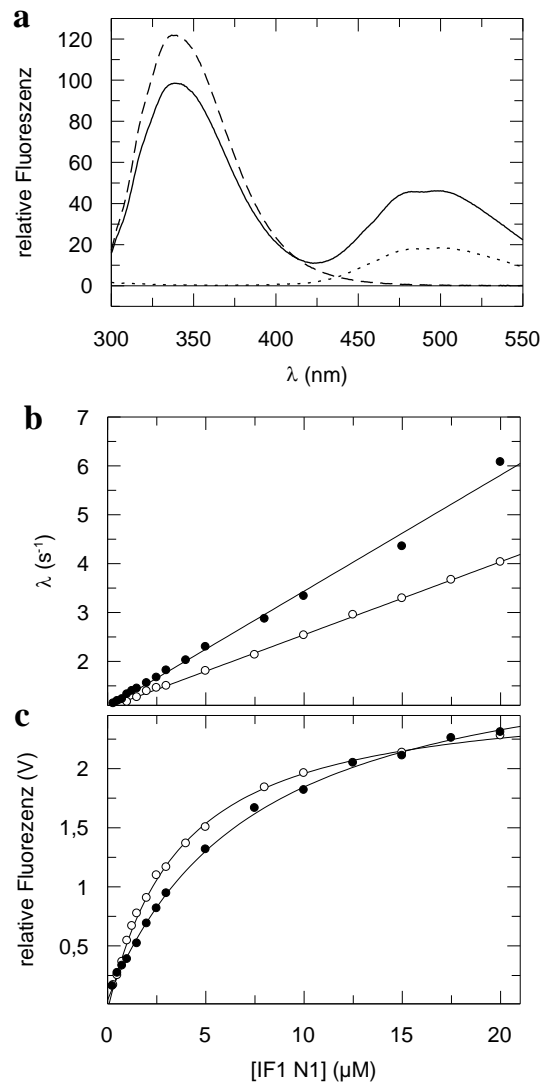


Abbildung 3-6: (a) Fluoreszenzänderung von TolA-C_AEDANS bei Bindung der N1-Domäne. Dargestellt sind die Fluoreszenzemissionsspektren von 5 μM TolA-C_AEDANS (-----), 5 μM isolierter Domäne IF1 N1 (----) bzw. des Komplexes von 5 μM TolA-C_AEDANS mit 5 μM IF1 N1 (—). Die Messungen wurden in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C und einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Alle Spektren wurden um die Pufferfluoreszenz korrigiert.

(b) Apparente Raten der Assoziation von TolA-C_AEDANS mit N1 bzw. N1 in IF1 G3P*. Die Reaktion von 0,5 μM TolA-C-AEDANS mit variierenden Konzentrationen wurde anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz in *stopped-flow* Mischexperimenten verfolgt. Abhängigkeit der apparenten Assoziationsrate von der Konzentration an N1 ((●) isolierte N1, (○) N1 in IF1 G3P*). Die Daten wurden nach einem einfachen Zweischritt-Bindungsmechanismus ausgewertet (durchgezogene Linie). Die Analyse lieferte Werte für k_{on} von 0,24 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die isolierte und von 0,15 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für N1 in IF1 G3P* und für k_{off} von 1,06 s⁻¹ bzw. von 1,05 s⁻¹. Aus den Quotienten der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten ergeben sich Dissoziationskonstanten K_{D} von 4,4 μM für die isolierte N1 Domäne und von 7,1 μM für N1 in IF1 G3P*.

(c) Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzamplituden von der Konzentration an N1 ((●) isolierte N1, (○) N1 in IF1 G3P*). Die Linie zeigt einen Angleich eines einfachen Zweischritt-Bindungsmechanismus an die Messpunkte mit einer Dissoziationskonstante $K_{\text{D}} = 3,3$ bzw. 7,0 μM . Die Reaktionen wurden anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 460 nm nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 10 nm) verfolgt. Alle Experimente wurden in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei 25 °C durchgeführt.

3.1.2.2 Die N1 Domänen von IF1 G3P* und fd G3P* binden an die gleiche Stelle auf TolA-C

Um die molekularen Ursachen der niedrigeren Affinität von IF1 N1 für TolA-C herauszufinden, wurde die isolierte N1 Domäne des Phagen IF1 und der Komplex aus N1 und TolA-C von mir kristallisiert und die Strukturen mit einer Auflösung von 2,9 bzw. 2,5 Å in einer Kooperation mit Dr. R. P. Jakob (ETH Zürich, AG Prof. N. Ban) gelöst (Datenstatistik siehe Tabelle 9-3). Für die isolierte N1 Domäne des Phagen fd ist keine Kristallstruktur verfügbar, jedoch für N1 als Teil von fd G3P*. Für den Komplex aus fd N1 und TolA-C wurde ein Modell generiert, indem beide Proteine durch eine 18 Aminosäure-lange Verknüpfung fusioniert wurden. Die Struktur dieses Moleküls wurde mit einer Auflösung von 1,8 Å gelöst¹⁵.

Abbildung 3-7a zeigt die Rückgrat-Darstellung der Kristallstruktur der isolierten N1 Domäne des Phagen IF1. Die Struktur des Komplexes aus IF1 N1 und TolA-C ist in Abbildung 3-7b dargestellt. Die Überlagerung der Strukturen der freien IF1 N1 Domäne und von N1 im Komplex mit TolA-C (Abbildung 3-7c) zeigt, dass keine konformationelle Änderung in N1 durch die Bindung an TolA-C stattfindet. Die Standardabweichung der C_α-Atome zwischen freier N1 und N1 im Komplex beträgt lediglich 0,5 Å.

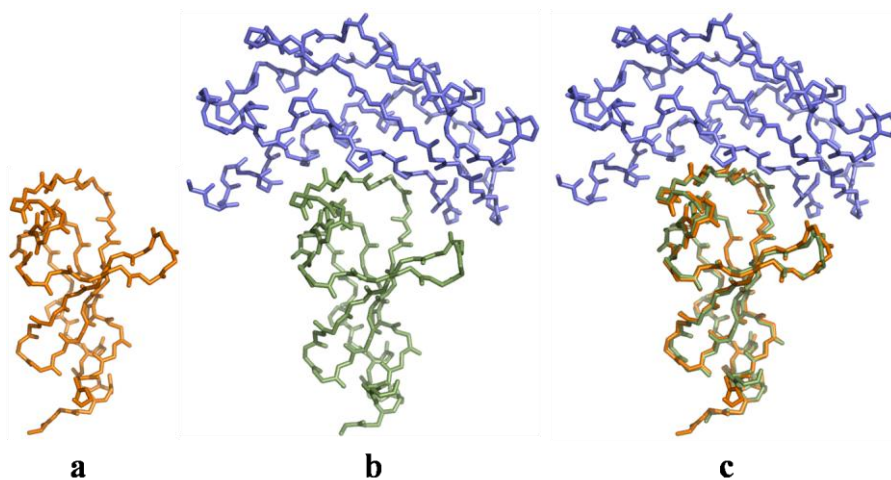


Abbildung 3-7: Rückgrat-Darstellung der Kristallstruktur der isolierten N1 Domäne des Phagen IF1 ((a), PDB Eintrag 2X9B) und des Komplexes mit TolA-C ((b), PDB Eintrag 2X9A). (c) Überlagerung der Kristallstrukturen aus (a) und (b). Die isolierte N1 ist orange, N1 im Komplex oliv und TolA-C blau eingefärbt. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific, 2006) erstellt.

Abbildung 3-8 zeigt eine Überlagerung der von uns gelösten Komplexstruktur von TolA-C mit IF1 N1 und der von Lubkowski *et al*¹⁵ gelösten Struktur des Fusionsproteins aus TolA-C und fd N1. Beide Strukturen stimmen in Bereichen geordneter Sekundärstrukturelemente sehr gut überein und die Rückgratkonformation der TolA-C Domäne ist in beiden Komplexen nahezu identisch (Abbildung 3-8a, b). Auch in der N1

Domäne in beiden Komplexen sind in den geordneten Sekundärstrukturelementen kaum Unterschiede festzustellen. Lediglich im Bereich der Schleife, die in fd N1 zur Ausbildung von Kontakten mit der N2 Domäne in fd G3P* dient, ergeben sich Abweichungen (Abbildung 3-8a, rote Markierung). So ist die Schleife von Aminosäure 24-27 in IF1 N1 in fd N1 um zwei Aminosäuren (Asp24 und Lys25) erweitert, die mit der fd N2 Domäne in Wechselwirkung treten.

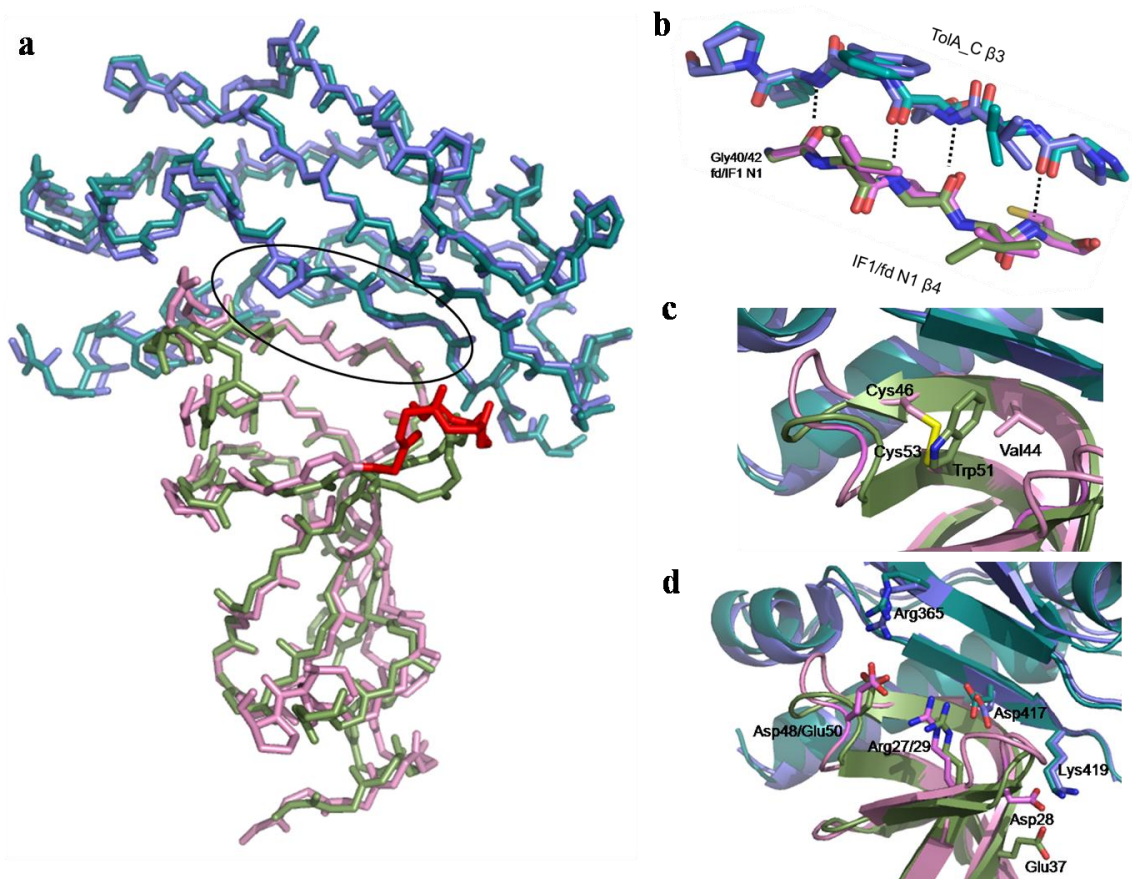


Abbildung 3-8: Vergleich der Komplexstrukturen von TolA-C mit fd N1 (PDB Eintrag 1TOL) bzw. mit IF1N1 (PDB Eintrag 2X9A). IF1 N1 ist in grün, das dazugehörige TolA-C Molekül in blau dargestellt. Die N1 Domäne von fd G3P* ist in rosa, deren Bindungspartner TolA-C in türkis gefärbt. a) Überlagerung des Rückgrats der Komplexstrukturen. In rot ist der Rückgratbereich der Aminosäuren 24 bis 27 in fd N1 markiert. Der durch das schwarze Oval gekennzeichnete Bereich ist in Abbildung (b) vergrößert dargestellt. b) Detaildarstellung des intermolekularen β -Faltblattes der beiden Komplexe. Der gezeigte Strukturausschnitt ist relativ zu Abbildung (a) vertikal um 90° gedreht. c) Ausschnitt aus der Überlagerung der Komplexstrukturen. Gezeigt ist der Bereich um die Disulfidbrücke, die die Cysteinreste 46 und 53 von fd N1 verbindet. d) Detaildarstellung der drei konservierten Salzbrücken, die in beiden Komplexen für die Stabilisierung der intermolekularen β -Faltblätter verantwortlich sind. In den Abbildungen (c) und (d) wurden die Sekundärstrukturelemente für eine bessere Anschaulichkeit in Bänderdarstellung gezeichnet. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific, 2006) erstellt.

Fd N1 besitzt gegenüber IF1 N1 eine zusätzliche Disulfidbrücke, die die Cysteinreste 46 und 53 miteinander verknüpft. Der Raum, den diese Disulfidbrücke in fd N1 einnimmt, ist in

IF1 N1 durch die Seitenkette von Trp51 ausgefüllt, das an äquivalenter Position zu Cys53 sitzt (siehe Abbildung 3-8c). Genügend Platz für die voluminöse Seitenkette von Trp51 ist vorhanden, da Cys46 und das benachbarte Val44 in IF1 N1 durch Glycine (Gly45, Gly43) ersetzt sind. Der Verlust der Disulfidbrücke in IF1 N1 wird durch einen abgestimmten Austausch von Aminosäuren kompensiert, so dass die thermodynamischen Stabilitäten von IF1 N1 und fd N1 (siehe 3.1.1.1) sehr ähnlich sind.

Die N1 Domänen der beiden Phagen nutzen homologe Bereiche ihrer Oberflächen um an die gleiche Stelle an TolA-C zu binden. Einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung des Komplexes stellen die intermolekularen Rückgratwechselwirkungen zwischen dem β -Faltblattstrang 4 von N1 und β -Faltblattstrang 3 von TolA-C dar. Dieses Bindungsmotiv ist zwischen den beiden Komplexen hoch konserviert (siehe Abbildung 3-8b). Dabei bilden die Aminosäuren 41 - 44 von IF1 N1 (entsprechend 43-46 von fd N1) vier Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren 417-419 von TolA-C aus. Durch diese Wechselwirkungen werden die Enden der jeweiligen intramolekularen β -Faltblätter von N1 und TolA-C zu einem durchgehenden intermolekularen β -Faltblatt verbunden. Dieses Faltblatt wird auf der einen Seite durch hydrophobe Wechselwirkungen von Ile41 und Ile43 von IF1 N1 mit hydrophoben Resten von TolA-C stabilisiert. Die entsprechenden Aminosäurereste von fd N1, Val43 und Val45, zeigen dieselbe Orientierung und interagieren mit den gleichen Resten von TolA-C. Die andere Seite des intermolekularen β -Faltblattes ist durch die Seitenketten von Trp51 und Leu38 in IF1 N1 bzw. durch die Cys47-Cys53 Disulfidbrücke in fd N1 abgeschirmt.

Zusätzlich tragen drei konservierte Salzbrücken zur Stabilisierung des Komplexes bei. Arg365 und Asp417 von TolA-C befinden sich in günstigem Abstand zu Asp48 bzw. Arg27 von IF1 N1 (Glu50 bzw. Arg29 von fd N1). Lys419 von TolA-C geht ebenfalls Coulombsche Wechselwirkungen ein, jedoch interessanterweise mit unterschiedlichen Aminosäuren, nämlich mit Glu37 von IF1 N1 aber mit Asp28 von fd N1 (Abbildung 3-8d).

Aminosäuren von N1, die im Komplex mit TolA-C wechselwirken, wurden mithilfe des Programms PISA⁸¹ identifiziert. Im Sequenzvergleich von fd N1 und IF1 N1 (Abbildung 3-9a) und in der Komplexstruktur von IF1 N1 mit TolA-C (Abbildung 3-9b) sind diese Aminosäuren grau markiert. Fd N1 und IF1 N1 besitzen zueinander eine Sequenzidentität von nur 31 % und in der TolA-C Bindungsregion von sogar nur 22 %. Diese niedrige Sequenzidentität der Grenzflächen überrascht besonders, da das Bindungsmotiv (die Bildung eines intermolekularen Faltblattes) identisch ist. Die niedrige Sequenzübereinstimmung ist vor allem im Bereich des Faltblattstranges β 4 (Aminosäure 35-45 in IF1 N1) auffällig. Dieser Faltblattstrang bildet durch die Interaktion mit dem Faltblattstrang β 3 von TolA-C das zentrale Element der Grenzfläche im Komplex. Die Rückgratstruktur des intermolekularen Faltblattes ist hochkonserviert (Abbildung 3-8b). Dennoch weisen beide N1 Domänen in diesem Motiv mit Gly40 in IF1 N1 bzw. Gly42 in fd N1 nur eine identische Aminosäure auf (Abbildung 3-8b). Im G3P* des Phagen fd ist der Faltblattstrang β 4 von N1 zusätzlich in die Bindung der Gelenkregion involviert. Diese duale Funktion des Bereichs in fd N1 erklärt

wahrscheinlich, warum die Sequenzkonservierung hier, trotz aktiver Rolle bei der Bindung an TolA-C, so niedrig ist.

Der Vergleich der beiden Komplexe zeigt, dass eine identische Architektur und die gleichen Schlüsselinteraktionen für die Komplexbildung verantwortlich sind, obwohl die Sequenzkonservierung zwischen den N1 Domänen im Bindungsbereich mit 22 % sehr gering ist. Diese Toleranz gegenüber Änderungen der Aminosäuresequenz resultiert daraus, dass ein Großteil der wichtigen Interaktionen im Komplex Wasserstoffbrückenbindungen des Rückgrats sind und zudem Coulombsche Wechselwirkungen keine präzise Anordnung der geladenen Gruppen benötigen.

3.1.2.3 Die Komplexbildung von IF1 N1 und TolA-C wurde in Lösung mittels NMR Spektroskopie untersucht

Um das Verständnis der Komplexbildung auf molekularer Ebene weiter zu vertiefen, wurde die Komplexbildung von IF1 N1 und TolA-C in Lösung mittels NMR $^{15}\text{N}^1\text{H}$ Korrelationsspektroskopie in einer Kooperation mit Dr. U. Weininger (AG Prof. Dr. J. Balbach, Universität Halle) untersucht. Entsprechend markiertes IF1 N1 wurde mit TolA-C in neun Schritten bis zu einer Endkonzentration von 0,57 mM IF1 N1 und 0,81 mM TolA-C titriert.

Aminosäuren von IF1 N1, die eine Veränderung der chemischen Verschiebung über 0,1 ppm bei der Titration erfahren, sind in Abbildung 3-9a durch einen roten Punkt markiert und wurden in Abbildung 3-9c rot eingefärbt. Ebenso sind auch die Aminosäuren von fd N1, die nach Titration mit TolA-C analoge Veränderungen zeigen rot markiert⁶⁸. Die Aminosäuren von N1, die bei der Titration mit TolA-C eine Veränderung ihrer chemischen Verschiebung zeigen, sind bei fd und IF1 sehr ähnlich. Dies bestätigt, dass beide N1 Domänen auch in Lösung die gleiche Oberfläche für die Bindung an TolA-C nutzen.

Der Vergleich dieser Daten mit den Kristallstrukturen der Komplexe zeigt, dass die meisten Aminosäuren, deren NMR-Signale eine Veränderung bei der Titration mit TolA-C zeigen, tatsächlich in der Kontaktfläche des Komplexes lokalisiert sind (Abbildung 3-9b). Einige Aminosäuren, die nicht direkt mit TolA-C wechselwirken und dennoch durch die Bindung von TolA-C beeinflusst werden, befinden sich in direkter Nachbarschaft zu Aminosäuren der Kontaktfläche. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung der beiden N1 Domänen an TolA-C nicht mit konformationellen Änderungen von N1 abseits der Bindungsstelle einhergeht.

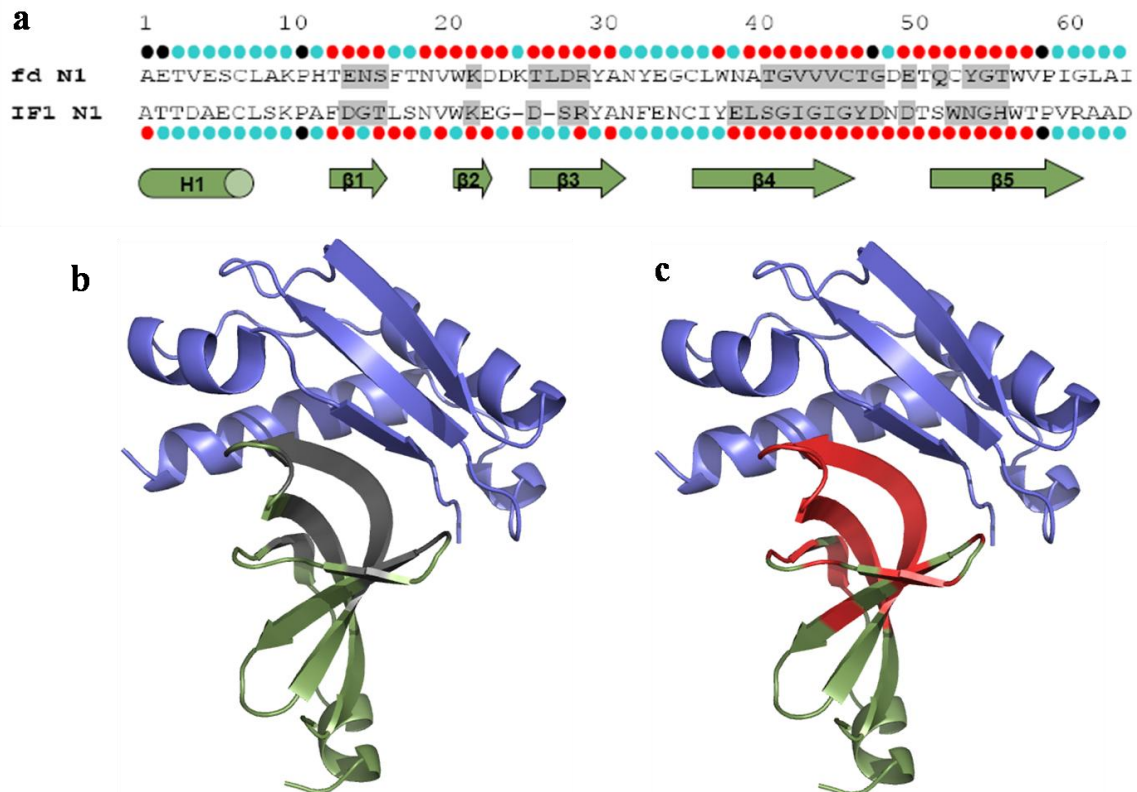


Abbildung 3-9: Vergleich der Aminosäuren von N1, die in der Kontaktfläche im Komplex liegen, mit den Aminosäuren die eine chemische Verschiebung über 0,1 ppm bei Titration mit TolA-C in NMR $^{15}\text{N}^1\text{H}$ Korrelationsspektroskopieexperimenten zeigen. a) Sequenzvergleich von IF1 N1 mit fd N1. Reste, die eine chemische Verschiebung der Amidprotonen bei Bindung an TolA-C zeigen sind mit einem roten Punkt markiert. Ist die Verschiebung kleiner als 0,1 ppm, wurden die Reste türkis markiert. Über Aminosäuren mit einem schwarzen Punkt liegen keine Informationen vor. Aminosäuren deren Reste in der Kontaktfläche zwischen N1 und TolA-C in den Kristallstrukturen liegen wurden grau unterlegt (Identifizierung mit dem Programm PISA⁸¹). Die Sekundärstrukturelemente sind in grün dargestellt. b) Kristallstruktur des Komplexes aus TolA-C und IF1N1 bei der die Aminosäuren in der Grenzfläche grau markiert sind. c) Kristallstruktur aus TolA-C und IF1 N1 bei der Aminosäuren, die eine chemische Verschiebung in NMR Titrationsexperimenten gezeigt haben, rot markiert sind. Die Abbildungen aus (b) und (c) wurden mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific, 2006) und dem PDB Eintrag 2X9A erstellt.

3.1.2.4 Sowohl fd N1 als auch IF1 N1 steuern *in vivo* die Infektion über TolA-C

Diese *in vitro* Untersuchungen implizieren, dass sowohl der Phage IF1 also auch der Phage fd mit der N1 Domäne ihres G3P bei der Infektion von *E. coli* an den Oberflächenrezeptor TolA-C binden. Um dies zu prüfen, wurde die Pilusbindedomäne N2 von G3P im Phagen fd auf genetischer Ebene deletiert und nachfolgend die C-terminale Domäne von G3P direkt entweder mit der endogenen N1 Domäne oder mit der N1 Domäne der Phagen IF1 fusioniert. Die resultierenden Phagenkonstrukte fdPhage-fdN1 und fdPhage-IF1N1 können durch das Fehlen der N2 Domäne die Infektion nicht mehr durch die Bindung an den F Pilus oder I Pilus initiieren. Deshalb wurden für die Infektionsexperimente Pilus-freie *E. coli* HB2156 Zellen⁶⁸ benutzt. In Abwesenheit eines Pilus kann die Infektion nur durch die direkte Interaktion mit TolA-C erfolgen. Die Infektionsrate ist deshalb deutlich verringert, kann aber durch Zugabe von CaCl_2 erhöht werden.

Beide Phagenkonstrukte mit den alternativen N1 Domänen an der Phagenspitze sind infektiös. Das fd Phagenkonstrukt mit der IF1 N1 Domäne (fdPhage-IF1N1) besitzt etwa 40 % der Infektiosität des fd Phagen mit der endogenen N1 Domäne (fdPhage-fdN1, siehe Abbildung 3-10). Somit kann die N1 Domäne des Phagen IF1 die Infektiosität eines Phagen, der durch die Deletion der endogenen TolA-C Bindungsdomäne inaktiviert wurde, wiederherstellen. Die Infektiosität des hybriden Phagenkonstruktes aus fd Phage und IF1 N1 Domäne ist etwas verringert, vermutlich weil IF1 N1 mit einer geringeren Affinität an TolA-C bindet als fd N1 (siehe 3.1.2.1).

Um auszuschließen, dass Phagenpartikel unspezifisch über einen alternativen Infektionsweg Zellen infizieren, wurde anstelle von N1 das *cold shock protein* CspB an die C-terminale Domäne des Phagen fd fusioniert (fdPhage-CspB) und für Referenzexperimente genutzt. CspB besitzt eine ähnliche Größe wie N1, bindet jedoch nicht an TolA-C. Diese Kontrollphagen waren nicht infektiös (Abbildung 3-10), was bestätigt, dass eine spezifische Interaktion des Phagen mit TolA-C für den Infektionsvorgang obligatorisch ist.

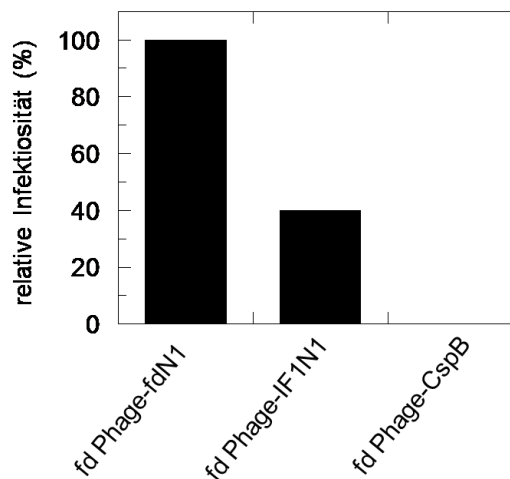


Abbildung 3-10: Infektiosität der verschiedenen Phagenkonstrukte bei der Infektion von *E. coli* HB2156 Zellen (F⁻-Zellen) relativ zur Infektiosität des aktivsten Phagenkonstruktes. Die Phagentiter wurden vor der Infektion anhand der Absorption bei 260 nm angeglichen und die *c.f.u.* der infizierten Zellen mittels geeigneter Verdünnungsstufen auf Cm-haltigem dYT-Nährböden ermittelt.

Die Kombination aus den *in vivo* Untersuchungen, den *in vitro* Bindungstests und der Analyse der Komplexstruktur im Kristall und in Lösung zeigt klar, dass der Phage fd und der Phage IF1 den gleichen Oberflächenrezeptor von *E. coli*, nämlich TolA, zur Infektion nutzen. Beide N1 Domänen binden an dieselbe Stelle auf TolA-C und sind trotz der geringen Sequenzidentität in der Lage einander funktionell zu komplementieren.

3.1.3 Der Austausch der N2 Domäne ändert die Wirtsspezifität des Phagen fd

Wie oben dargestellt, nutzen beide Phagen, fd und IF1, TolA-C als terminalen Rezeptor für die Infektion. TolA ist Bestandteil des Pal/Tol Systems, das ubiquitär bei gram-negativen Bakterien vorkommt. Filamentöse Phagen steigern die Effizienz der Infektion erheblich, indem sie zunächst an einen bakteriellen Pilus binden, bevor sie mit TolA-C interagieren. Die

Phagen fd und IF1 benutzen unterschiedliche Pili (F Pilus bzw. I Pilus) für diesen ersten Schritt der Infektion. Die Pilusspezifität wird durch die N2 Domäne des G3P der Phagen bestimmt. Die fehlende Sequenzhomologie zwischen den N2 Domänen von fd G3P und IF1 G3P spiegelt die unterschiedlichen Bindungspartner der beiden Domänen wider.

Um zu untersuchen, ob die Spezifität des fd Phagen geändert werden kann von *E. coli* Zellen, die einen F Pilus besitzen, hin zu *E. coli* Zellen, die einen I Pilus besitzen, wurde die endogene N2 Domäne von G3P des Phagen fd durch die Pilus Bindungsdomäne des Phagen IF1 ersetzt. Der wildtypische fd Phage mit seiner eigenen N2 Domäne ist in Abbildung 3-11 als fd Phage-fdN2, das Referenzkonstrukt ohne N2 Domäne mit fd Phage Δ N2 und das Phagenkonstrukt mit der IF1 N2 Domäne anstelle der endogenen fd N2 Domäne mit fd Phage-IF1N2 bezeichnet.

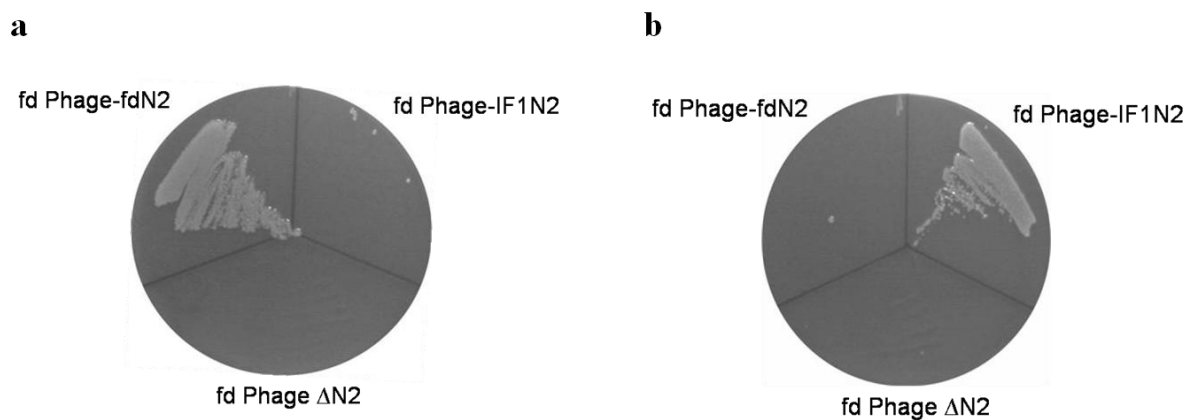


Abbildung 3-11: Infektion von Zellen, die (a) einen F-Pilus (*E. coli* XL1 Blue) bzw. (b) einen I-Pilus (*E. coli* ATCC27065) tragen, mit verschiedenen Phagenkonstrukten. Nach Infektion mit dem jeweiligen Phagenkonstrukt wurden die Zellen nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C auf Cm-haltigem Nährmedium ausgestrichen und nach 12stündiger Inkubation bei 37 °C fotografiert.

Es zeigt sich, dass fd Phagen (mit endogener N2 Domäne) in der Lage sind, zwar *E. coli* Zellen mit einem F-Pilus zu infizieren (Abbildung 3-11a), jedoch nicht *E. coli* Zellen mit einem I Pilus (Abbildung 3-11b). Der Hybridphage mit der IF1 N2 Domäne (fd Phage-IF1N2) infiziert dagegen nur I Pilus tragende Zellen. Der Referenzphage ohne N2 Domäne infiziert unter den experimentellen Bedingungen weder I Pilus noch F Pilus tragende Zellen. Dieses Experiment zeigt, dass die Wirtsspezifität filamentöser Phagen maßgeblich durch die N2 Domäne des G3P gesteuert wird und durch den Austausch dieser Domäne geändert werden kann.

3.2 Vereinfachung des Infektionsmechanismus des Phagen fd durch Entkopplung der beiden Domänen in fd G3P* nach dem Vorbild von IF1 G3P*

3.2.1 Konstruktion eines fd G3P* mit strukturell und funktionell unabhängigen Domänen: $\Delta\beta$ 6-G3P*

Der Faltungsmechanismus des Zweidomänenproteins fd G3P* ist eng mit der biologischen Funktion verknüpft: Zu Beginn der Infektion bindet N2 an die Spitze eines F Pilus. Dies führt

zu einer teilweisen Entfaltung von N2 und der Gelenkdomäne⁸⁰. Dadurch können N2 und N1 voneinander dissoziieren und die Bindestelle des terminalen Rezeptors TolA-C auf N1, die vorher in der Grenzfläche zwischen N1 und N2 verborgen lag, wird freigelegt. Die langsame *trans*-nach-*cis* Isomerisierung des in der Gelenkregion liegenden Pro213 ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Rückfaltung und somit der molekulare Zeitschalter des Faltungsintermediates. Dieses Faltungsintermediat kann auch während der Rückfaltung von gereinigtem fd G3P* populiert werden. Interessanterweise ist dieser raffinierte Mechanismus eines Prolinschalters zwischen einer vollständig gefalteten, inaktiven Form des G3P* mit fest assoziierten Domänen und einer teilweise ungefalteten aktiven Form mit unabhängigen Domänen nicht konserviert. So benutzt der homologe Phage IF1 bei der Infektion von *E. coli* Zellen die gleiche Reihenfolge der Kontaktaufnahme, d.h. zunächst bindet er mit der N2 Domäne des G3P an den bakteriellen Pilus und anschließend mit der N1 Domäne an den Oberflächenrezeptor TolA-C. Allerdings sind im IF1 G3P* die beiden Domänen strukturell und funktionell unabhängig voneinander, es existiert keine geordnete Gelenkregion und somit auch keine prolinkontrollierte Aktivierung durch eine Domänen dissoziation.

Um die Domänenassoziation zu unterbinden und somit ein permanent geöffnetes G3P* analog zum G3P* des Phagen IF zu erstellen, wurde in vorangehenden Arbeiten der für die Domäneninteraktion wichtige Zeitschalter an Pro213 eliminiert, indem die Punktmutationen P213G, Q212A oder P214A in G3P* eingebracht wurden. Das Einführen der Punktmutationen verschlechterte die Domäneninteraktion, hob sie jedoch nicht vollständig auf, wie die thermodynamische Analyse der Varianten zeigt²¹. Das Einbringen von Punktmutationen um den Prolinschalter ist folglich nicht ausreichend um die Gelenkregion so stark zu destabilisieren, dass sich die beiden Domänen in G3P* unabhängig voneinander verhalten.

Die gefaltete Struktur der Gelenkregion besteht aus einem antiparallelen zweisträngigen β Faltblatt, das aus den nicht konsekutiven Faltblattsträngen $\beta 6$ und $\beta 13$ gebildet wird. Diese Faltblattstränge sind Teile der Verbindungen, die von der N1 Domäne zur N2 Domäne und von der N2 Domäne zur CT Domäne führen (Abbildung 3-12). Um die Sekundärstruktur der Gelenksubdomäne effizienter zu destabilisieren und auf diese Weise die Wechselwirkung von N1 und N2 zu unterbinden, wurden die sieben Aminosäuren des Faltblattstranges $\beta 6$ deletiert ($\Delta\beta 6$ -G3P*).

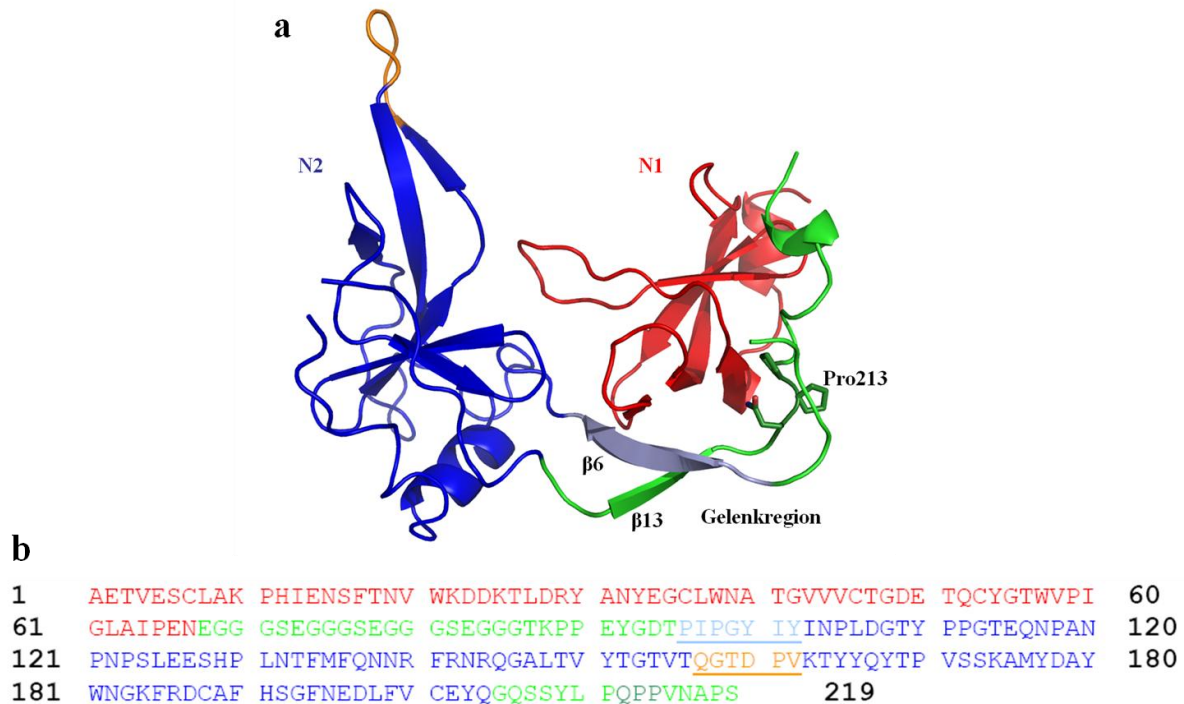


Abbildung 3-12: Tertiärstruktur und Aminosäuresequenz von G3P*. (a) In der Cartoon-Darstellung von G3P* ist die N1 Domäne in rot, der globuläre Teil von N2 in blau und die Gelenksubdomäne in grün dargestellt. Der Abschnitt des Faltblattstranges $\beta 6$ im Gelenkbereich ist in graublau, der Bereich der Faltblattschleife 3 in N2 in orange gekennzeichnet. Die Aminosäurereste 212, 213 und 214 sind im Stäbchenmodell dunkelgrün dargestellt. Die Abbildung basiert auf der Kristallstruktur von Holliger *et al.* (PDB-Eintrag: 2G3P) und wurde mit dem Programm PyMOL erstellt. (b) Aminosäuresequenz von G3P* mit einer zur Strukturabbildung analogen Farbkodierung.

3.2.2 N1 und N2 in $\Delta\beta 6$ -G3P* zeigen die gleiche thermodynamische Stabilität wie in isolierter Form

In fd G3P* wird die thermodynamische Stabilität der N2 Domäne durch die Wechselwirkung mit N1 relativ zur isolierten N2 Domäne erhöht. Der Vergleich der thermodynamischen Stabilität von N2 innerhalb von $\Delta\beta 6$ -G3P* mit der der isolierten N2 Domäne gibt folglich Hinweise auf die Stärke der Interaktion von N2 und N1. Für die thermodynamische Charakterisierung wurden zunächst Denaturierungsmittel-induzierte Gleichgewichtsübergänge der Domänen in isolierter Form und innerhalb von G3P* bzw. $\Delta\beta 6$ -G3P* gemessen. N1 und N2 unterscheiden sich deutlich in ihrer thermodynamischen Stabilität. Deshalb wurden unterschiedliche Denaturierungsmittel zur Entfaltung eingesetzt. Die N1 Domäne ist sehr stabil und kann daher mit Harnstoff nicht vollständig entfaltet werden. Stattdessen wurde das stärkere Denaturierungsmittel GdmCl bei 25 °C verwendet. Die isolierte N2 Domäne von G3P* zeigt bei 25 °C nur eine geringe Stabilität, weswegen sie bei 15 °C mit Harnstoff als Denaturierungsmittel entfaltet wurde.

Die Verläufe der GdmCl-induzierten Entfaltungsübergänge der N1 Domäne in G3P*, in $\Delta\beta 6$ -G3P* und von N1 in isolierter Form sind nahezu identisch (Abbildung 3-13, Tabelle 3-2). Die Stabilität von N1 ist unabhängig von der Interaktion mit N2, da N1 bei

Denaturierungsmittelkonzentrationen entfaltet, bei denen N2 und die Gelenkregion bereits denaturiert sind.

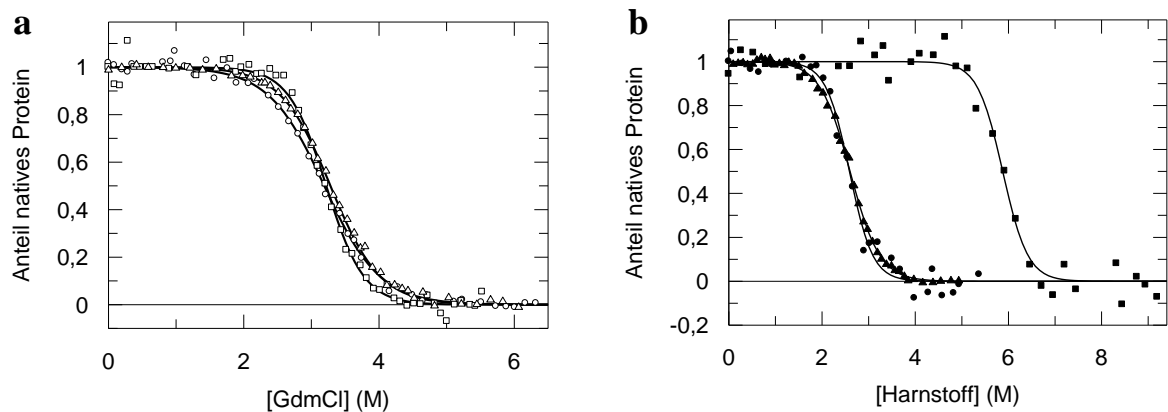


Abbildung 3-13: Vergleich der Denaturierungsmittel-induzierten Gleichgewichtsübergänge der Domänen N1 und N2 in G3P* (□, ■), in $\Delta\beta 6$ -G3P* (Δ, ▲), sowie der isolierten Domänen N1 (○) und N2 (●). Aufgetragen ist der Anteil des nativen Proteins der (a) N1 Domäne gegen GdmCl und (b) der N2-Domäne gegen Harnstoff nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell. Die Übergänge wurden bei einer Proteinkonzentration von 1 μ M in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Temperatur von 25 °C (N1) bzw. 15 °C (N2) und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Entfaltungsübergänge von isolierter N1 und N1 in G3P* wurden anhand der Fluoreszenz bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm, der Entfaltungsübergang der N2 Domäne in G3P* bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Die Detektion der Entfaltungsübergänge von $\Delta\beta 6$ -G3P* erfolgte anhand des CD Signals bei 230 nm, die der isolierten N2 Domäne anhand des CD-Signals bei 230 nm.

Tabelle 3-2: Stabilitätsdaten für G3P*, $\Delta\beta 6$ -G3P* und der isolierten N2 Domäne aus der Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltung

	Denaturierungsmittel/ Temperatur	[Denat.] _{1/2} (M)	<i>m</i> (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	ΔG_D (kJ mol ⁻¹)	
Übergang N2	G3P*	Harnstoff/15 °C	5,9	8,9	52,3
	$\Delta\beta 6$ -G3P*	Harnstoff/15 °C	2,6	9,5	24
	isolierte N2	Harnstoff/15 °C	2,6	6,8	17,9
Übergang N1	G3P*	GdmCl/25 °C	3,2	8,9	29,2
	$\Delta\beta 6$ -G3P*	GdmCl/25 °C	3,2	6,0	19,2
	isolierte N1	GdmCl/25 °C	3,3	6,7	22

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte $[GdmCl]_{1/2}$, die Kooperativitätsparameter *m* und $\Delta G_D^{15/25^\circ C}$ in Abwesenheit des Denaturierungsmittels für die N2- und die N1-Domäne. Aufgrund der geringen Signaländerung wird die Genauigkeit der Parameter auf $\pm 10\%$ geschätzt. Die Entfaltungsübergänge von isolierter N1 und N1 in G3P* wurden anhand der Fluoreszenz bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm, der Entfaltungsübergang der N2 Domäne in G3P* bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Die Detektion der Entfaltungsübergänge von $\Delta\beta 6$ -G3P erfolgte anhand des CD Signals bei 230 nm, die der isolierten N2 Domäne anhand des CD-Signals bei 230 nm. Die Analyse der Daten erfolgte für beide Domänen auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells. Die Daten für G3P* wurden aus Martin *et al.*⁷⁹ entnommen.

Anders verhält es sich bei der N2 Domäne: Die isolierte N2 Domäne zeigt nur eine geringe Stabilität mit einem Übergangsmittelpunkt bei 2,6 M Harnstoff. In G3P* mit intakter Gelenkregion ist die Stabilität von N2 durch die Wechselwirkung mit N1 stark erhöht und der

Übergangsmittelpunkt ist um 3,3 M auf 5,9 M Harnstoff verschoben (Abbildung 3-13b). In $\Delta\beta 6$ -G3P* zeigen beide Domänen die gleichen thermodynamischen Stabilitäten wie in isolierter Form. Die Domänen sind in ihren Stabilitäten unabhängig voneinander und folglich existiert keine stabilisierende Wechselwirkung zwischen den Domänen.

Zusätzlich zur Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltung wurde auch die Stabilität der Proteine gegenüber thermischer Entfaltung gemessen. Das CD-Signal bei 210 nm liefert eine spezifische Sonde für die Entfaltung von N2 in G3P* und in $\Delta\beta 6$ -G3P*. Die Entfaltungskurven zeigen bezüglich der relativen Stabilitäten einen sehr ähnlichen Verlauf wie bei der chemischen Entfaltung: Die Übergangsmittelpunkte der isolierten N2 Domäne und der N2 Domäne in $\Delta\beta 6$ -G3P* sind einander sehr ähnlich (38,3 bzw. 36,8 °C), während der Übergangsmittelpunkt von N2 in G3P* durch die energetisch günstige Wechselwirkung mit N1 auf 58,9 °C verschoben ist (Abbildung 3-14). Die Stabilitäten der N1 Domänen in den unterschiedlichen Konstrukten sind wiederum vergleichbar, da bei der Entfaltung von N1 die N2 bereits entfaltet ist und damit nur einen sehr geringen Einfluss auf die N1 Domäne besitzt (Tabelle 3-3).

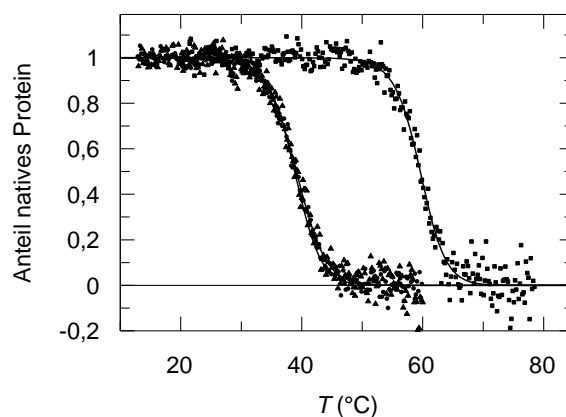


Abbildung 3-14: Vergleich der thermisch induzierten Gleichgewichtsübergänge der isolierten N2 Domäne (●), sowie der N2 Domänen in G3P* (■) und in $\Delta\beta 6$ -G3P* (▲). Aufgetragen ist der Anteil des nativen Proteins gegen die Temperatur. Bei der Auswertung nach einem Zweizustandsmodell wurde für die isolierte N2 Domäne und die N2 Domäne in $\Delta\beta 6$ -G3P* ein ΔC_p -Wert von $8000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und für die N2 Domäne in G3P* von $10000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ angenommen. Bei der Auswertung von N2 in $\Delta\beta 6$ -G3P* wurde für die Steigung der Basislinie des denaturierten Proteins der analoge Wert aus der Auswertung der isolierten Domäne festgesetzt. Die Übergänge wurden bei einer Proteinkonzentration von $1 \mu\text{M}$ in $0,1 \text{ M}$ K-Phosphat, pH 7,0, einer Schichtdicke von 1 cm und einer Heizrate von 60°C/h gemessen. Die Entfaltungsübergänge wurden anhand des CD-Signals bei 210 nm verfolgt.

Neben dem T_M -Wert ist die van't Hoff Enthalpie ein wichtiger Parameter einer thermischen Entfaltungskurve. Der Wert der van't Hoff Enthalpie verhält sich proportional zur Größe der kooperativen Faltungseinheit des Proteins. Der erste Entfaltungsübergang von G3P* beinhaltet neben der Entfaltung des globulären Teils der N2 Domäne auch das Lösen der intramolekularen Bindungen zu N1, die Entfaltung der Gelenkregion und somit die Dissoziation der Domänen. Die kooperative Faltungseinheit ist also größer als bei der isolierten N2 Domäne. Für den ersten Entfaltungsübergang von $\Delta\beta 6$ -G3P* ergibt sich eine der

isolierten N2 Domäne sehr ähnliche van't Hoff Enthalpie (332 bzw. 335 kJ mol⁻¹) während die Enthalpie des Überganges von N2 in G3P* deutlich größer ist (435 kJ mol⁻¹, siehe Tabelle 3-3).

Im Vergleich zum Wildtypprotein G3P* ist in Δβ6-G3P* die Stabilität von N2 sehr stark erniedrigt, und sie entspricht in ihrem thermischen Entfaltungsübergang der isolierten Domäne. Dies zeigt, dass die Deletion des Faltblattstrangs β6 im Scharnierbereich von G3P* zu einem vollständigen Verlust der stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen den Domänen geführt hat. Dies wird durch die Analyse der van't Hoff Enthalpien bestätigt, die ebenfalls für N2 in isolierter Form und als Teil von Δβ6-G3P* sehr ähnlich, aber deutlich geringer als für N2 als Teil von G3P* sind.

Tabelle 3-3: Stabilitätsdaten für G3P*, Δβ6-G3P* und die isolierten Domänen aus der thermischen Entfaltung

		T_M (°C)	ΔH_D (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{40/65^\circ C}$ (kJ mol ⁻¹)
Übergang N2	G3P*	58,9	435	19,7
	Δβ6-G3P*	39,2	332	-0,9
	isolierte N2	39,1	335	-1,0
Übergang N1	G3P*	65,5	221	0,3
	Δβ6-G3P*	64,1	202	-0,5
	isolierte N1	66,8	242	1,7

Für die verschiedenen G3P*-Varianten sind die Schmelztemperaturen T_M , die Enthalpien der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt ΔH_D und die freien Enthalpien der Entfaltung $\Delta G_D^{40^\circ C}$ und $\Delta G_D^{65^\circ C}$ angegeben. Die Übergänge der N2 Domäne wurden anhand des CD-Signals bei 210 nm verfolgt und gemäß eines Zweizustandsmodells analysiert. Die Entfaltung der N1 Domäne in G3P* wurde anhand des CD-Signals bei 230 nm verfolgt, der Übergang von N1 in Δβ6-G3P* anhand der Absorption bei 296 nm. Die Datenanalyse erfolgte nach einem Dreizustandsmodell. Der Entfaltungsübergang der isolierten N1 Domäne wurde anhand des CD-Signals bei 230 nm beobachtet und gemäß eines Zweizustandsmodells ausgewertet. Für die Auswertung des Entfaltungsüberganges der N2 Domäne in G3P* wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität von $\Delta C_p = 10000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, für die isolierte N2 Domäne und N2 in Δβ6-G3P* $\Delta C_p = 8000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und für N1 von $\Delta C_p = 1000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ angenommen.

3.2.3 In Δβ6-G3P* sind N1 und N2 eigenständige Faltungseinheiten die sich gegenseitig nicht beeinflussen

Neben der Analyse der Stabilität gibt die kinetische Analyse der Faltungsreaktionen von Δβ6-G3P* Aufschluss darüber, inwieweit N1 und N2 in diesem Konstrukt miteinander wechselwirken. Für G3P* wurde der Faltungsmechanismus detailliert analysiert: Die Rückfaltung der beiden Domänen N1 und N2 erfolgt in G3P* mit sehr unterschiedlichen Zeitkonstanten. Während die Rückfaltung von N2 und die anschließende lockere Domänenassoziation in zwei Phasen mit $\tau = 7 \text{ s}$ und $\tau = 42 \text{ s}$ verläuft, faltet die N1-Domäne 500mal schneller mit einer Zeitkonstante von $9,4 \text{ ms}$ ¹⁸. Die Entfaltung beider Domänen im nativen Protein ist durch einen gemeinsamen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, die Domänen dissoziation, limitiert.

Die Abhängigkeit der Faltungs- und Entfaltungsreaktionen von $\Delta\beta 6$ -G3P* von der Denaturierungsmittelkonzentration wurde sowohl für Harnstoff als auch für GdmCl untersucht. Dabei konnten drei Phasen detektiert werden (Abbildung 3-15 a-f): Bei der Untersuchung der Faltung mittels GdmCl bei 25 °C wurde eine in Millisekunden ablaufende Faltungsreaktion beobachtet, die der Faltung der N1 Domäne zugeordnet werden kann. Weiterhin wurden bei der Analyse der Faltung nach Verdünnung von 6 M nach 0,75 M Harnstoff bei 15 °C zwei im Sekunden- bzw. Minutenbereich ablaufende Faltungsreaktionen erfasst, die einer schnellen konformationellen und einer langsameren, prolinlimitierten Faltungsreaktion der N2 Domäne entsprechen⁸². In Abbildung 3-15g, h sind die apparenten Raten λ der Faltungsreaktionen in einer Chevronauftragung halblogarithmisch gegen die GdmCl-Konzentration (g) bzw. Harnstoffkonzentration (h) aufgetragen. Hierbei entspricht λ der Summe der Ent- und Rückfaltungsraten bei der jeweiligen Denaturierungsmittelkonzentration. Am Übergangsmittelpunkt sind die Ent- und Rückfaltungsraten identisch. Dieser wird folglich durch den Schnittpunkt der Geraden für die Ent- und Rückfaltungsraten bestimmt. In Abbildung 3-15g wurden zusätzlich zum Vergleich die Faltungsraten der isolierten N1 Domäne, in Abbildung 3-15h die Faltungsraten der isolierten N2 Domäne aufgetragen. Während der Rückfaltung der isolierten N2 Domäne kann eine zusätzliche schnelle Phase mit sehr kleiner Amplitude detektiert werden, die der Faltungsreaktion von U_{cis} nach N_{cis} an Pro161 entspricht⁸². Da diese Phase in $\Delta\beta 6$ -G3P* aufgrund anderer Fluoreszenzeigenschaften nicht beobachtet werden kann, wurde diese Phase in Abbildung 3-15g nicht berücksichtigt. Die Chevron-Auftragungen von N1 und N2, die Amplituden sowie die Start/Endwert Analyse von N1 und N2 in $\Delta\beta 6$ -G3P* sind im Anhang in Abbildung 9-1 und in Abbildung 9-2 dargestellt. Die Chevron-Auftragungen der Faltungsraten der isolierten Domänen und der Domänen in $\Delta\beta 6$ -G3P* sind praktisch identisch. Die Faltungsphasen von $\Delta\beta 6$ -G3P* korrelieren also nicht mit der Faltung von G3P*, sondern reflektieren die Faltungsreaktionen der isolierten Domänen. Während der Entfaltung ist keine limitierende Domänen dissoziationsreaktion detektierbar. Die Analyse der Faltung von $\Delta\beta 6$ -G3P* liefert somit keine Hinweise auf eine kinetische Kopplung von N1 und N2 in diesem Konstrukt.

Anhand der apparenten Raten λ der Chevron-Auftragung können die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung und der Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (k_{UN} und k_{NU}) nach einem Zweizustandsmodell berechnet werden. Mit den so berechneten Geschwindigkeitskonstanten lässt sich die thermodynamische Stabilität als Funktion der Denaturierungsmittelkonzentration berechnen (Tabelle 9-4, Tabelle 9-5). Die Übergangsmittelpunkte $[GdmCl]_M$ der N1 Domäne in $\Delta\beta 6$ -G3P aus der Analyse der Chevron-Auftragung, der Start- und Endwerte und des Gleichgewichtsübergangs stimmen sowohl untereinander als auch mit dem entsprechenden Übergangsmittelpunkt der isolierten N1 Domäne überein. Diese Übereinstimmung zeigt, dass die Auswertung nach dem angenommenen Zweizustandsmodell richtig ist. Die Faltung nach einem Zweizustandsmodell

der N1 Domäne ist ein weiteres Indiz für die Unabhängigkeit der Domänen, Wechselwirkungen von N1 und N2 wie in G3P* sind mit diesem Model nicht vereinbar.

Die Analyse der kinetischen Daten der N2 Domäne ist sehr komplex, da die Faltung von N2 einen prolinlimitierten Faltungsschritt beinhaltet und es zudem sowohl im nativen als auch denaturierten Protein ein Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Spezies gibt ⁸². Dieser komplexe Faltungsmechanismus schlägt sich in einer Hysterese zwischen den Rückfaltungs- und Entfaltungsdaten in der Start-/Endwert Analyse (Abbildung 9-2d) und somit in einer Abweichung von den Daten aus den Gleichgewichtsübergängen nieder. Der Angleich nach einem Zweizustandsmodell an die Datenpunkte der schnellen Faltungsreaktion stimmt jedoch für die isolierte N2 Domäne und N2 in $\Delta\beta 6$ -G3P* sehr gut überein. Somit kann auch nach quantitativer Analyse der Faltungsdaten von N2 keine Wechselwirkung mit N1 detektiert werden.

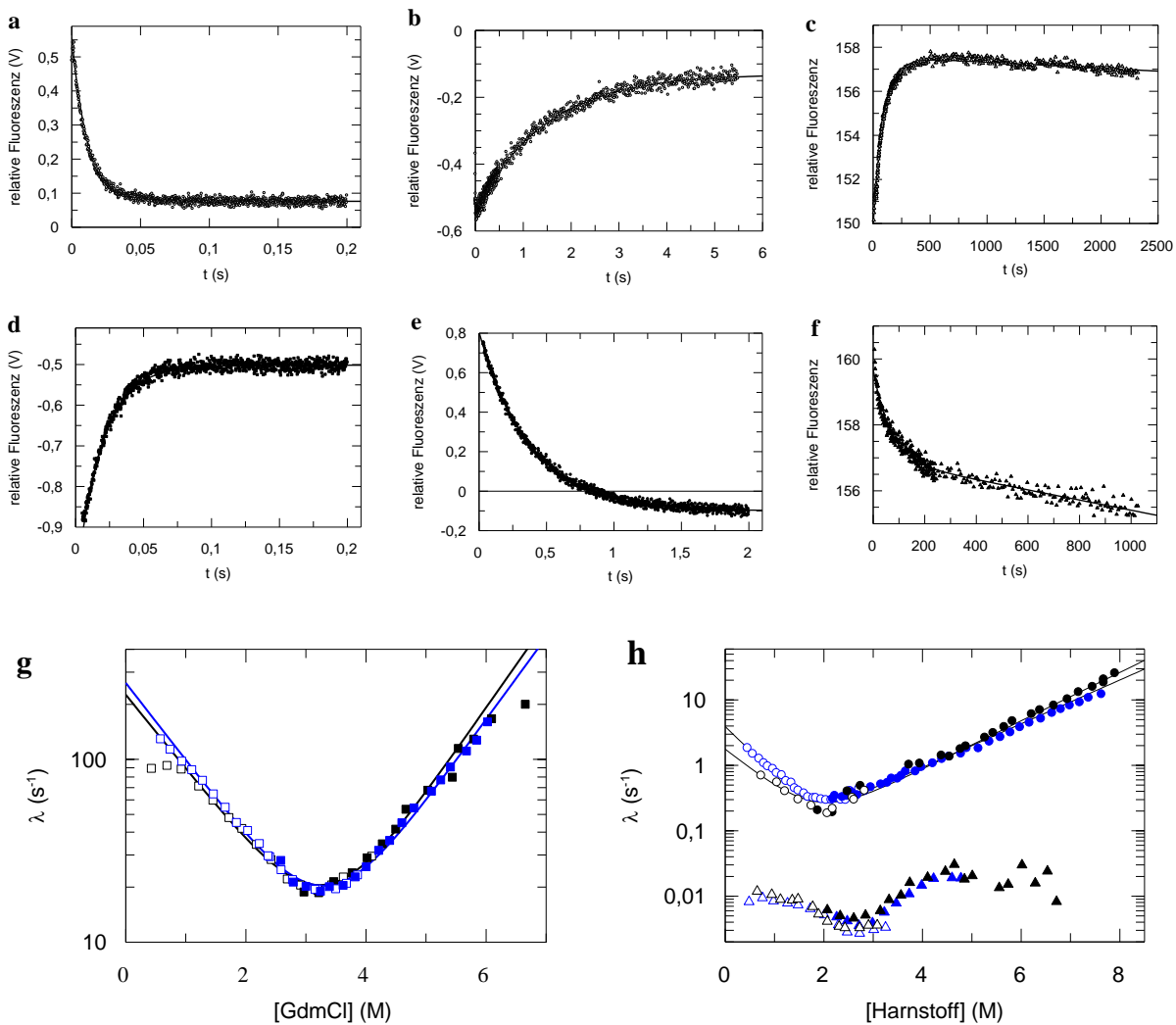


Abbildung 3-15: Rückfaltungs- (a-c) und Entfaltungsreaktionen (d-f) von $\Delta\beta 6\text{-G3P}^*$, sowie die Chevron Auftragungen der Faltungsraten im Vergleich zu denen der isolierten N1 (g) und N2 Domäne (h). Dargestellt ist in (a) die sehr schnelle Rückfaltungsreaktion von $\Delta\beta 6\text{-G3P}^*$ in 0,75 M GdmCl (\square), und in (b) und (c) die beiden Rückfaltungsreaktionen in 0,75 M Harnstoff (\circ , Δ). Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Angleich einer monoexponentiellen Funktion an die experimentellen Datenpunkte mit Zeitkonstanten τ von 0,01s, 1,45 s und 94 s. In (d) ist das Fluoreszenzsignal der schnellen Entfaltungsreaktion in 5 M GdmCl (\blacksquare), in (e) und (f) die beiden Entfaltungsreaktionen in 5 M Harnstoff (\bullet , \blacktriangle) gegen die Zeit aufgetragen. Die durchgezogenen Linien repräsentieren wiederum den Angleich einer monoexponentiellen Funktion an die experimentellen Datenpunkte mit Zeitkonstanten τ von 0,02 s, 1,2 s und 66,7s. (g) Chevron Auftragung der Entfaltungs- (\blacksquare , \blacksquare) und Rückfaltungsreaktionen (\square , \square) der N1 Domäne in $\Delta\beta 6\text{-G3P}^*$ (schwarz) sowie der isolierten N1 Domäne (blau). (h) Chevron Auftragung der schnellen (\circ , \circ) und langsamen (Δ , Δ) Rückfaltungsreaktion, sowie der schnellen (\bullet , \bullet) und langsamen Entfaltungsreaktion (\blacktriangle , \blacktriangle) der N2 Domäne in $\Delta\beta 6\text{-G3P}^*$ (schwarz) sowie der isolierten N2 Domäne (blau, Daten der isolierten N2 Domäne: Dr. R.P. Jakob).

Die schnellen Faltungsreaktionen wurden an einer *stopped flow* Apparatur anhand der integralen Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm nach elfacher Verdünnung in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0 bei 15 °C (Harnstoff) bzw. 25 °C (GdmCl) verfolgt. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Angleich an die experimentellen Daten gemäß einem Zweizustandsmodell. Die langsame Faltungsreaktion der N2 Domäne wurde nach zehnfacher manueller Verdünnung anhand der Fluoreszenz bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0 bei 15 °C verfolgt. Die Amplitudenanalyse, sowie die Start-/Endwert Analyse für beide Domänen sind in Abbildung 9-1 und Abbildung 9-2 dargestellt.

3.2.4 In $\Delta\beta 6$ -G3P* ist die Bindungsstelle für TolA-C voll zugänglich

Im Ruhezustand von G3P* ist die Bindungsstelle von TolA-C auf N1 in der Grenzfläche zwischen N1 und N2 verborgen. Erst durch die Interaktion von G3P* mit dem bakteriellen F Pilus werden die Wechselwirkungen zwischen N1 und N2 aufgehoben, die Domänen dissoziieren und die Bindungsstelle auf N1 wird für TolA-C zugänglich. Die Affinität von TolA-C für N1 ist also ein Maß für die Zugänglichkeit der Bindungsstelle auf N1 bzw. für die Stärke der Wechselwirkung zwischen N1 und N2. Dabei zeigt die N1 Domäne in isolierter Form die höchste, im geschlossenen G3P* die niedrigste Affinität. Um die Affinität von N1 innerhalb von $\Delta\beta 6$ -G3P* zu TolA-C quantifizieren zu können, wurde auch die Bindung von $\Delta\beta 6$ -G3P* an TolA-C_AEDANS untersucht.

Die Komplexbildung aus isolierter N1 bzw. N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P* und TolA-C_AEDANS wurde nach *stopped flow* Mischung mittels der Zunahme der integralen Fluoreszenz oberhalb von 460 nm nach Anregung bei 280 nm beobachtet. Dabei wurde die Konzentration an TolA-C_AEDANS mit 0,5 μM konstant gehalten und die Konzentration an isolierter N1 bzw. $\Delta\beta 6$ -G3P* variiert. Dadurch vereinfacht sich die Analyse der Komplexbildung von einer Reaktion zweiter Ordnung zu einer Reaktion pseudo-erster Ordnung. Die Assoziation von N1 und TolA-C_AEDANS folgt einem monoexponentiellen Reaktionsverlauf (Abbildung 3-16a), wobei die Geschwindigkeit der Komplexbildung linear mit steigender Titrandkonzentration zunimmt (Abbildung 3-16b). Unter der Voraussetzung eines einfachen Einschrittmechanismus der Komplexbildung und einer Stöchiometrie der Bindungspartner von 1:1 ist folgende Analyse der apparenten Raten k_{app} der Komplexbildung möglich: Nach linearer Regression der Datenpunkte ergibt der y-Achsenabschnitt die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{off} und die Geradensteigung die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} . Aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation und Assoziation resultiert eine kinetisch definierte Dissoziationskonstante K_{D} . Die Dissoziationskonstante der Komplexbildung von isolierter N1 Domäne mit TolA-C_AEDANS beträgt 0,32 μM , von N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P* 0,38 μM . Unter Zuhilfenahme der gleichen Annahmen können auch die Amplituden der einzelnen Bindungsreaktionen gegen die Titrandkonzentration aufgetragen und aus dem Amplitudenverlauf analog zu einer Gleichgewichtstitration der K_{D} bestimmt werden. Der K_{D} aus der Amplitudenauswertung beträgt sowohl bei der Komplexbildung von TolA-C_AEDANS mit isolierter N1 als auch bei der Komplexbildung mit N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P* 0,2 μM .

Die Dissoziationskonstanten aus der Analyse der apparenten Raten (0,38 μM) und der Amplituden der Reaktionsverläufe (0,20 μM) sind sehr ähnlich (Abbildung 3-16). Dies zeigt, dass die Annahme einer Bindungsstöchiometrie von 1:1 und die Vereinfachung der Komplexbildung von einer Reaktion zweiter Ordnung hin zu einer Reaktion pseudo-erster Ordnung korrekt ist. Die Dissoziationskonstanten der Komplexbildung von isolierter N1 und N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P* mit TolA-C_AEDANS sind praktisch identisch, d. h. die Bindestelle von TolA-C auf N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P* ist ebenso zugänglich wie auf der isolierten N1 Domäne. Die

gleiche Affinität zu TolA-C lässt ebenfalls eine Wechselwirkung zwischen der N1 und N2 Domäne in $\Delta\beta 6$ -G3P* ausschließen.

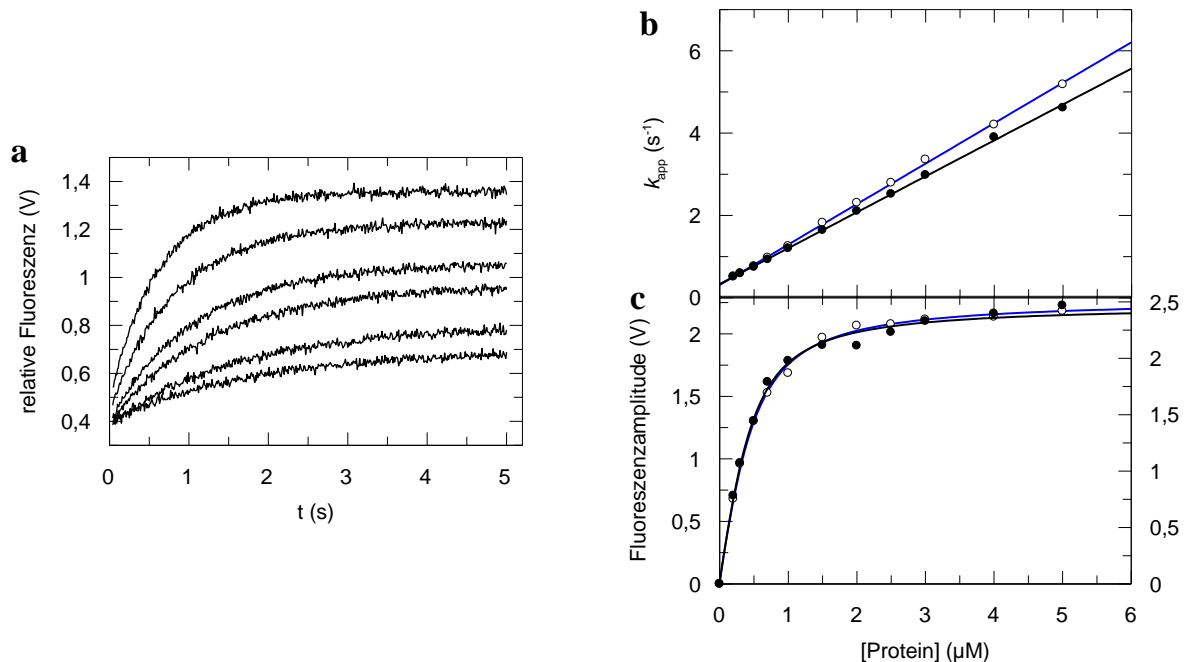


Abbildung 3-16: Komplexbildung von 0,5 μM TolA-C_AEDANS mit variierenden Konzentrationen an isolierter N1 bzw. an N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P*. (a) Kinetik der Assoziation von TolA-C_AEDANS und der N1 Domäne in $\Delta\beta 6$ -G3P*. Die Reaktion von 0,5 μM TolA-C_AEDANS mit 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0 und 1,5 μM $\Delta\beta 6$ -G3P* (von unten nach oben) wurde anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz in *stopped-flow* Mischexperimenten verfolgt. (b) Abhängigkeit der apparenten Reaktionsrate k_{app} von der Konzentration an isolierter N1 (\circ , blaue Regressionsgerade) bzw. an N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P* (\bullet , schwarze Regressionsgerade). Nach linearer Regression liefert der y-Achsenabschnitt k_{off} (isolierte N1: 0,31 s⁻¹, N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P*: 0,33 s⁻¹) und die Geradensteigung k_{on} (isolierte N1: 0,98 μM^{-1} s⁻¹, N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P*: 0,87 μM^{-1} s⁻¹). Aus dem Verhältnis von k_{off} zu k_{on} berechnet sich der K_{D} für TolA-C zur isolierten N1 zu 0,32 μM und für N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P* zu 0,38 μM . (c) Abhängigkeit der Fluoreszenzamplituden der Bindungsreaktionen von der Konzentration der isolierten N1 Domäne (\circ) bzw. von N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P* (\bullet). Die Linien (blau: isolierte N1, schwarz: N1 in $\Delta\beta 6$ -G3P*) zeigen einen Angleich an die Messpunkte mit einer Dissoziationskonstanten K_{D} von jeweils 0,2 μM . Die Reaktionen wurden anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 460 nm nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 10 nm) verfolgt. Alle Experimente wurden in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C durchgeführt.

3.2.5 $\Delta\beta 6$ -G3P* als Vermittler der Phageninfektion

Um die Einflüsse von $\Delta\beta 6$ -G3P* auf die Phageninfektiosität untersuchen zu können, wurden die Aminosäuren des β -Faltblattstranges 6 (Abbildung 3-12) auch im Phagengenom deletiert. Das resultierende Phagenkonstrukt wird im Folgenden als fd- $\Delta\beta 6$ -G3P* bezeichnet. Für die Infektionstests wurden F Pilus-tragende *E. coli* Zellen (F⁺) oder Zellen ohne Pilus (F⁻), sowie als Referenzphagen der ursprüngliche Phage (fd-G3P*) und ein Phage ohne N2 Domäne (fd- Δ N2) verwendet.

In G3P* sind N1 und N2 fest miteinander assoziiert. Der erste Kontakt mit dem bakteriellen F Pilus löst die Domänendissoziation aus und ermöglicht so die nachfolgende Interaktion mit TolA-C. Deshalb infiziert fd-G3P* F⁺ Zellen gut, ist jedoch nicht in der Lage F⁻ Zellen zu

infizieren, da die Bindestelle für TolA-C durch N2 blockiert bleibt. Der Phage ohne N2 Domäne (fd- Δ N2-G3P*) kann nicht an den F Pilus binden und folglich F⁺ Zellen nur mit geringer Effizienz infizieren. Für die Infektion von F⁻ Zellen ist dieses Phagenkonstrukt dagegen sehr gut geeignet, da in Abwesenheit der N2 Domäne die Bindestelle von TolA-C auf N1 permanent zugänglich ist. Für diese Infektionsexperimente wird die Effizienz der Infektion durch Zugabe von CaCl₂ gesteigert.

Dem Phagenkonstrukt fd- Δ β 6-G3P* ist es möglich sowohl F⁺ Zellen als auch F⁻ Zellen zu infizieren. Allerdings werden F⁺ Zellen etwa zehnfach schlechter infiziert als durch fd-G3P*. Überraschenderweise ist fd- Δ β 6-G3P* auch gegenüber F⁻ Zellen zehnfach weniger infektiös als fd- Δ N2-G3P*, obwohl alle *in vitro* Experimente mit gereinigtem Protein zeigen, dass N2 in diesem Konstrukt nicht mit N1 interagiert und die TolA-C Bindestelle vollständig zugänglich ist. Gleichzeitig sollte fd- Δ β 6-G3P* ebenso infektiös sein wie fd-G3P*, da beide Phagenkonstrukte über den Kontakt mit den bakteriellen Pili an der Zelloberfläche angereichert werden und im folgenden Infektionsschritt an TolA-C binden sollten.

Eine Erklärung für die schlechtere Infektiosität sowohl gegenüber F⁺ Zellen als auch F⁻ Zellen könnte die thermische Labilität von N2 in Δ β 6-G3P* sein. Der Übergangsmittelpunkt der N2 Domäne von Δ β 6-G3P* des gereinigten Proteins bei der thermischen Entfaltung liegt bei 39 °C. Während der achtstündigen Phagenpropagation bei 37 °C liegt die N2 Domäne folglich teilweise entfaltet vor und könnte durch Aggregation unproduktive Phagenpartikel zur Folge haben, die im Infektionstest inaktiv sind. Um dies zu überprüfen wurde die konformationelle Stabilität der N2 Domäne in Δ β 6-G3P* erhöht, indem durch Kürzung und Substitution einer nicht der Konsensussequenz entsprechenden β -Faltblattschleife abseits der Pilusbindungsstelle die Aminosäuren 157 bis 162 durch die Konsensussequenz Val-Asn-Gly ersetzt wurden⁶³ (Abbildung 3-12). Die resultierende Proteinvariante wird im Folgenden als Δ β 6-G3P*-VNG, das Phagenkonstrukt als fd- Δ β 6-G3P*-VNG bezeichnet. Die Neugestaltung der Faltblattschleife stabilisiert selektiv die N2 Domäne, wie der Vergleich der thermischen Entfaltung der gereinigten Proteine Δ β 6-G3P* und Δ β 6-G3P*-VNG zeigt. Die Stabilität der N1 Domäne wird durch die Mutation nicht beeinflusst und zeigt in beiden Übergängen einen Übergangsmittelpunkt von 64°C. Der T_M -Wert von N2 ist jedoch von 35 auf 45 °C erhöht, was einer Erhöhung der konformationellen Stabilität von etwa 10 kJ mol⁻¹ (Abbildung 3-17, Tabelle 9-6) entspricht. Der Unterschied der absoluten T_M -Werte für die N2 Domäne im Gegensatz zu den in Abschnitt 3.2.2 angegebenen ist durch die Verwendung unterschiedlicher Sonden und Auswertemodelle begründet.

Die Δ β 6-G3P*-VNG Variante des Phagen fd sollte unter den Bedingungen der Phagenpropagation und Infektion stabiler und damit infektiöser sein. Tatsächlich infiziert diese Phagenvariante pilustragende bzw. pilusfreie Zellen ebenso gut wie die Referenzphagen (Abbildung 3-18). Offensichtlich verringert die konformationelle Labilität der N2 Domäne die Infektiosität von fd- Δ β 6-G3P* in beiden Infektionstests. In fd- Δ β 6-G3P*-VNG ist die N2 Domäne stabil und vollständig funktional. Sie vermittelt die Bindung an den F Pilus der F⁺ Zellen und somit die Infektion dieser Zellen genauso gut wie die N2 Domäne in G3P*.

Außerdem infiziert fd- $\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG F^- Zellen mit derselben Effizienz wie der Phage ohne N2 Domäne, da die Domäneninteraktion in $\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG aufgehoben und damit die Bindestelle für TolA-C auf N1 vollständig zugänglich ist.

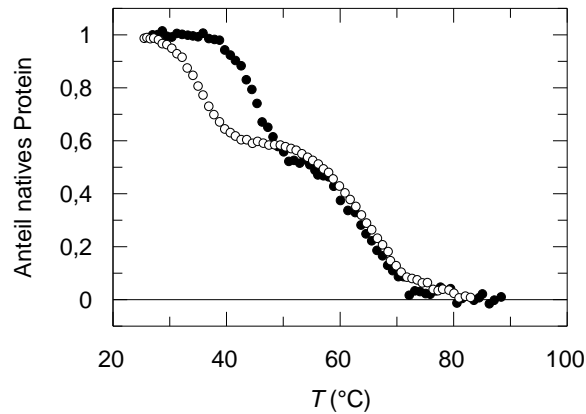


Abbildung 3-17: Vergleich der thermisch induzierten Gleichgewichtsübergänge von $\Delta\beta 6$ -G3P* (○) und $\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG (●). Aufgetragen ist der Anteil des nativen Proteins gegen die Temperatur nach Auswertung nach einem Dreizustandsmodell. Bei dieser Auswertung wurde für den Übergang der N2 Domäne ein ΔC_p -Wert von $8000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und für den der N1 Domäne ein ΔC_p -Wert von $1000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ angenommen. Die Übergänge wurden mit einer Proteinkonzentration von $4 \mu\text{M}$ in $0,1 \text{ M}$ K-Phosphat, pH 7,0, einer Schichtdicke von 1 cm an einem Absorptionsspektrometer bei 296 nm gemessen.

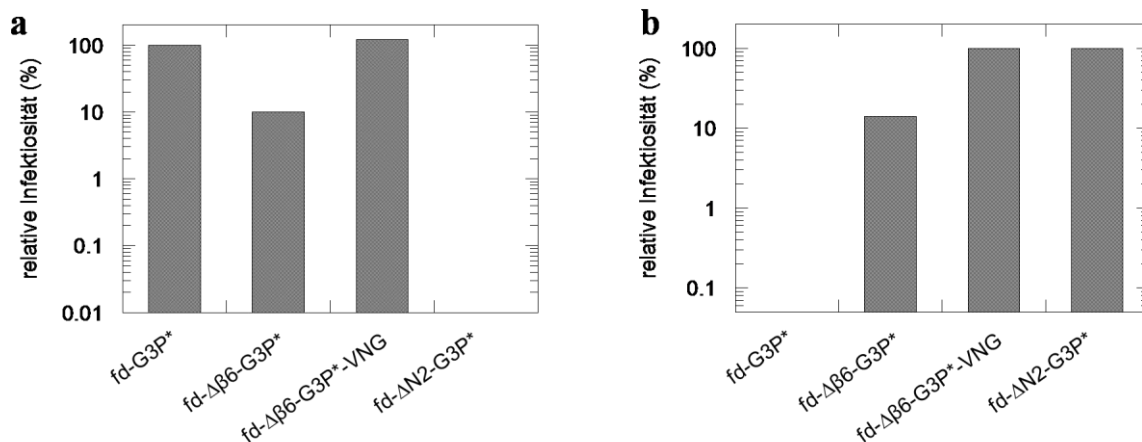


Abbildung 3-18: Infektion von *E. coli* F^+ Zellen (a) und F^- Zellen (b) durch verschiedene Phagenkonstrukte. Aufgetragen ist die relative Infektiosität der verschiedenen Phagenkonstrukte. Es wurde in (a) die Anzahl der *c.f.u.* von fd-G3P*, in (b) von fd- $\Delta\text{N}2$ -G3P* gleich 100 % gesetzt. Phagen wurden über Nacht propagiert, isoliert und die Phagentiter der unterschiedlichen Phagenkonstrukte anhand der Absorption bei 260 nm angeglichen. Nach fünfminütiger Infektion bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen, um die Zellen von bis dahin nicht infizierenden Phagen zu befreien. Nach 25minütiger Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Anzahl der *c.f.u.* durch das Anfertigen einer Verdünnungsreihe auf Cm-haltigem Medium bestimmt.

Die Fitness des Phagenkonstruktes fd- $\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG im Vergleich zum Referenzphagen fd-G3P* wurde in einem Konkurrenzexperiment ermittelt: Beide Phagenkonstrukte konkurrieren in einem Experiment um die Infektion von *E. coli* F^+ Zellen. Dabei wurden gleiche Titer an Phagen zu einer *E. coli* Suspension mit einer *m.o.i* kleiner als eins gegeben

und die infizierenden Phagen mittels KPCR identifiziert. In diesem Konkurrenzexperiment verdrängte der Referenzphage den Phagen fd- $\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG innerhalb von vier iterativen Zyklen aus Phagenpropagation, Phagenisolation und Infektionsexperiment, obwohl beide Phagenkonstrukte eine vergleichbare relative Infektiosität besitzen (Abbildung 3-19). Oder mit anderen Worten: Die Phagenkonstrukte sind demnach etwa gleich infektiös, jedoch kann der Ursprungphage vermutlich schneller infizieren. Da im Konkurrenzexperiment weniger Zellen als Phagen eingesetzt werden und jede Zelle nur von einem Phagen infiziert werden kann, besitzen schneller infizierende Phagen einen Vorteil während der Infektion. Vermutlich ist die Domänenarchitektur des wildtypischen Phagen (Referenzphage) auf eine möglichst effiziente und schnelle Infektion abgestimmt, d.h. auch nach Dissoziation der Domänen sind N1 und N2 zueinander im optimalen Abstand, bei dem N2 an den Pilus gebunden ist und gleichzeitig N1 in räumliche Nähe zu TolA-C gebracht wird. Diese perfekte Positionierung wird durch die nur teilweise Denaturierung der Gelenkregion während des infektiösen Zustandes von G3P* bewirkt²⁰. Durch die vollständige Destrukturierung der Gelenkregion in fd- $\Delta\beta 6$ -G3P* und fd- $\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG ändert sich auch der Abstand von N1 zu N2. Sehr wahrscheinlich führt diese Änderung der Quartärstruktur in $\Delta\beta 6$ -G3P* zur Benachteiligung im Konkurrenzexperiment.

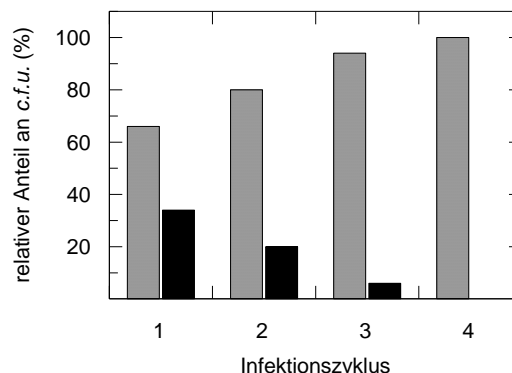


Abbildung 3-19: Konkurrenz der Phagenkonstrukte fd-G3P* (grau) und fd- $\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG (schwarz) um die Infektion von F^+ Zellen. Es ist der Anteil der Phagenkonstrukte an der gesamten *c.f.u.* in den einzelnen Infektionszyklen angegeben. In iterativen Zyklen wurden Phagen propagiert, isoliert und mit einer *m.o.i.* kleiner als eins zu F^+ Zellen gegeben. Von einer repräsentativen Anzahl an infizierten Zellen wurde mittels KPCR bestimmt, von welchem Phagenkonstrukt sie infiziert waren. Nach der Infektion wurde ein Aliquot der infizierten Zellen zur erneuten Phagenpropagation genutzt, um einen neuen Infektionszyklus zu starten.

Für einen weiteren Vergleich der Fitness von fd-G3P* und fd- $\Delta\beta 6$ -G3P* wurden die Phagen jeweils mit der Protease Chymotrypsin inkubiert und in definierten Zeitintervallen durch Infektionsexperimente mit *E. coli* F^+ Zellen die relative Infektiositäten bestimmt (Abbildung 3-20). Da der fd Phage an sich äußerst stabil gegenüber Proteolyse ist, ist dieses Experiment ein Test auf die Proteolysestabilität des G3P der Phagenkonstrukte. Dabei zeigte sich, dass das Phagenkonstrukt fd- $\Delta\beta 6$ -G3P* deutlich labiler gegenüber Proteolyse ist als fd-G3P*. Diese verringerte Proteolysestabilität korreliert mit dem Verlust an thermodynamischer Stabilität (Abbildung 3-14), da vor allem ungefaltete Polypeptidketten für Proteasen

zugänglich sind. Zwar ist fd- $\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG gegenüber fd- $\Delta\beta 6$ -G3P* deutlich stabilisiert, jedoch existieren in beiden Konstrukten aufgrund der Deletion in der Gelenkregion ungeordnete Linkerbereiche, die aromatische Aminosäuren und somit potentielle Proteaseschnittstellen enthalten. Diese Bereiche sind in G3P* durch die konformationelle Faltung vor Proteolyse geschützt.

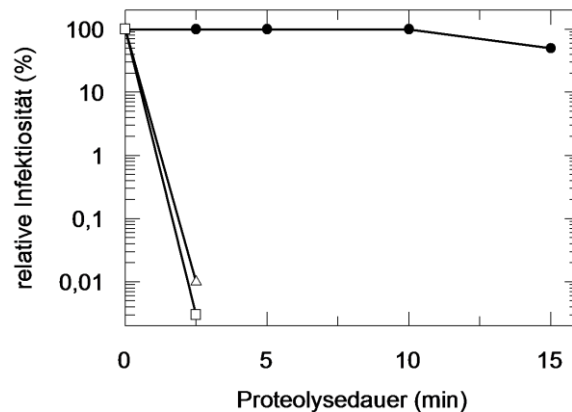


Abbildung 3-20: Test der Proteolysestabilität der Phagenkonstrukte fd-G3P* (●), fd- $\Delta\beta 6$ -G3P* (Δ) und fd- $\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG (\square). Isolierte Phagen wurden bei 37 °C in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, über unterschiedliche Zeiträume mit 25 μ M Chymotrypsin inkubiert, anschließend wurden Infektionstests durchgeführt und die relative Infektiosität gegenüber jeweils unbehandelten Phagen bestimmt, indem Verdünnungsreihen auf Cm-haltigem Medium angefertigt wurden.

3.2.6 Die Domänenorganisation von $\Delta\beta 6$ -G3P* entspricht der in IF1 G3P*

Im gereinigten Protein $\Delta\beta 6$ -G3P* ist keine Interaktion zwischen der N1 und der N2 Domäne mehr festzustellen. Die beiden Domänen sind in ihrer thermodynamischen Stabilität unbeeinflusst voneinander, sie stellen eigenständige Faltungseinheiten dar und die Bindungsstelle für TolA-C ist vollständig zugänglich. $\Delta\beta 6$ -G3P* repräsentiert somit den geöffneten, infektiösen Zustand von fd G3P*. Die Domänen sind in $\Delta\beta 6$ -G3P* aneinandergereiht wie Perlen an einer Schnur, entsprechend der Domänenorganisation in IF1 G3P*.

Die geänderte Domänenorganisation von $\Delta\beta 6$ -G3P* spiegelt sich auch in der Fähigkeit von fd- $\Delta\beta 6$ -G3P* wider, sowohl F⁺ Zellen als auch F⁻ Zellen infizieren zu können. Die Erhöhung der Infektiosität des Phagenkonstrukts fd- $\Delta\beta 6$ -G3P* durch thermodynamische Stabilisierung der labilen N2 Domäne verdeutlicht das Evolutionsprinzip der homologen G3P. Bei beiden Proteinen übernehmen die homologen Domänen analoge Aufgaben (Pilus bzw. TolA-C Bindung), die Proteine sind zwischen den Phagen austauschbar. Während sich in IF1 G3P* zwei unabhängige und für sich stabile Domänen entwickelten, bildete sich in fd G3P* ein globuläres Zweidomänenprotein, in dem die thermodynamische Stabilität und damit proteolytische Stabilität durch die Interaktion der beiden Domänen gewährleistet wird. Der Preis dafür ist die Notwendigkeit eines molekularen Prolinschalters, der über eine Populierung des infektiösen Faltungsintermediates die Effizienz der Infektion erhöht. Eine

ausreichende thermodynamische bzw. proteolytische Stabilität ist für das Überleben der Phagen unerlässlich.

3.3 Konstruktion eines Redox-sensitiven Phagenkonstrukts: G3P*-Clamp

In Abschnitt 3.2 wurde dargestellt, wie sich eine Schwächung bzw. Beseitigung der Domäneninteraktion auf die thermodynamischen Eigenschaften von G3P* *in vitro* und auf die Eigenschaften als Vermittler der Infektion *in vivo* auswirkt.

Im Folgenden wird analysiert, wie sich eine Verstärkung der Domäneninteraktion auf G3P* und seine Funktionen auswirkt. Die Domäneninteraktion wurde durch die Einführung einer Disulfidbrücke zwischen N1 und N2 abseits der Gelenkregion verstärkt, wodurch N1 und N2 zusätzlich kovalent miteinander verknüpft wurden. Zur Vermeidung von Fehlverbrückungen während der Faltung dieser G3P*-Variante wurde bei der Konstruktion auf eine disulfidbrückenfreie G3P*-Variante zurückgegriffen (OSS-G3P*-Var21 aus der Arbeit von Kather *et al.*⁸³), bei der jeweils ein Cystein in N1 und N2 eingebracht wurde. Die resultierende Variante wird mit G3P*-Clamp bezeichnet. Bei der Auswahl von geeigneten Positionen zur Einführung der Interdomänendisulfidbrücke wurde die Kristallstruktur von OSS-G3P*-stab aus der Arbeit von Kather *et al.*⁸³ (PDB-Eintrag 3DGS) herangezogen. Die Reste Gly153 und Asp24 wurden ausgewählt, da der Abstand der C_α-Atome der virtuell eingeführten Cysteine 3,7 Å beträgt und somit zur Ausbildung einer Disulfidbrücke geeignet sein sollte (siehe Abbildung 3-21). Darüberhinaus befindet sich Position 24 in einer beweglichen Schleife, was die Ausbildung einer Disulfidbrücke ebenfalls erleichtern sollte.

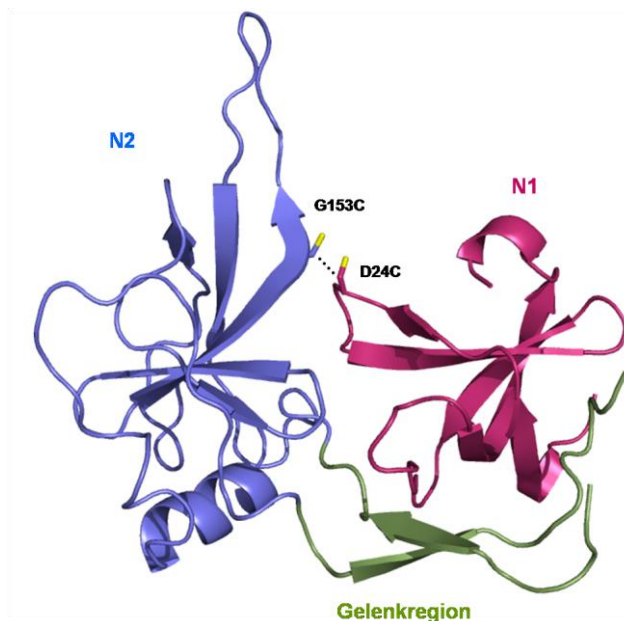


Abbildung 3-21: Tertiärstruktur von OSS-G3P*-stab in Bänderdarstellung. Die N1 Domäne ist in rot, die N2 Domäne in blau und die Gelenkregion in grün dargestellt. Die Aminosäurereste Asp24 und Gly153 wurden mittels PyMOL virtuell zu Cysteinen mutiert; der Abstand zwischen den C- α -Atomen der eingeführten Cysteinreste beträgt 3,7 Å. Die Struktur basiert auf der Kristallstruktur von Kather *et al.*⁸³ (PDB-Eintrag 3DGS) und wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific, 2006) erstellt.

3.3.1 Die Disulfidbrücke in G3P*-Clamp erhöht die thermodynamische Stabilität der N2 Domäne

Die Ausbildung einer strukturell günstigen Disulfidbrücke erhöht die thermodynamische Stabilität eines Proteins durch eine Verringerung der Entropie des entfaltenen Zustands. Aus der Analyse von G3P* ist bekannt, dass Mutationen, welche die Interaktion der beiden Domänen verstärken, vor allem auf die labilere N2 Domäne stabilisierend wirken⁷⁹. Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den eingeführten Cysteinen in G3P*-Clamp wurde deshalb mit thermisch-induzierten Gleichgewichtsübergängen von reduziertem und oxidiertem Protein untersucht, wobei mit dem CD Signal bei 210 nm eine spezifische Sonde für die labilere N2 Domäne verwendet wurde (Abbildung 3-22).

Die Cysteine in G3P*-Clamp bilden unter oxidierenden Bedingungen eine Disulfidbrücke aus: Die N2 Domäne des oxidierten Proteins ($T_M = 61,9 \text{ °C}$) zeigt einen um $8,2 \text{ °C}$ höheren Übergangsmittelpunkt als die des reduzierten G3P*-Clamp ($T_M = 53,7 \text{ °C}$). Die Ausbildung der Disulfidbrücke führt demnach zu einer Erhöhung der freien Enthalpie der Entfaltung des Proteins $\Delta\Delta G^{60^\circ\text{C}}$ um 12 kJ mol^{-1} . Zudem beeinflusst die Oxidation der Cysteine auch die van't Hoff Enthalpien der Entfaltung ΔH_{vH} : Im oxidierten Protein ist die van't Hoff Enthalpie der N2 Domäne mit 664 kJ mol^{-1} um 220 kJ mol^{-1} höher als die der N2 Domäne im reduzierten Protein (460 kJ mol^{-1}). Die Stabilität von N2 in G3P* wird größtenteils von der Interaktion von N2 mit der N1 Domäne vermittelt (siehe Abschnitt 3.2.2). Die Erhöhung der van't Hoff Enthalpie deutet auf eine größere kooperative Faltungseinheit bzw. im vorliegenden Fall auf eine stärkere Interaktion zwischen den beiden Domänen hin, die durch die Ausbildung der Disulfidbrücke bewirkt wird.

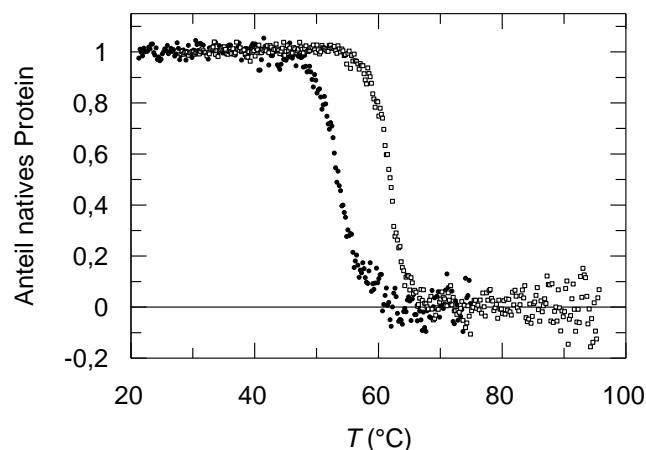


Abbildung 3-22: Vergleich der thermisch induzierten Gleichgewichtsübergänge der N2 Domäne in reduziertem (●) und oxidiertem (□) G3P*-Clamp. Aufgetragen ist der Anteil des nativen Proteins gegen die Temperatur. Der Übergangsmittelpunkt T_M für die N2 Domäne im oxidierten Zustand beträgt $61,9 \text{ °C}$ und die van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung ΔH_{vH} 664 kJ mol^{-1} . Der T_M des reduzierten Proteins liegt bei $53,7 \text{ °C}$, ΔH_{vH} bei 460 kJ mol^{-1} im reduzierten G3P*-Clamp. Bei der Auswertung nach einem Zweizustandsmodell wurde ein ΔC_P -Wert von $10000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ angenommen. Die Übergänge wurden bei einer Proteinkonzentration von 1 μM in $0,1 \text{ M}$ K-Phosphat, pH 7,0 (beim reduzierten Protein zusätzlich $0,1 \text{ mM}$ TCEP), einer Schichtdicke von 1 cm und einer Heizrate von 60°C/h gemessen. Die Entfaltungsübergänge wurden anhand des CD Signals bei 210 nm verfolgt.

Der Vergleich der Stabilitäten der N2 Domäne des Ausgangsproteins OSS-G3P*-Var21 ($T_M = 60,1 \text{ }^\circ\text{C}$) mit der N2 Domäne des reduzierten G3P*-Clamp ($T_M = 53,7 \text{ }^\circ\text{C}$) zeigt, dass das Einbringen der Cysteine an den Positionen 24 und 153 thermodynamisch ungünstig ist. Dieser Stabilitätsverlust wird jedoch durch die Ausbildung der Disulfidbrücke überkompensiert; die labilere Domäne von G3P*-Clamp ist im oxidierten Zustand um annähernd $2 \text{ }^\circ\text{C}$ stabiler als N2 in OSS-G3P*.

3.3.2 Die N1 Domäne von G3P*-Clamp bindet im intermediären Faltungszustand nur bei reduzierter Disulfidbrücke an Tola-C

Bei der Infektion von *E. coli* Zellen durch den Phagen fd bindet die N2 Domäne von G3P an den F Pilus. Daraufhin entfaltet die Gelenkregion von G3P teilweise und N1 und N2 dissoziieren voneinander. In diesem Faltungsintermediat, genauso wie in $\Delta\beta 6$ -G3P*, ist die Bindungsstelle für Tola-C auf N1 zugänglich. Zur Analyse der Zugänglichkeit für Tola-C an den intermediären Zustand wurde G3P*-Clamp unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen 8 h in 5 M GdmCl entfaltet und durch 100-fache Verdünnung für 5 min auf Eis rückgefaltet um das Intermediat zu populieren. Anschließend wurde die Bindung an mit AEDANS-markiertem Tola-C anhand des Förster-Resonanz-Energie Transfers an einer *stopped flow* Apparatur gemessen (siehe 3.1.2.1). Während Tola-C sehr gut an das Faltungsintermediat von reduziertem G3P*-Clamp binden kann, ist kaum eine Wechselwirkung mit dem Faltungsintermediat des oxidierten Proteins zu detektieren (Abbildung 3-23).

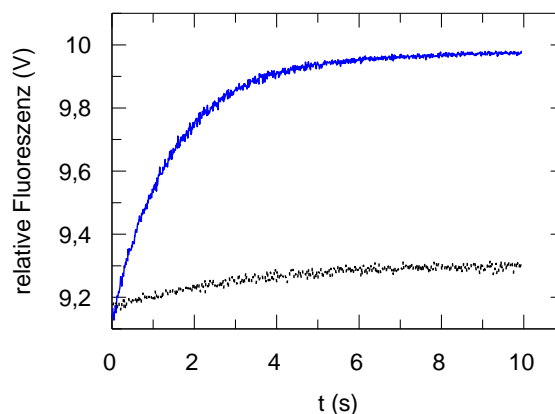


Abbildung 3-23: Komplexbildung von Tola-C_AEDANS mit dem Faltungsintermediat von oxidiertem und reduziertem G3P*-Clamp. Es ist das FRET-Signal der Komplexbildung von $0,5 \text{ } \mu\text{M}$ Tola-C_AEDANS mit $2 \text{ } \mu\text{M}$ oxidiertem (schwarz) bzw. $2 \text{ } \mu\text{M}$ reduziertem (blau) G3P*-Clamp gegen die Zeit aufgetragen.

Die Reaktionen wurden anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 460 nm nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 10 nm) verfolgt. Alle Experimente wurden in $0,1 \text{ M}$ K-Phosphat (bei der reduzierten Probe in Gegenwart von 1 mM TCEP), $\text{pH } 7,0$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt, nachdem oxidiertes und reduziertes G3P*-Clamp für 8 h in 5 M GdmCl entfaltet und anschließend durch 100-fache Verdünnung 5 min lang auf Eis rückgefaltet wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass für eine effiziente Bindung von N1 an TolA-C die Destrukturierung der Gelenkregion alleine nicht ausreichend ist. Vielmehr wird die Zugänglichkeit der Bindungsstelle durch eine räumliche Separation von N1 und N2, vermutlich in Form einer *rigid-body-motion*, ermöglicht. Dies wird durch die kovalente Verknüpfung in G3P*-Clamp unterbunden.

3.3.3 Die Infektiosität des Phagenkonstruktes fd -G3P*-Clamp ist über den Redoxzustand steuerbar

Um den Einfluss der kovalenten Verknüpfung der Domänen N1 und N2 auf die Infektiosität untersuchen zu können, wurde ein Phagenkonstrukt mit G3P*-Clamp als Vermittler der Infektion erstellt (fd-G3P*-Clamp). Als Referenzphage diente der Phage mit dem Disulfidbrücken-freien G3P* 0SS-G3P*-Var21 aus der Arbeit von Kather *et al.*⁸³ (fd-0SS-G3P*-Var21). Die Faltung von G3P* während der Phagenpropagation findet im Periplasma von *E. coli* statt. Das Milieu in diesem Kompartiment ist oxidierend, zudem sorgt das komplexe DsbA/DsbC Thioloxydase System für die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken während der Proteinfaltung. In den von *E. coli* gebildeten fd-G3P*-Clamp Phagenpartikeln sollten deshalb die N1 und die N2 Domäne in G3P*-Clamp durch eine Disulfidbrücke geklammert und demzufolge N1 unzugänglich für TolA-C sein.

Der Einfluss des Redoxzustands der Cysteine auf die Infektiosität von fd-G3P*-Clamp wurde getestet, indem die Phagen vor der Infektion 30 min in Abwesenheit oder in Gegenwart von 20 mM DTT bei 25 °C in 0,1 M K-P, pH 7,0 inkubiert wurden. Nach 5minütiger Infektion wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen um nicht-infizierende Phagen zu entfernen. Anschließend wurde die Anzahl infizierter *E. coli* Zellen anhand von Verdünnungsreihen bestimmt. Der Unterschied in der Infektiosität ist sehr groß. Im reduzierten Zustand ist fd-G3P*-Clamp 1000fach infektiöser als im oxidierten Zustand (siehe Abbildung 3-24). Der Ausgangsphage ohne die beiden Cysteinreste (fd-0SS-G3P*-Var21) veränderte seine Infektiosität nach Inkubation mit 20 mM DTT nicht. Dies zeigt, dass allein die Reduktion der Disulfidbrücke von G3P*-Clamp für die deutliche Steigerung der Infektiosität verantwortlich ist. Die Restaktivität von oxidiertem fd-G3P*-Clamp liegt möglicherweise an der Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen den fünf bis acht G3P*-Clamp Molekülen an der Spitze des Phagen fd-G3P*-Clamp liegen. Bei diesen Molekülen fehlt die kovalente Verknüpfung der beiden Domänen und somit ist eine Restinfektiosität derartiger Phagen vorstellbar.

Die Ergebnisse der *in vitro* Analysen des gereinigten Proteins decken sich überzeugend mit den Ergebnissen der *in vivo* Experimente mit dem Phagenkonstrukt fd-G3P*-Clamp. Nur im reduzierten Zustand kann G3P*-Clamp die Funktion als Vermittler der Infektion erfüllen, da nur die reduzierte intermediäre Konformation von G3P*-Clamp den geöffneten Zustand populieren und so an den bakteriellen Oberflächenrezeptor TolA-C binden kann.



Abbildung 3-24: Infektion von *E. coli* F⁺ Zellen durch die Phagenkonstrukte fd-0SS-G3P*-Var21 und fd-G3P*-Clamp. Dargestellt sind Verdünnungsreihen (1:10) der *E. coli* Zellen auf dYT^{CM}-Nährböden nach Infektion durch fd-0SS-G3P*-Var21 und fd-G3P*-Clamp. Die Phagen wurden nach der Isolierung ohne oder in Gegenwart von 20 mM DTT für 30 min bei 25 °C inkubiert. Die verwendeten Phagenkonstrukte vermitteln Cm-Resistenz, so dass nur infizierte Zellen auf dYT^{CM}-Medium wachsen können.

Der Phage fd-G3P*-Clamp ermöglicht demnach eine steuerbare Infektion. Eine biotechnologische Relevanz des Phagenkonstrukts für *Phage Display* Systeme ist denkbar: So kann mit fd-G3P*-Clamp in Gegenwart von *E. coli* Zellen selektiert werden, ohne dass diese Zellen sofort infiziert werden. Zu einem gewünschten Zeitpunkt kann dann dem Ansatz Reduktionsmittel zugegeben und so der Infektionsvorgang induziert werden. Für den Einsatz für biotechnologische Zwecke ist es allerdings empfehlenswert, die Infektionsraten und die Stringenz der Induktion zu optimieren.

3.4 Stabilisierung der IF Domäne von SlpA durch den Einbau von Disulfidbrücken

3.4.1 Auswahl geeigneter Positionen für den Einbau stabilisierender Disulfidbrücken

Die Peptidyl-Prolylisomerase SlpA³⁵ (*SlyD like protein A*) ist ein Zweidomänenprotein, bestehend aus einer Chaperondomäne und einer Peptidyl-Prolylisomerasedomäne vom FKBP-Typ. Die Chaperondomäne ist in der Primärstruktur nicht von der Peptidyl-Prolylisomerasedomäne getrennt, sondern in einen Bereich inseriert, der bei homologen Proteinen (z.B. *hFKBP12*) eine unstrukturierte Schleife, genannt *Flap*, ausbildet. Deswegen wird die Chaperondomäne auch als IF Domäne (*insert in flap*) bezeichnet.

NMR Untersuchungen (unveröffentlichte Daten AG Prof. Dr. J. Balbach, Uni Halle) zeigen, dass in SlpA die IF Domäne eine hohe Dynamik zeigt. Diese ist für die biologische Funktion wichtig, da ein Chaperon in der Lage sein muss, eine große Bandbreite von Substraten zu binden. Vermutlich ist die hohe intrinsische Beweglichkeit der Chaperondomäne aber auch dafür verantwortlich, dass SlpA bisher nicht erfolgreich kristallisiert werden konnte. Eine SlpA Variante mit einer stabilisierten und damit auch weniger dynamischen IF Domäne ist neben der Eignung für Kristallisationsversuche auch für die Untersuchung der Korrelation von Proteindynamik und Chaperonaktivität, sowie für thermodynamische Studien der Stabilitätsprinzipien von Zweidomänenproteinen interessant. In Abschnitt 3.3.3 wurde gezeigt, wie das rationale Design einer Disulfidbrücke die thermodynamische Stabilität eines Proteins erhöht. Für die Stabilisierung der IF Domäne wurde auf dieselbe Methode zurückgegriffen. Zur Auswahl geeigneter Positionen im Molekül wurde ein Homologiemodell der IF Domäne mit dem Programm Geno3D⁸⁴ und der Struktur von *MtFKBP17* (PDB Eintrag

1IX5) als Templat generiert (Abbildung 3-25). Um den sterischen Ansprüchen einer Disulfidbrücke zu genügen, wurde nach Aminosäuren in der IF Domäne gesucht, deren C_{α} -Atome einen Abstand von etwa 3 Å besitzen. Dabei wurden die Aminosäurepaare Ile26-Val40, Tyr9-Thr50 und Ser3-Asn54 (Aminosäurereposition in der IF Domäne) ausgewählt. Zur einfacheren Analyse der generierten Varianten wurden die Disulfide zunächst nicht in SlpA selbst, sondern in die isolierte IF Domäne eingebracht. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren gegen Cystein wurden drei IF Varianten mit je einer Disulfidbrücke hergestellt, die im Folgenden als IF I26C-V40C, IF Y9C-T50C und IF S3C-N54C bezeichnet werden.

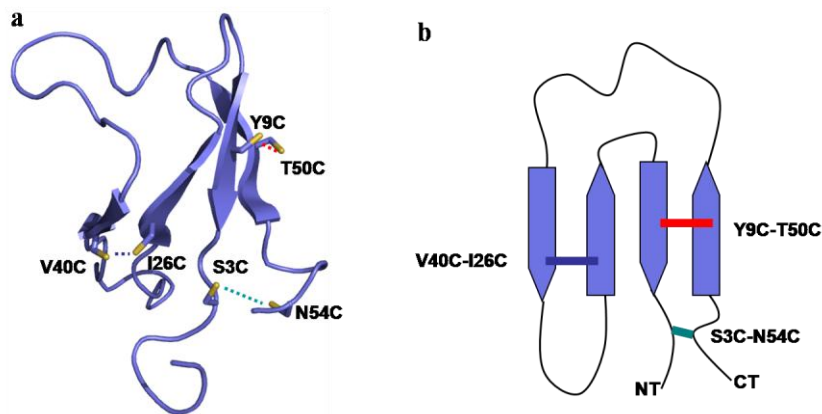


Abbildung 3-25: In (a) ist das Homologiemodell der IF Domäne von Slp A gezeigt, die gegen Cystein ausgetauschten Reste sind als Stäbchenmodell dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific 2006) erstellt. b) Schematische Darstellung der *Greek key* Faltung der IF Domäne, in der die Position der potentiellen Disulfidbrücken eingezeichnet ist.

3.4.2 Analyse der stabilisierten Varianten der IF Domäne von SlpA

Die isolierte IF Domäne von SlpA liegt gefaltet vor. Die thermodynamische Stabilität gegenüber thermischer Entfaltung kann anhand des CD Signals bei 225 nm verfolgt werden. Der Übergangsmittelpunkt des wildtypischen Proteins liegt bei 54,6 °C. Die relative geringe van't Hoff Enthalpie der Entfaltung ΔH_{VH} von 126 kJ mol⁻¹ kann auf die Proteingröße von nur 60 Aminosäuren und den geringen Sekundärstrukturgehalt zurückgeführt werden. Abbildung 3-26 zeigt die normierten thermischen Entfaltungsübergänge aller Cystein-Varianten von IF im oxidierten und im reduzierten Zustand, die zugehörigen thermo-dynamischen Parameter der Entfaltungskurven sind in Tabelle 3-4 zusammengestellt.

Bei allen konstruierten Varianten zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Stabilitäten der oxidierten und reduzierten Form. Im Gegensatz dazu hat das Reduktionsmittel keinen Einfluss auf die Stabilität des Wildtypproteins. Dies zeigt, dass die eingeführten Cysteine aller Varianten unter oxidierenden Bedingungen Disulfidbrücken ausbilden und ist gleichzeitig ein Hinweis darauf, dass das zur Auswahl geeigneter Aminosäurepositionen verwendete Homologiemodell der natürlichen Struktur offensichtlich sehr nahe kommt.

Alle Varianten sind im reduzierten Zustand im Vergleich zum Wildtypprotein destabilisiert. Das Einbringen der Cysteine ist folglich energetisch ungünstig. Die Ausbildung der

Disulfidbrücke durch Oxidation der Varianten überkompensiert diese Destabilisierung jedoch bei weitem, weshalb alle Varianten im oxidierten Zustand deutlich stabiler als das Wildtypprotein sind. Der Übergangsmittelpunkt der stabilsten Variante, IF Y9C-T50C, ist gegenüber dem Wildtypprotein um knapp 34 °C erhöht, dies entspricht einer Erhöhung der freien Enthalpie der Entfaltung ΔG_D um etwa 12 kJ mol⁻¹. In der Literatur sind nur wenige thermodynamisch analysierte Stabilisierungen durch den Einbau einer Disulfidbrücke beschrieben. Eine Studie stellt beispielsweise die Stabilisierung von T4 Lysozym durch die Konstruktion einer Disulfidbrücke um knapp 12 °C vor⁸⁵. Eine Erhöhung des T_M um 34 °C ist deshalb nach unserem Kenntnisstand die stärkste bis *dato* in der Literatur beschriebene Stabilisierung eines Proteins durch die *de novo* Konstruktion einer Disulfidbrücke.

Bei der Variante IF I26C-V40C sind 13 Aminosäuren, bei IF Y9C-50C 40 Aminosäuren und bei IF S3C-N54C 50 Aminosäuren von der Disulfidbrücke umschlossen. Je größer diese Anzahl ist, desto größer sollte die Erniedrigung der Entropie im denaturierten Zustand sein und desto höher folglich die Stabilisierung⁸⁶. Die Stabilität der Variante IF S3C-N54C folgt nicht dieser Regel, vermutlich deshalb, weil die Cysteine nicht optimal positioniert sind und somit bei der Ausbildung der Disulfidbrücke die Sekundärstruktur des Moleküls gestört wird. Auffallend ist bei dieser Variante, dass das reduzierte Protein nur wenig gegenüber dem Wildtypprotein destabilisiert ist, vermutlich weil die Aminosäuren sehr nahe an den Termini und damit nicht im strukturierten Bereich lokalisiert sind.

In weiterführenden Arbeiten der Arbeitsgruppe werden die Cysteinsubstitutionen auf das Zweidomänenprotein SlpA übertragen und die Ausbildung und Auswirkungen der Disulfidbrücken auf das Gesamtprotein analysiert werden. Dabei werden kristallographische Methoden angewandt, sowie funktionelle, kinetische und thermodynamische Analysen durchgeführt.

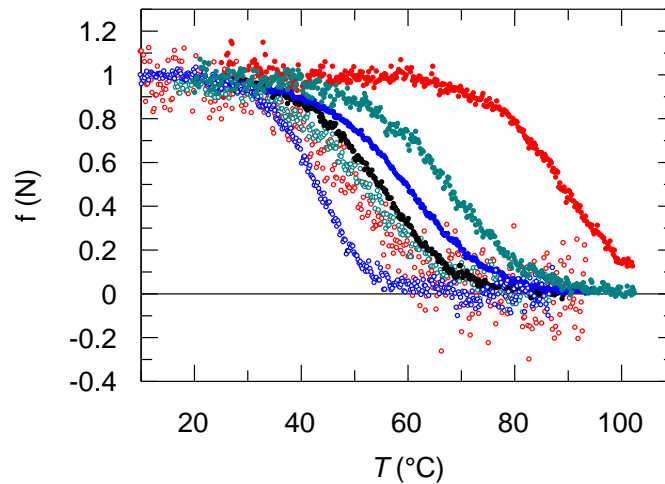


Abbildung 3-26: Dargestellt ist der Anteil des nativen Proteins $f(N)$ als Funktion der Temperatur. Die offenen Symbole markieren Entfaltungsübergänge der Varianten im reduzierten, die vollen Symbole Entfaltungsübergänge im oxidierten Zustand. Das wildtypische Protein ist in schwarz, IF I26C-V40C in blau, IF Y9C-T50C in rot und IF S3C-N54C in petrol dargestellt. Die Parameter der thermodynamischen Analyse der Entfaltungsübergänge sind in Tabelle 3-4 zusammengestellt. Die Rohdaten wurden gemäß einem Zweizustandsmodell ausgewertet. Die Proteinkonzentration lag bei jeweils $5 \mu\text{M}$ Protein in $0,1 \text{ M}$ K-Phosphat, $\text{pH } 7,0$ in Abwesenheit oder in Gegenwart von 1 mM TCEP.

Tabelle 3-4: Thermodynamische Parameter aus der Analyse der thermisch-induzierten Gleichgewichtsübergänge der isolierten, stabilisierten IF Domänen von SlpA im oxidierten und reduzierten Zustand

		T_M	ΔH_{vH}	$\Delta G_D^{52^\circ\text{C}}$
		($^\circ\text{C}$)	(kJ mol^{-1})	(kJ mol^{-1})
IF wildtyp		54,6	126	0,7
IF I26C-V40C	reduziert	42,9	169	-5,5
	oxidiert	59,6	114	2,2
IF Y9C-T50C	reduziert	49,3	118	-1,3
	oxidiert	88,9	159	12,1
IF S3C-N54C	reduziert	51,9	108	-0,3
	oxidiert	67,3	123	4,7

Für die verschiedenen Varianten der IF Domäne sind die Schmelztemperaturen T_M ($^\circ\text{C}$), die Enthalpien der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt ΔH_D (kJ mol^{-1}) und die freie Energie der Entfaltung $\Delta G_D^{52^\circ\text{C}}$ (kJ mol^{-1}) angegeben. Die Übergänge wurden anhand des CD Signals bei 225 nm verfolgt und gemäß einem Zweizustandsmodell analysiert.

3.5 Stabilisierung der IF Domäne von SlyD durch den Einbau einer Disulfidbrücke

3.5.1 Die stabilisierte IF Domäne ist nur in Gegenwart der Disulfidbrücke gefaltet

Das Zweidomänenprotein SlyD³⁵ (*sensitive to lysis*) ist aus den gleichen strukturellen Elementen wie das in Abschnitt 3.4 beschriebene SlpA aufgebaut, nämlich einer Peptidyl-Prolylisomerasedomäne vom FKBP Typ und einer insertierten Chaperonomäne, die ebenfalls als IF Domäne bezeichnet wird^{35, 87, 88}. Im Gegensatz zur IF Domäne von SlpA ist die IF Domäne von SlyD in Isolation nicht gefaltet (mündliche Mitteilung Prof. Dr. J. Balbach, Uni Halle). Im Volllängenprotein wird sie entropisch durch die Faltung der FKBP Domäne stabilisiert, indem die Termini in räumlicher Nähe zueinander gehalten werden. Um die Eigenschaften der isolierten IF Domäne mit denen im Volllängenprotein vergleichen zu können, wurde eine IF Variante konstruiert, in der an terminalen Positionen Cysteine eingeführt wurden. Unter oxidierenden Bedingungen sollte sich zwischen diesen Cysteinen eine Disulfidbrücke ausbilden, welche die Termini verklammert, die IF Domäne entropisch stabilisiert und so die konformationelle Faltung der IF Domäne in Isolation ermöglichen sollte. Als Grundlage wurde eine Variante der IF Domäne mit der Mutation D101W verwendet, um für spektroskopische Analysen eine intrinsische Fluoreszenzsonde zu besitzen⁸⁸. Die Reste Asp72 und Asn122 (Aminosäureposition im Volllängenproteins) wurden jeweils gegen Cystein ausgetauscht (siehe Abbildung 3-27). Die resultierende D72C/N122C Variante der IF Domäne wird im Folgenden als IF_{SHSH} im reduzierten und als IF_{SS} im oxidierten Zustand bezeichnet.

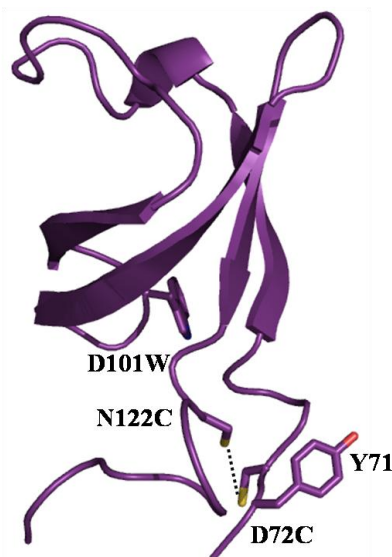


Abbildung 3-27: Modell der isolierten IF Domäne von SlyD. Das intrinsische Tyr71, sowie die eingeführten Aminosäurereste sind im Stäbchenmodell durch die Substitutionen D72C, D101W und N122C dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific 2006) und der NMR Struktur (PDB-Eintrag 2KFW) erstellt.

In Abbildung 3-28 sind die Fluoreszenzspektren von IF_{SS} und IF_{SHSH} jeweils in Abwesenheit (Abbildung 3-28a,c) bzw. in Gegenwart von 7 M Harnstoff (Abbildung 3-28b,c) dargestellt. Der Kurvenverlauf der Spektren bei selektiver Anregung der Tryptophan-

Fluoreszenz bei 295 nm unterscheidet sich nicht von dem nach Anregung bei 280 nm. In Gegenwart von 7 M Harnstoff zeigt die IF Variante für beide Oxidationszustände keinen wesentlichen Unterschied in den Fluoreszenzspektren, insbesondere für die selektive Anregung des intrinsischen Tryptophans ist die Fluoreszenz unabhängig vom Redoxzustand der IF Domäne. In Abwesenheit von Harnstoff weist IF_{SS} eine deutlich stärkere Fluoreszenz als IF_{SHSH} auf. Die Fluoreszenz von IF_{SS} nimmt mit steigender Harnstoffkonzentration ab. Diese Signaländerung wurde zur Messung eines Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergangs genutzt (Abbildung 3-28e). IF_{SS} besitzt eine relativ geringe Stabilität (Übergangsmittelpunkt 2,1 M Harnstoff) und eine geringe Kooperativität der Entfaltung. Der *m*-Wert von 4 kJ mol⁻¹ M⁻¹ entspricht etwa dem Wert von 3,7 kJ mol⁻¹ M⁻¹ der für ein Protein dieser Größe unter den entsprechenden Bedingungen erwartet wird^{88,89}. Die *m*-Werte aus den Gleichgewichtsübergängen von IF_{SS} und von der IF Domäne innerhalb von SlyD sind nicht vergleichbar, da der Übergang von SlyD einem Zweizustandsmodell folgt und daher die Entfaltung von IF an die Entfaltung der FKBP Domäne gekoppelt ist⁸⁸. Zum Vergleich kann jedoch der *m*-Wert der IF Domäne aus der kinetischen Analyse von SlyD dienen, der mit Hilfe von Doppelsprungexperimenten und dem Denaturierungsmittel GdmCl ermittelt wurde. Anhand des Quotienten der Übergangsmittelpunkte in Harnstoff bzw. GdmCl kann der *m*-Wert des GdmCl-induzierten Übergangs in den entsprechenden *m*-Wert für Harnstoff umgerechnet werden. Der so berechnete *m*-Wert von 3,9 kJ mol⁻¹ M⁻¹ (Amplitudenanalyse) bzw. 2,3 kJ mol⁻¹ M⁻¹ (Analyse der kinetischen *m*-Werte) liegt sehr nahe am experimentell ermittelten *m*-Wert von IF_{SS}⁸⁸.

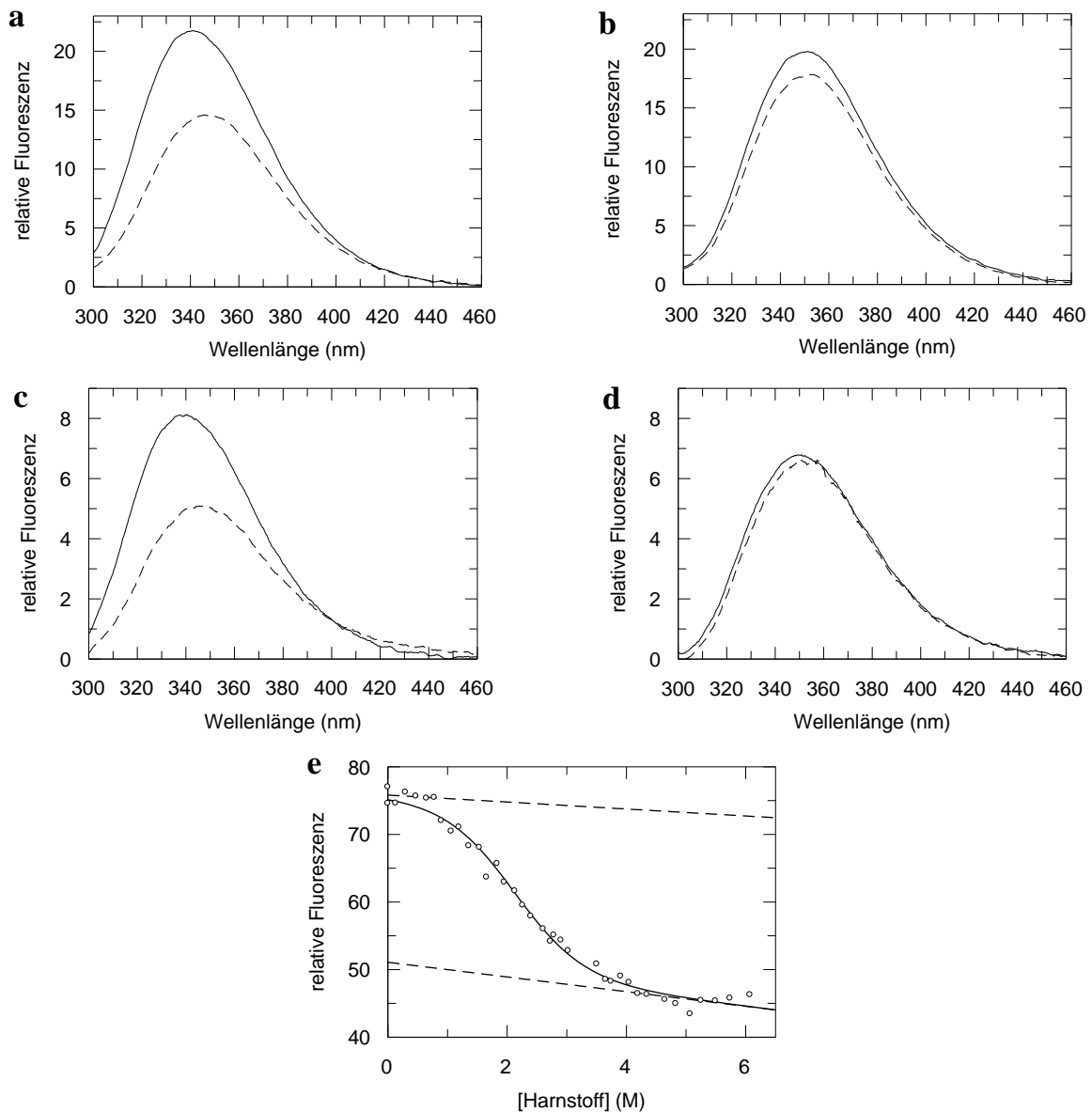


Abbildung 3-28: (a-d) Fluoreszenzspektren von IF_{SS} (durchgezogene Linien) und IF_{SSH} (durchbrochene Linien). Die Spektren wurden nach Anregung bei 280 nm (a, b) und bei 295 nm (c, d) in 0 M (a, c) und 7 M (b, d) Harnstoff aufgezeichnet. Die Proteinkonzentration betrug 1 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,8, 1mM EDTA und für das reduzierte Protein IF_{SSH} zusätzlich 2,5 mM TCEP.

e) Harnstoff-induzierter Gleichgewichtsübergang von IF_{SS}. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz bei 305 nm nach Anregung bei 280 nm als Funktion der Harnstoffkonzentration. Der Übergang wurde bei einer Proteinkonzentration von 1 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0, bei einer Temperatur von 15 °C und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Analyse des Entfaltungsübergangs nach einem Zweizustandsmodell (durchgezogene Linie) ergibt eine Harnstoffkonzentration von 2,1 M am Übergangsmittelpunkt und einen m -Wert von 4 $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$. Die durchbrochenen Linien stellen die Basislinien des nativen bzw. denaturierten Proteins dar.

Von IF_{SSH} konnte kein kooperativer Entfaltungsübergang detektiert werden. Die mit zunehmender Harnstoffkonzentration stetig leicht steigende Fluoreszenz von IF_{SSH} ist vermutlich ein Effekt des Denaturierungsmittels auf die Fluoreszenzeigenschaften der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Die Proteinfluoreszenz der IF Variante

mit Cystein Substitutionen lässt daher Rückschlüsse auf eine konformationelle Faltung von IF_{SS}, nicht aber von IF_{SHSH} zu.

Zur weiteren Analyse der konformationellen Faltung von IF_{SS} und IF_{SHSH} wurden thermisch induzierte Gleichgewichtsübergänge durch Messung des CD Signals (θ) bei 230 nm durchgeführt (siehe Abbildung 3-29).

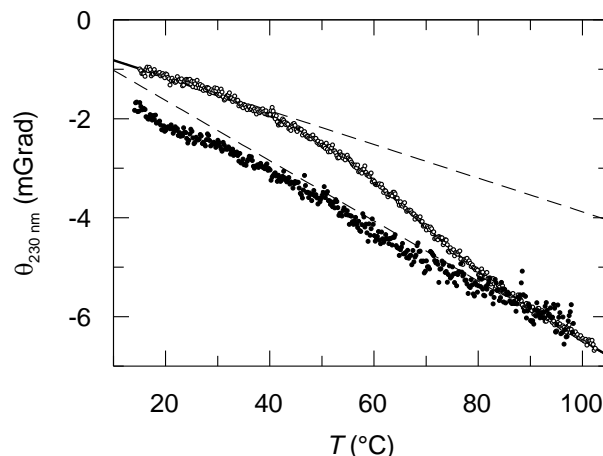


Abbildung 3-29: Vergleich der thermisch induzierten Gleichgewichtsübergänge von IF_{SS} (○) und IF_{SHSH} (●). Der Übergang von IF_{SS} wurde nach einem Zweizustandsmodell ausgewertet (durchgezogene Linie). Die durchbrochenen Linien entsprechen den Basislinien des nativen bzw. des denaturierten Proteins. Die Übergänge wurden bei einer Proteinkonzentration von 1 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0 (bei IF_{SHSH} zusätzlich 1 mM TCEP), einer Schichtdicke von 1 cm und einer Heizrate von 60 °C/h gemessen. Die Entfaltungsübergänge wurden anhand des CD-Signals bei 230 nm verfolgt.

Nur IF_{SS} zeigt einen Entfaltungsübergang mit einer Enthalpie der Entfaltung von 101 kJ mol⁻¹ und einer Temperatur am Übergangsmittelpunkt von 61°C. Das CD Signal von IF_{SHSH} bei Temperaturerhöhung liegt auf der Basislinie des entfalteten IF_{SS}. Die thermische Analyse stützt die Ergebnisse der Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltung und bestätigt, dass nur IF_{SS} konformationell gefaltet ist, nicht aber IF_{SHSH}.

3.5.2 Analyse der Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen von IF_{SS}

Die konformationelle Faltung von IF_{SS} wurde durch Analyse der Rückfaltung und Entfaltung mit Hilfe einer *stopped flow* Apparatur näher untersucht (siehe Abbildung 3-30). IF_{SS} faltet und entfaltet im schnellen Millisekundenbereich, die Äquilibrierungsdauer τ bei Faltung und Entfaltung beträgt nur etwa 5 ms. Der Schnittpunkt der Amplituden sowie die Analyse der Chevronauftragung der apparenten Faltungsraten gemäß einem Zweizustandsmodell zeigen einen Übergangsmittelpunkt von knapp über 2 M Harnstoff. Dieser Wert ist aber aufgrund der sehr schnellen Faltungsreaktionen, die nahe der Auflösungsgrenze der *stopped flow* Apparatur liegen, und des geringen kinetischen m -Wertes der Faltung von etwa 1,2 kJ mol⁻¹M⁻¹ relativ ungenau (zum Vergleich: m -Wert aus der Gleichgewichtsanalyse von IF_{SS}: 4 kJ mol⁻¹M⁻¹). IF_{SHSH} zeigt keine Faltungskinetik, weder unter Rückfaltungs- noch unter Entfaltungsbedingungen.

Der Vergleich der Chevronauftragung der Faltungsreaktionen von SlyD und IF_{SS} zeigt, dass die Entfaltungsreaktionen der IF Domäne in SlyD und isoliertes IF_{SS} im gleichen Zeitbereich ablaufen (Abbildung 3-30e), wobei die durch ein Doppelsprung Experiment bestimmte Rückfaltung der IF Domäne in SlyD etwas schneller abzulaufen scheint. Die Analyse der Faltungskinetik macht damit in Übereinstimmung mit den Daten der Gleichgewichtsübergänge klar, dass die konstruierte Disulfidbrücke IF_{SS} soweit stabilisiert, dass eine konformationelle Faltung möglich ist. Wird die Disulfidbrücke reduziert, fällt die entropische Stabilisierung weg und das Protein entfaltet. Die IF Domäne in SlyD ist dennoch erheblich thermodynamisch stabiler als IF_{SS}⁸⁸. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass im nativen Protein die gefaltete FKBP Domäne die Enden der IF Domäne noch passgenauer positioniert als die künstlich eingeführte Disulfidbrücke.

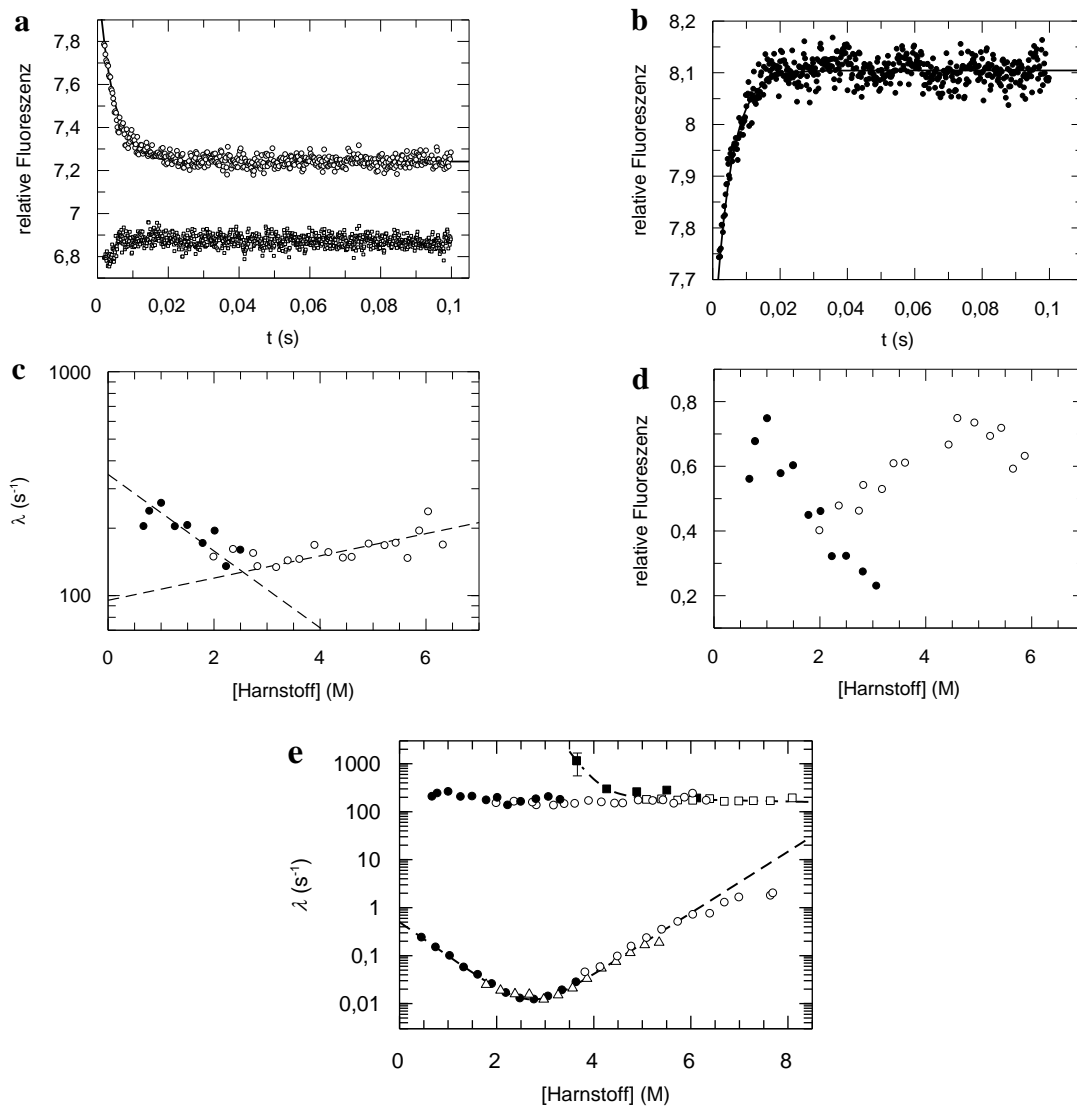


Abbildung 3-30: Entfaltungs- (a) und Rückfaltungsreaktion (b) von IF_{SS} , sowie die Chevronauftragungen der Faltungsraten (c) und die Amplituden der Faltungsreaktionen (d) als Funktion der Harnstoffkonzentration.

Dargestellt ist in (a) die sehr schnelle Entfaltungsreaktion von IF_{SS} in 6 M Harnstoff (○) und zum Vergleich das Fluoreszenzsignal von IF_{SHSH} unter identischen Bedingungen (□), und in (b) die Rückfaltungsreaktion von IF_{SS} in 0,6 M Harnstoff. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Angleich einer monoexponentiellen Funktion an die experimentellen Datenpunkte mit Zeitkonstanten τ von $4,2 \cdot 10^{-3}$ s für die Entfaltungsreaktion und $4,9 \cdot 10^{-3}$ s für die Rückfaltungsreaktion. (c) Chevronauftragung der Entfaltungs- (○) und Rückfaltungsreaktionen von IF_{SS} als Funktion der Harnstoffkonzentration. Die Analyse der Chevronauftragung nach einem Zweizustandsmodell (durchbrochene Linien) ergibt eine extrapolierte Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung k_{UN} von 348 s^{-1} und der Entfaltung k_{NU} von 95 s^{-1} , sowie einen kinetischen m -Wert der Rückfaltung m_{UN} von $-0,39 \text{ M}^{-1}$ und der Entfaltung m_{NU} von $0,11 \text{ M}^{-1}$. Daraus ergibt sich ein Übergangsmittelpunkt von 2,6 M Harnstoff und ein m -Wert von $1,2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$. d) Auftragung der Amplituden der in c) dargestellten Rückfaltungsreaktionen (●) und Entfaltungsreaktionen (○) als Funktion der Harnstoffkonzentration. e) Vergleich der Chevronauftragung von IF_{SS} aus c) mit der Chevronauftragung der Faltungsreaktion für das Zweidomänenprotein SlyD (Entfaltung (○, Δ) und Rückfaltung (●) der FKBP Domäne, Entfaltung (□) und Rückfaltung (■) der IF Domäne)⁸⁸.

Die Faltungsreaktionen wurden an einer *stopped flow* Apparatur anhand der integralen Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Proteinkonzentration betrug nach elfacher Verdünnung $1 \mu\text{M}$ in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0 bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ und wechselnden Harnstoffkonzentrationen.

3.5.3 Oxidative Faltung von IF_{SHSH}

3.5.3.1 Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbA

Bei der IF Domäne ist die konformationelle Faltung strikt an die Ausbildung der Disulfidbrücke gekoppelt. Das macht dieses Protein zu einem wertvollen Substrat zur Analyse der oxidativen Proteinfaltung, sowie deren Katalyse durch Thioloxygenasen. Zur Analyse der oxidativen Faltung und ihrer Katalyse durch Thioloxygenasen, wurde IF_{SS} zunächst durch das starke Reduktionsmittel TCEP zu IF_{SHSH} reduziert und das Reduktionsmittel durch Gelpermeationschromatographie abgetrennt. IF_{SHSH} neigt zur Aggregation und ist nur in geringer Konzentration löslich. Konzentrierte Stammlösungen von IF_{SHSH} wurden daher mit 4,5 M GdmCl versetzt. Die oxidative Faltung von IF_{SHSH} zu IF_{SS} wurde anhand der Fluoreszenz bei 335 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Abbildung 3-31 zeigt, dass keine Oxidation durch Luftsauerstoff von IF_{SHSH} im beobachteten Zeitraum auftritt, das Fluoreszenzsignal bleibt über 585 s konstant. Erst nachdem die Lösung mit einem Gemisch aus 5 mM reduziertem Glutathion (GSH) und 1 mM oxidiertem Glutathion (GSSG) versetzt wurde, ist ein steigendes Fluoreszenzsignal zu detektieren, das einem monoexponentiellen Reaktionsverlauf mit einer Zeitkonstanten von 555 s folgt. Die steigende Fluoreszenz ist das erwartete Signal bei Ausbildung einer Disulfidbrücke und der damit gekoppelten konformationellen Faltung (siehe Abbildung 3-28). Ein Verhältnis von 5 mM GSH zu 1 mM GSSG ist ausreichend um die oxidative Faltung zu initiieren und entspricht in etwa dem physiologischen Verhältnis in Zellkompartimenten mit oxidierendem Milieu⁹⁰. Bei einer 45fachen Verdünnung der konzentrierten Stammlösung aus Puffer mit 4,5 M GdmCl in Puffer ohne GdmCl und ohne Oxidationsmittel ist kein steigendes, sondern lediglich ein fallendes Fluoreszenzsignal mit einer Amplitude von etwa 5 % der Gesamtfluoreszenz (Abbildung 3-31b) detektierbar. Ist im Verdünnungspuffer zusätzlich 5 mM GSSG als Oxidationsmittel vorhanden, ist neben dem fallenden auch ein steigendes Fluoreszenzsignal sichtbar, das der Faltungsreaktion entspricht (Abbildung 3-31c). Die apparente Rate der oxidativen Faltung der IF Domäne setzt sich aus den mikroskopischen Raten der Oxidation der Cysteine und der Rate der konformationellen Faltung zusammen. Die an die Oxidation gekoppelte konformationelle Faltung läuft im Millisekundenbereich ab und ist damit sehr viel schneller als die Oxidationsreaktion (siehe Abbildung 3-30). Deshalb entspricht die apparente Rate in guter Näherung der Geschwindigkeit der Oxidationsreaktion.

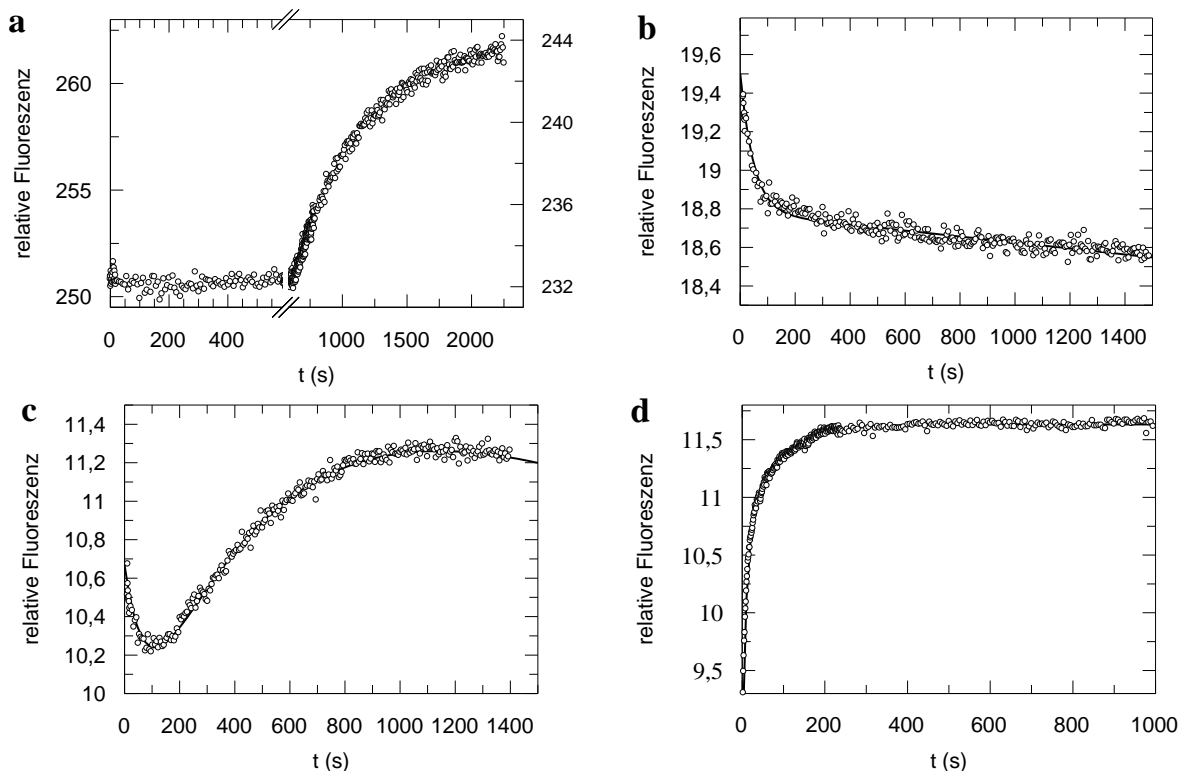


Abbildung 3-31: Oxidative Faltung von IF_{SHSH} zu IF_{SS} . Dargestellt ist jeweils das Fluoreszenzsignal bei 335 nm nach Anregung bei 280 nm als Funktion der Zeit. a) Zu $1 \mu\text{M } IF_{SHSH}$ in $0,1 \text{ M K-P}$, $\text{pH } 7,8$ und 1 mM EDTA wird nach 500 s eine Mischung aus 5 mM GSH und 1 mM GSSG (Endkonzentration) zugegeben. b) IF_{SHSH} wird aus einer Stammlösung ($45 \mu\text{M } IF_{SHSH}$ in $0,1 \text{ M K-P}$, $\text{pH } 7,0$ und 1 mM EDTA und $4,5 \text{ M GdmCl}$) 45fach in $0,1 \text{ M K-P}$, $\text{pH } 7,0$ und 1 mM EDTA verdünnt. c) gleiche Reaktion wie bei b), zusätzlich ist im Verdünnungspuffer 5 mM GSSG enthalten. d) IF_{SHSH} wird aus einer Stammlösung ($45 \mu\text{M } IF_{SHSH}$ in $0,1 \text{ M K-P}$, $\text{pH } 7,0$, 1 mM EDTA und $4,5 \text{ M GdmCl}$) 45fach in $0,1 \text{ M K-P}$, $\text{pH } 7,0$, 1 mM EDTA und $1 \mu\text{M DsbA}$ verdünnt.

Die Ausbildung von Disulfidbrücken stellt ebenso wie die *trans*-nach-*cis* Isomerisierung von Prolinen einen langsamen Schritt der Proteinfaltung dar. Nicht native Faltungsintermediate von Proteinen haben eine erhöhte Neigung zur Bildung von Aggregaten und sind damit potentiell toxisch für Zellen. Daher wird die oxidative Proteinfaltung in lebenden Zellen durch Thioloxygenasen katalysiert⁴⁵. Der Fluoreszenzverlauf der Oxidationsreaktion von IF_{SHSH} durch die bakterielle Thioloxygenase DsbA⁴⁹ ist in Abbildung 3-31d dargestellt. Der Versuchsablauf entspricht dem in Teilabbildung 3-31c, jedoch wurde IF_{SHSH} durch $1 \mu\text{M DsbA}$ anstatt durch das Oxidationsmittel GSSG oxidiert. Da die Tryptophanfluoreszenz von DsbA sensitiv gegenüber dem Redoxzustand des katalytischen CPHC-Motivs ist, wurde die Tryptophan-freie DsbA Variante DsbA W76F W126F⁹¹ (im Folgenden DsbA*) verwendet, um nach Anregung bei 295 nm selektiv das Fluoreszenzsignal der Faltung der IF Domäne aufzeichnen zu können (Abbildung 3-31d). IF_{SHSH} wird durch $1 \mu\text{M DsbA}^*$ erheblich schneller oxidiert als durch 5 mM GSSG . Das steigende Fluoreszenzsignal folgt einem biexponentiellen Kurvenverlauf mit Zeitkonstanten von $0,11 \text{ s}^{-1}$ und $0,013 \text{ s}^{-1}$, wobei die schnelle Reaktion den größeren Anteil an der Gesamtamplitude besitzt. Ein fallendes Fluoreszenzsignal ist nicht zu detektieren, vermutlich weil dieses Signal

durch die schnell steigende Fluoreszenz überlagert wird. Das fallende Fluoreszenzsignal ist nur bei der Verdünnung aus der Stammlösung zu beobachten, es handelt sich somit aller Wahrscheinlichkeit nach um einen Verdünnungseffekt von GdmCl auf IF_{SHSH} . Da dieses Signal bei jeder Reaktion auftritt und zudem bei schnelleren Reaktionen nicht aufgelöst werden kann, wird es für die weiteren Analysen vernachlässigt.

3.5.3.2 Die Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbA* ist abhängig von der Konzentration an DsbA* und dem pH Wert

Die Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbA* umfasst mehrere Reaktionsschritte: Zuerst erfolgt ein nukleophiler Angriff der Thiolatgruppe von IF_{SHSH} an den Cystinen des CPHC-Motivs von DsbA*, worauf ein Heterodisulfid entsteht. In diesem kovalenten Komplex greift die freie Thiolatgruppe der IF Domäne intramolekular am Cystein der IF Domäne nukleophil an und bildet das Disulfid aus. Anschließend dissoziieren reduziertes DsbA* und IF_{SS} voneinander. Der erste Schritt dieser Reaktion ist eine bimolekulare Reaktion und die Reaktionsgeschwindigkeit dementsprechend abhängig von der Konzentration der Reaktionspartner (siehe Abbildung 3-32).

Die Konzentrationsvariation von DsbA* bei gleichbleibender IF_{SHSH} Konzentration zeigt, dass die schnellere der beiden Reaktionsphasen mit steigender DsbA* Konzentration beschleunigt wird, nicht aber die langsame Phase. Dies deutet darauf hin, dass die schnelle Phase die Komplexbildung aus IF_{SHSH} und DsbA* und die langsame Reaktion einen intramolekularen Reaktionsschritt im kovalent verknüpften Komplex bzw. die Dissoziation von IF_{SS} und DsbA* nach erfolgter Oxidation darstellt. Die Amplitudenauswertung (Abbildung 3-32b) zeigt, dass die relativen Amplituden durch die Konzentrationsvariation von DsbA* nicht verändert werden. Da das gesamte Fluoreszenzsignal von der oxidativen Faltung der IF Domäne stammt und bei allen Konzentrationsverhältnissen IF_{SHSH} vollständig oxidiert wird, ist eine Änderung der relativen Amplituden nicht zu erwarten und somit bekräftigt die Amplitudenanalyse die Annahmen aus der Analyse der Raten.

Die Geschwindigkeit der Bildung des gemischten Heterodisulfids aus DsbA* und der IF Domäne ist abhängig vom Protonierungsgrad der Thiolgruppen der IF Domäne, folglich ist dieser Reaktionsschritt vom pH Wert des Puffers abhängig. Zur Identifizierung dieser Reaktionsphase wurde deshalb die Oxidation von IF_{SHSH} mit variierender Konzentration an DsbA* bei unterschiedlichen pH Werten durchgeführt (Abbildung 3-32c). Bei allen drei pH Werten (6,75, 7,8 und 8,6) nimmt die Geschwindigkeit der schnellen Reaktion linear mit der DsbA* Konzentration und zudem mit steigendem pH Wert zu, während die Geschwindigkeit der langsamen Phase unabhängig von der Konzentration an DsbA* und dem pH Wert ist (siehe Abbildung 3-32d).

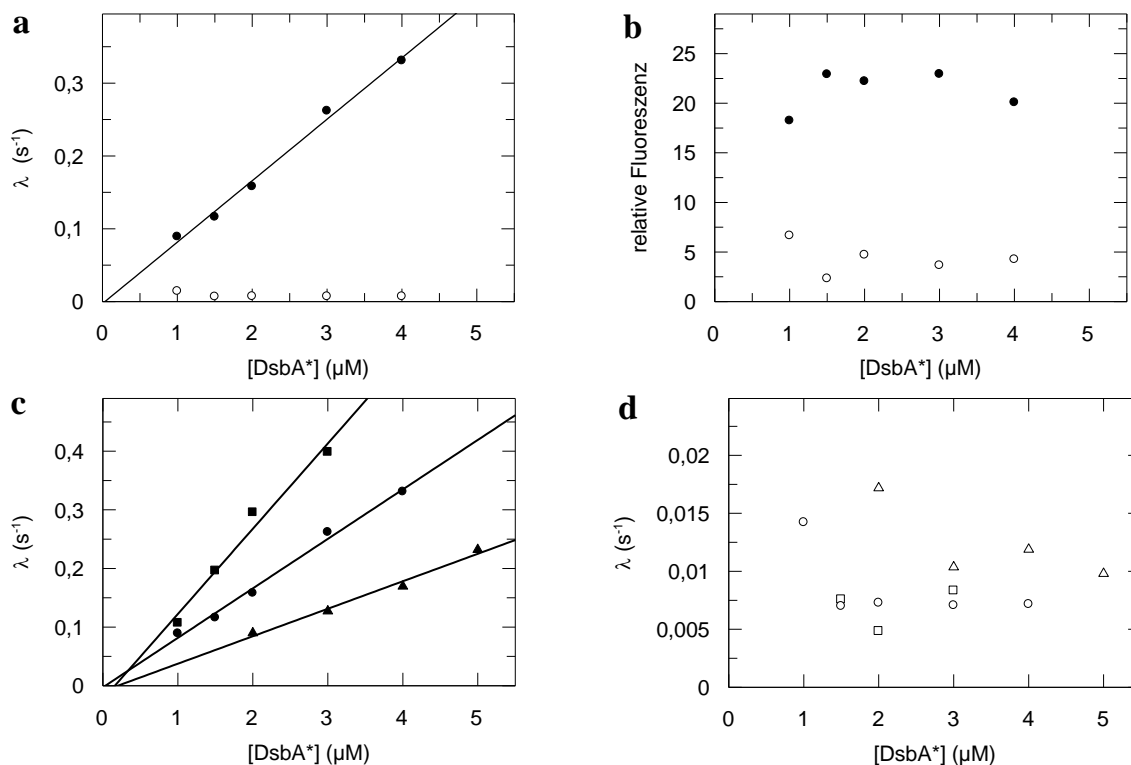


Abbildung 3-32: Oxidation von IF_{SSH} zu IF_{SS} durch DsbA*. a) Oxidation von 1 μM IF_{SSH} durch variierende Konzentrationen an DsbA* in 0,1 M K-P, pH 7,8, 1 mM EDTA. Dargestellt sind die schnellen (gefüllte Symbole) und langsamen (offene Symbole) apparenten Reaktionsraten als Funktion der DsbA* Konzentration. b) Gezeigt sind die Amplituden der schnellen (gefüllte Symbole) und der langsamen (offene Symbole) Oxidationsreaktionen als Funktion der DsbA* Konzentration. c, d) Oxidation von 1 μM IF_{SSH} durch variierende Konzentrationen an DsbA* in 0,1 M K-Phosphat, 1 mM EDTA bei pH 8,6 (Vierecke), pH 7,8 (Kreise) und pH 6,75 (Dreiecke). Dargestellt sind in c) die schnellen und in d) die langsamen apparenten Reaktionsraten der Oxidation von IF_{SSH} als Funktion der DsbA* Konzentration.

Es wurde die Fluoreszenzänderung bei der oxidativen Faltung von IF_{SSH} bei 335 nm nach Anregung bei 295 nm nach 45facher Verdünnung in 0,1 M K-Phosphat, pH 6,75, 7,8 und 8,6, 1 mM EDTA beobachtet. An die experimentellen Daten wurden monoexponentielle Funktionen angeglichen und so die Raten bestimmt

Bei der Auftragung der Raten der schnellen Reaktion als Funktion der DsbA* Konzentration ist die Steigung der Regressionsgeraden durch die Datenpunkte ein Maß für die Effizienz mit der DsbA* IF_{SSH} oxidiert, analog zum k_{cat}/K_M -Wert anderer Enzyme. Die Effizienz der Oxidation von IF_{SSH} durch DsbA* zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert und nimmt mit steigendem pH Wert im Bereich von 6,75 bis 8,6 zu: Die Steigung der Regressionsgeraden κ beträgt $0,047 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei pH 6,75, $0,084 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei pH 7,8 und $0,145 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei pH 8,6. Das katalytische CPHC-Motiv von DsbA* liegt oxidiert vor, deshalb ist nur der Protonierungsgrad der Thiolgruppen der Cysteine von IF_{SSH} pH abhängig. Da diese Gruppen im entfalteten Protein exponiert vorliegen, sollten sie einen pK_a -Wert von 8,35 aufweisen, analog dem von Cystein in Lösung. Ansatzweise zeigt die Auftragung der Effizienz der Oxidationsreaktion als Funktion des pH Wertes einen sigmoiden Kurvenverlauf im erwarteten Bereich um pH 8 (Abbildung 3-33). Eine Ausdehnung des Messbereichs auf extremere pH Werte ist aufgrund der Stabilität der beteiligten Proteine nicht möglich.

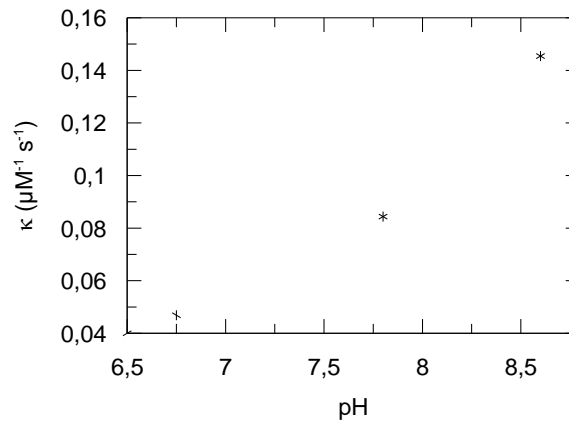


Abbildung 3-33: Darstellung der Steigungen der Regressionsgeraden (κ) aus Abbildung 3-32c als Funktion des pH Wertes.

3.5.3.3 Fazit der Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbA*

Die Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbA* kann über die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz der IF Domäne verfolgt werden. Es sind zwei Reaktionsphasen detektierbar, die sich um eine Größenordnung in ihrer Geschwindigkeit unterscheiden. Die schnelle Reaktion, die den größeren Anteil an der Gesamtfluoreszenzänderung ausmacht, zeigt eine ausgeprägte Abhängigkeit von der DsbA* Konzentration und dem pH Wert. Damit entspricht diese Reaktion sehr wahrscheinlich der Ausbildung des Heterodisulfids aus DsbA* und der IF Domäne. Die langsamere Reaktion zeigt weder eine Abhängigkeit von der DsbA* Konzentration noch vom pH Wert. Deshalb entspricht diese Reaktion vermutlich der Dissoziation des reduzierten DsbA* von IF_{SS}.

3.5.3.4 Oxidation von IF_{SHSH} durch PDI

In Eukaryoten wird die oxidative Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die Proteindisulfidisomerase (PDI) katalysiert. PDI besitzt eine duale Funktion: Zum Einen das Einführen von Disulfidbrücken in Substratproteine, zum Anderen die Isomerisierung von fehlverbrückten Disulfiden³⁶.

Analog zur Oxidation durch die bakterielle Thioloxidase DsbA (siehe Abschnitt 3.5.3.2) wurde die Oxidation von IF_{SHSH} durch PDI aus *Saccharomyces cerevisiae* anhand der Fluoreszenzänderung der IF Domäne analysiert. Auch bei der Oxidation durch PDI sind zwei Reaktionsphasen detektierbar. Die schnelle Reaktionsphase läuft in der Totzeit der manuellen Mischung ab und wurde daher mit einer *stopped flow* Apparatur untersucht. Die langsame Reaktionsphase wurde nach manueller Mischung an einem Fluoreszenzspektrometer beobachtet. Analog zur Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbA* zeigt die schnelle Reaktionsphase der Oxidation durch PDI eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Konzentration an PDI und vom pH Wert (Abbildung 3-34a). Diese Reaktion ist deutlich schneller als bei gleicher effektiver Konzentration der Thioloxidase DsbA*. PDI besitzt zusätzlich zu den beiden katalytischen Domänen noch zwei Chaperondomänen (siehe 1.3.3.2). Vermutlich führen diese

beiden Chaperondomänen zu einer lokalen Konzentrationserhöhung von entfaltetem Substrat und so zu einer Beschleunigung der Bildung des kovalenten Komplexes aus PDI und der IF Domäne. DsbA besitzt keine Chaperonaktivität, obwohl eine hydrophobe Substratbindungsstelle postuliert wird⁴⁹. Ein ähnlicher Effekt in der Beschleunigung der Enzymaktivität durch eine zusätzliche Chaperondomäne als Substratbindungsstelle wurde bei Peptidyl-Prolylisomerasen beobachtet^{32, 44}.

Wie schon vorher bei der Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbA* beobachtet, ist die langsame Reaktion ebenfalls unabhängig von der Konzentration an PDI, wie der Vergleich des Fluoreszenzsignals der Oxidation von 1 μM IF_{SHSH} durch 0,5 bzw. 3 μM PDI zeigt (Abbildung 3-34b). PDI besitzt zwei aktive Zentren pro Molekül, daher ist eine Stöchiometrie von zwei zu eins für eine vollständige Oxidation der IF Domäne ausreichend.

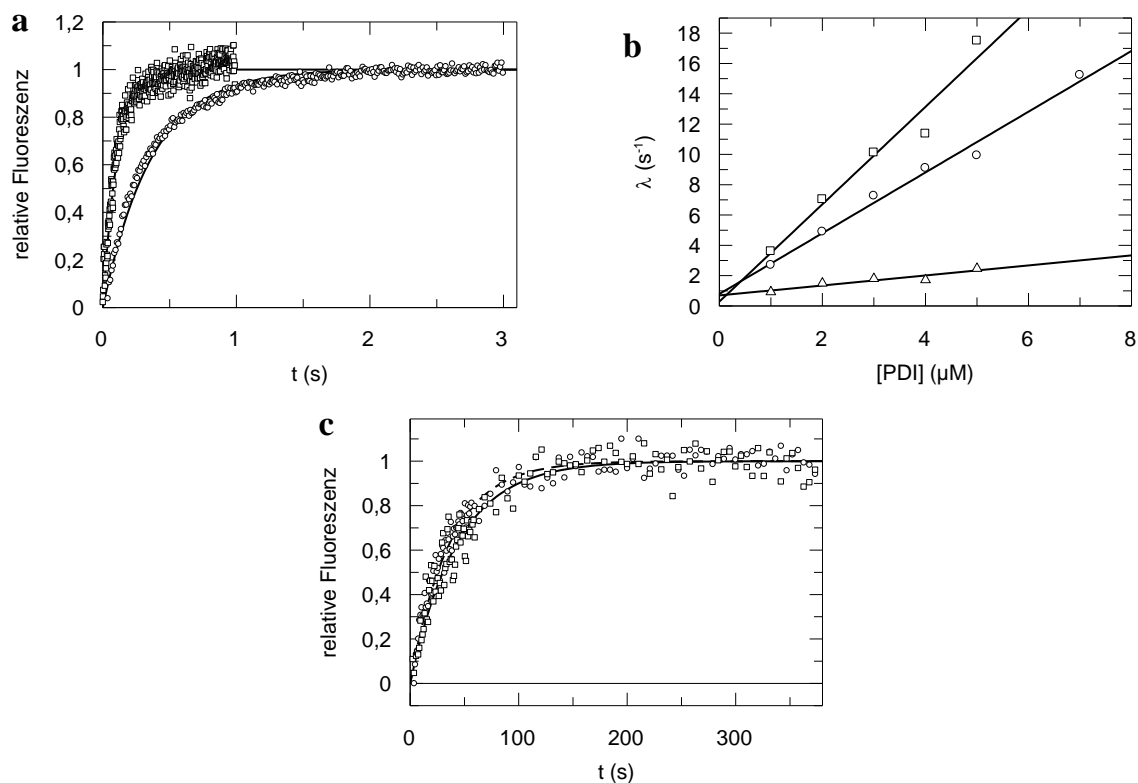


Abbildung 3-34: Oxidation von IF_{SHSH} durch PDI. a) Vergleich der normierten Fluoreszenzsignale der schnellen Reaktion bei der Oxidation von 1 μM IF_{SHSH} durch 1 μM (Kreise) bzw. 4 μM PDI (Vierecke) in 0,1 M K-P, 1 mM EDTA bei pH 7,45. Die integrale Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm wurde an einer *stopped flow* Apparatur aufgezeichnet. Die durchgezogenen Linien entsprechen monoexponentiellen Funktionen mit Zeitkonstanten von 0,3 bzw. 0,1 s, die an die experimentellen Daten angeglichen wurden. b) Es sind die Reaktionsraten der schnellen Reaktionsphase bei der Oxidation von 1 μM IF_{SHSH} durch variierende Konzentrationen an PDI in 0,1 M K-P, 1 mM EDTA bei pH 7,8 (Vierecke), pH 7,45 (Kreise) und pH 6,3 (Dreiecke) als Funktion der PDI Konzentration dargestellt. Die integrale Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm wurde an einer *stopped flow* Apparatur aufgezeichnet. An die experimentellen Daten wurde eine monoexponentielle Funktion angeglichen und die Raten bestimmt. Die Steigungen der Regressionsgeraden durch die Datenpunkte betragen 0,33 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei pH 6,3, 2,0 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei pH 7,45 und 3,21 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei pH 7,8. c) Vergleich der normierten Fluoreszenzsignale der Oxidation von 1 μM IF_{SHSH} durch 0,5 μM (Kreise) und 3 μM PDI (Vierecke). Die durchgezogenen Linien entsprechen monoexponentiellen Funktionen mit Zeitkonstanten von 50s, die an die experimentellen Daten angeglichen wurden. Es wurde das Fluoreszenzsignal bei 335 nm nach Anregung bei 295 nm in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,8 und 1 mM EDTA aufgezeichnet.

Insgesamt zeigt die Analyse der Oxidation von IF_{SHSH} durch PDI ein ähnliches Reaktionsschema wie mit DsbA* als Oxidationsmittel: In einer schnellen Reaktion, die abhängig von der Konzentration und dem pH Wert ist, wird der kovalente Komplex aus PDI und der IF Domäne gebildet. In einer nachgelagerten Reaktion dissoziieren PDI und IF_{SS} voneinander. Allerdings oxidiert PDI IF_{SHSH} wesentlich effizienter als DsbA*, vermutlich aufgrund der zusätzlichen Chaperondomänen von PDI, die der Substratbindung dienen.

3.5.3.5 Oxidation von IF_{SHSH} durch das PDI Konstrukt PDI a'c

PDI besitzt einen komplexen Aufbau aus vier Thioredoxindomänen: Zwei katalytische Domänen umschließen zwei Chaperondomänen. Zusätzlich hat PDI eine C-terminale Extension mit ungeklärter Funktion (siehe 1.3.3.2)³⁶. Die bakterielle Thioloxidase DsbA besteht dagegen nur aus einer katalytischen Thioredoxindomäne und einer zusätzlichen kleinen hydrophoben Bindungsstelle, die von zwei Helices gebildet wird. Analog zur Struktur von DsbA wurde ein PDI Konstrukt erstellt, das nur die C-terminale katalytische a' Domäne inklusive C-terminaler Extension (im Folgenden PDI a'c, Aminosäuren 360-511) beinhaltet. Durch die Charakterisierung der Oxidation von IF_{SHSH} durch PDI a'c wird evaluiert, ob eine Bindungsstelle für nicht-native Substratmoleküle für eine effiziente Oxidation notwendig ist.

Bei der Oxidation von IF_{SHSH} durch PDI a'c ist nur eine Reaktionsphase nach manueller Mischung zu beobachten. Diese Reaktionsphase ist konzentrationsabhängig und stellt damit eine Reaktion zweiter Ordnung dar. Die Raten dieser Reaktion liegen in dem Zeitbereich, in dem die Dissoziation von IF_{SS} von PDI bzw. DsbA stattfindet. Wahrscheinlich ist bei der Oxidation von IF_{SHSH} durch PDI a'c die Bildung des Komplexes relativ langsam und so experimentell nicht getrennt von der Dissoziation der beiden Moleküle zu beobachten. Die Steigung der Regressionsgeraden durch die apparenten Reaktionsraten, die ein Maß für die Effizienz der Oxidation durch PDI a'c darstellt, beträgt 0,01 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Effizienz der Oxidationsreaktion ist für PDI a'c damit etwa um eine Größenordnung geringer als bei der Oxidation durch DsbA*, das keine spezielle Substratbindungsdomäne besitzt (siehe Abbildung 3-35) und zwei Größenordnungen niedriger als bei der Oxidation durch PDI, die zwei Chaperondomänen zur Substratbindung aufweist.

Diese Daten implizieren, dass die Effizienz einer Thioloxidase neben dem Reduktionspotential der katalytischen Cysteinreste maßgeblich durch die Fähigkeit zur Bindung nicht nativer Substratmoleküle bestimmt wird und weniger durch die Anzahl aktiver Zentren. Die Bindung von nicht nativen Substraten durch Chaperondomänen erhöht auch bei anderen Faltungshelfern die Katalyseeffizienz, wie Jakob *et al.* für Peptidyl-Prolylisomerasen zeigen konnten⁴⁴.

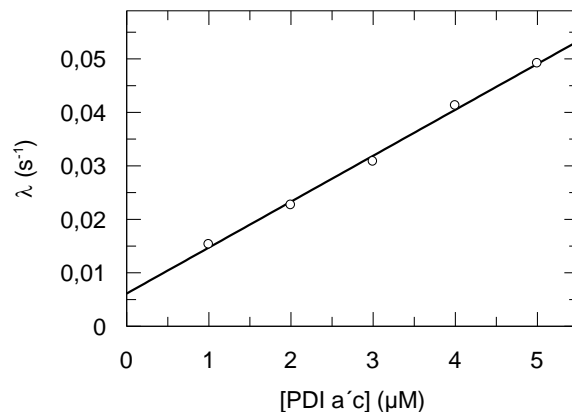


Abbildung 3-35: Oxidation von 1 μM IF_{SHSH} durch variierende Konzentrationen an PDI a'c. Dargestellt sind die apparenten Raten der Oxidationsreaktion als Funktion der PDI a'c Konzentration. Es wurde die Fluoreszenzänderung von IF_{SHSH} bei 335 nm nach Anregung bei 295 nm nach 45facher Verdünnung in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,8, 1 mM EDTA beobachtet. An die experimentellen Daten wurden monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Raten bestimmt. Die Regressionsgerade durch die Datenpunkte hat eine Steigung von $0,01 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

3.5.3.6 Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC

Während PDI im endoplasmatischen Retikulum eine duale Funktion besitzt, nämlich die einer Thioloxidase und die einer Isomerase, sind diese Funktionen in Prokaryoten auf zwei Proteine verteilt. DsbA ist die primäre Thioloxidase (siehe Abschnitt 3.5.3.1) und DsbC wird die Isomeraseaktivität zugeschrieben. Auffällig ist die strukturelle Analogie zwischen DsbC und PDI. Beide besitzen eine U-förmige Struktur (siehe 1.3.3.2), bei der sich jeweils terminal zwei redoxaktive Thioeredoxindomänen befinden, die eine ausgedehnte hydrophobe Furche mit Chaperoneigenschaften zur Substratbindung einschließen. Im Gegensatz zur monomeren PDI ist DsbC ein Homodimer. Die Wechselwirkung der beiden Monomere findet über die Ausbildung eines intermolekularen β -Faltblattes zwischen den Chaperondomänen statt.

Analog zur Oxidation durch die bakterielle Thioloxidase DsbA (Abschnitt 3.5.3.2) und die eukaryotische Thioloxidase/Isomerase PDI (Abschnitt 3.5.3.3) wurde die Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC anhand der Fluoreszenzänderung der IF Domäne analysiert. *In vivo* besitzt DsbC hauptsächlich die Funktion einer Reduktase, liegt also in reduzierter Form vor⁹². Da der Kontakt mit Luftsauerstoff während der Proteinreinigung nicht ausreichend ist um DsbC zu oxidieren, wurde gereinigtes DsbC mit 5 mM GSSG inkubiert, welches nach Ablauf der Oxidationsreaktion durch Gelpermeationschromatographie abgetrennt wurde.

Bei der Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC ist nur eine schnelle Reaktionsphase zu beobachten, die in der Totzeit manueller Mischung abläuft und deshalb an einer *stopped flow* Apparatur verfolgt wurde. Analog zur schnellen Reaktionsphase der Oxidation durch PDI ist diese Reaktion abhängig von der Konzentration der Reaktionspartner sowie dem pH Wert des Puffers (Abbildung 3-36).

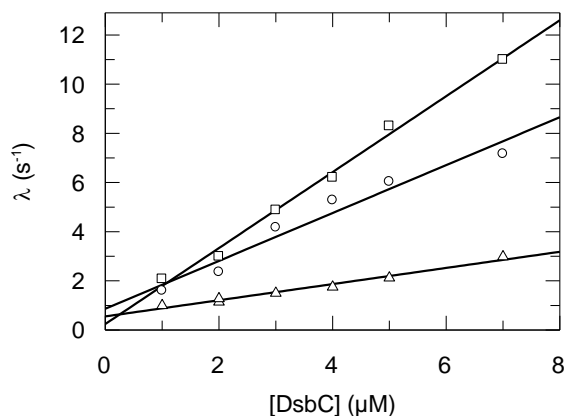


Abbildung 3-36: Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC. Es sind die Reaktionsraten der Oxidation von 1 μM IF_{SHSH} durch variierende Konzentrationen an DsbC in 0,1 M K-P, 1 mM EDTA bei pH 7,8 (Vierecke), pH 7,45 (Kreise) und pH 6,3 (Dreiecke) als Funktion der DsbC Konzentration dargestellt. Die integrale Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 295 nm wurde an einer *stopped flow* Apparatur aufgezeichnet. An die experimentellen Daten wurden monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Raten bestimmt. Die Steigungen der Regressionsgeraden durch die Datenpunkte betragen 0,33 μM⁻¹s⁻¹ bei pH 6,3, 0,97 μM⁻¹s⁻¹ bei pH 7,45 und 1,6 μM⁻¹s⁻¹ bei pH 7,8.

Oxidiertes DsbC ist in der Lage IF_{SHSH} effektiver zu oxidieren als die Thioloxidase DsbA, vermutlich da DsbC (ebenso wie PDI) eine große hydrophobe Furche mit Chaperon-Eigenschaften aufweist, die nicht native Substratmoleküle effizient bindet und so die lokale Konzentration am aktiven Zentrum erhöhen kann.

Eine langsame, konzentrationsunabhängige Reaktion wurde bei DsbC nicht beobachtet. Möglicherweise erfolgen oxidative Faltung und Dissoziation von IF_{SS} und DsbC sehr schnell und können deshalb nicht getrennt von der Bildung des Komplexes beobachtet werden, oder die Dissoziation von DsbC und IF_{SS} ist spektroskopisch nicht nachweisbar.

3.5.3.7 Oxidation von IF_{SHSH} durch ein DsbC *single chain* Konstrukt

a) Konstruktion des DsbC *single chain* Konstrukts

DsbC besitzt zwei aktive Zentren pro nativem Molekül. Zur Analyse der Bedeutung der beiden aktiven Zentren für die Thioloxidaseaktivität ist es notwendig, ein aktives Zentrum im Homodimer durch Mutagenese zu inaktivieren. Dies ist elegant durch die kovalente Verknüpfung der beiden Monomere im Homodimer möglich. Der Abstand zwischen dem C-Terminus des ersten Monomers und dem N-Terminus des zweiten Monomers beträgt in der Kristallstruktur knapp 32 Å. In einem vollständig gestreckten Peptid beträgt die Länge des Peptidrückgrates etwa 2,5 Å pro Aminosäure. Die Auswahl der Linkerlänge ist kritisch, da ein zu kurzer Linker die Flexibilität des Moleküls einschränken bzw. die Struktur des Moleküls verändern kann. Ein zu langer Linker wiederum könnte mit Substratbindungsstellen interagieren und eine effiziente Bindung von Substratmolekülen beeinträchtigen.

Zur Auswahl einer geeigneten Linkerlänge wurden einkettige (*single chain*) DsbC Konstrukte mit Linkerlängen von 14, 17 und 20 Aminosäuren (DsbC-sc-14, DsbC-sc-17 und DsbC-sc-20) erstellt. Die eingeführte Aminosäuresequenz orientiert sich stark an der

natürlichen Linkersequenz vom G3P des Phagen fd (Abschnitt 3.2), die schon erfolgreich für andere *single chain* Konstrukte eingesetzt wurde⁵⁵. Der Einfluss des Linkers auf die thermodynamische Stabilität der Konstrukte wurde anhand von GdmCl-induzierten Gleichgewichtsübergängen untersucht (Abbildung 3-37).

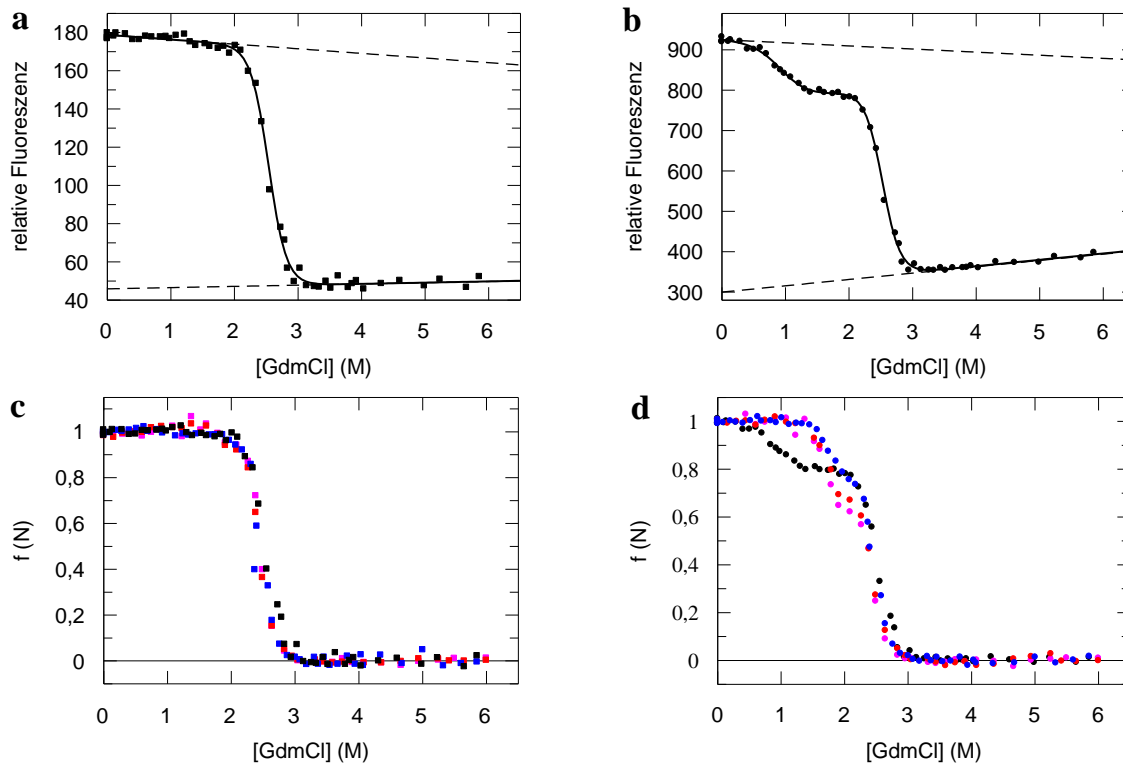


Abbildung 3-37: GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergänge von DsbC und den *single chain* Konstrukten. a, b) Dargestellt ist die Fluoreszenz von DsbC bei 320 nm nach Anregung bei 295 nm (a) bzw. bei 315 nm nach Anregung bei 280 nm (b) als Funktion der GdmCl-Konzentration. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich gemäß einem Zweizustandsmodell (a) bzw. einem Dreizustandsmodell (b) an die experimentellen Daten. c, d) Dargestellt ist der Anteil nativen Proteins von DsbC (schwarz), DsbC-sc-14 (magenta), DsbC-sc-17 (rot) und DsbC-sc-20 (blau) als Funktion der GdmCl Konzentration. Das Fluoreszenzsignal bei 320 nm nach Anregung bei 295 nm wurde gemäß eines Zweizustandsmodells (c) und das Fluoreszenzsignal bei 315 nm nach Anregung gemäß einem Dreizustandsmodell (d) ausgewertet. Alle Gleichgewichtsübergänge wurden mit 1 μ M Protein in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,8, 1 mM EDTA bei 20 °C und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die thermodynamischen Parameter der Übergänge sind in Tabelle 3-5 zusammengestellt.

In Abbildung 3-37a/b ist der GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergang von DsbC dargestellt. Wie bei Ke *et al.*⁹³ beschrieben, folgt das Fluoreszenzsignal bei 320 nm nach Anregung bei 295 nm einem Zweizustandsmodell. Dieser Übergang spiegelt die konformationelle Entfaltung der Thioredoxindomäne wieder. Nach Anregung bei 280 nm ist zusätzlich zur Entfaltung der Thioredoxindomäne ein weiterer Übergang bei geringerer GdmCl Konzentration zu beobachten, der die Dissoziation des Homodimers reflektiert. Dieser kann detektiert werden, da während der Dissoziation der Energietransfer von Tyrosinen in der Dimerisierungsregion auf Tryptophane in der Thioredoxindomäne abnimmt. Der Vergleich der Stabilitäten von DsbC-sc-14, DsbC-sc-17 und DsbC-sc-20 zeigt, dass die Stabilität der Thioredoxindomänen durch das Einbringen des Linkers kaum beeinflusst ist. Die Dissoziation

der Domänen ist jedoch bei allen drei *single chain* Konstrukten von 0,95 M GdmCl des Wildtypproteins auf 1,7 M GdmCl verschoben (siehe Abbildung 3-37 und Tabelle 3-5). Die Dissoziation (bzw. Assoziation) ist eine konzentrationsabhängige Reaktion. Deshalb können die thermodynamischen Parameter der intermolekularen Assoziation von wildtypischem DsbC nicht mit denen der intramolekularen Assoziation der *single chain* Varianten verglichen werden und folglich wurde in Tabelle 3-5 für die Gleichgewichtsentfaltung nur die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt angegeben. Würde die Konzentration von wildtypischen DsbC erhöht, würde sich der Übergang zu höheren GdmCl-Konzentrationen verschieben. Alle *single chain* Konstrukte zeigen einen kooperativen Entfaltungsübergang und die gleiche thermodynamische Stabilität, alle drei Linkerlängen stabilisieren den Komplex also etwa gleich gut.

Tabelle 3-5: Thermodynamische Parameter der GdmCl-induzierten Gleichgewichtsübergänge von DsbC, DsbC-sc-14, DsbC-sc-17 und DsbC-sc-20

	Fluoreszenzsonde						
	Ex: 295 nm / Em: 320 nm			Ex: 280 nm / Em: 315 nm			
	<i>m</i>	$\Delta G^{20^\circ\text{C}}$	[GdmCl] _M	1. Übergang		2. Übergang	
[GdmCl] _M				<i>m</i>	$\Delta G^{20^\circ\text{C}}$	[GdmCl] _M	
DsbC	17,4	44,1	2,54	0,95	17,6	44,4	2,53
DsbC-sc-14	24,3	60,1	2,46	1,69	29,1	71,9	2,47
DsbC-sc-17	21,4	52,5	2,44	1,70	22,3	54,9	2,47
DsbC-sc-20	18,2	44,4	2,44	1,72	20,3	50,4	2,47

Für die Entfaltung der Thioeredoxindomäne ist jeweils der *m*-Wert des Übergangs ($\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$), die freie Enthalpie des Übergangs $\Delta G^{20^\circ\text{C}}$ (kJ mol^{-1}), die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmCl}]_M$ (M) und für die Dissoziationsreaktion nur die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmCl}]_M$ (M) angegeben. Die GdmCl-induzierten Gleichgewichtsübergänge wurden mit je 1 μM DsbC, DsbC-sc-14, DsbC-sc-17 und DsbC-sc-20 in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,8, 1 mM EDTA bei 20 °C durchgeführt. Der Verlauf des Fluoreszenzsignals bei 320 nm nach Anregung bei 295 nm wurde gemäß eines Zweizustandsübergangs, der des Fluoreszenzsignals bei 315 nm nach Anregung bei 280 nm gemäß eines Dreizustandsübergangs ausgewertet.

b) Die Oxidaseaktivität der *single chain* Konstrukte ist unabhängig von der Linkerlänge

Der Einfluss der Linkerlänge auf die Funktionalität wurde getestet, indem die Geschwindigkeit der Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC, DsbC-sc-14, DsbC-sc-17 und DsbC-sc-20 nach Oxidation der DsbC Konstrukte durch GSSG verglichen wurde. Alle DsbC Konstrukte oxidieren IF_{SHSH} exzellent, während in der Kontrollreaktion ohne DsbC keine Änderung des Fluoreszenzsignals zu beobachten ist. Die Länge des Linkers hat dabei keinen Einfluss auf die Aktivität (siehe Abbildung 3-38), für die Geschwindigkeit der Oxidation von IF_{SHSH} ist es unerheblich, ob DsbC, DsbC-sc-14, DsbC-sc-17 oder DsbC-sc-20 das Oxidationsmittel darstellt.

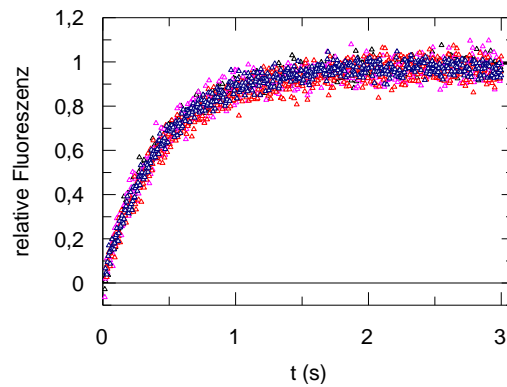


Abbildung 3-38: Oxidation von $1 \mu\text{M}$ IF_{SHSH} durch jeweils $1 \mu\text{M}$ DsbC (schwarz), DsbC-sc-14 (magenta), DsbC-sc-17 (rot) und DsbC-sc-20 (blau). Es wurden die gleichen effektiven Konzentrationen eingesetzt. Dargestellt ist das normierte Fluoreszenzsignal als Funktion der Zeit. Das Fluoreszenzsignal folgt bei allen Reaktionen einem monoexponentiellen Reaktionsverlauf mit einer Rate von etwa $2,2 \text{ s}^{-1}$. Es wurde die integrale Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 295 nm bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ in $0,1 \text{ M}$ K-Phosphat, $\text{pH } 7,8$, 1 mM EDTA an einer *stopped flow* Apparatur aufgezeichnet.

Die Produkte der Oxidationsreaktion wurden exemplarisch für DsbC-sc-17 als Oxidationsmittel anhand einer SDS-PAGE analysiert. Nach einer Reaktionsdauer von 10 s wurde dem Reaktionsansatz (sowie der IF_{SHSH} Referenz) zur Sättigung freier Thiolgruppen 10 mM Iodacetamid zugegeben. Die Weite der Laufstrecke von oxidiertem und reduziertem DsbC-sc-17 ist gleich, nicht jedoch für die IF Domäne, bei der IF_{SS} apparent die Laufweite eines knapp 5 kDa kleineren Proteins aufweist als IF_{SHSH}. Der Vergleich des Reaktionsansatzes von DsbC und IF_{SHSH} zeigt, dass bereits nach einer Reaktionsdauer von zehn Sekunden die IF Domäne oxidiert vorliegt. Dieses Ergebnis stimmt mit der *stopped flow* Messung (Abbildung 3-39) überein, die bereits nach drei Sekunden keine Änderung des Fluoreszenzsignals mehr zeigt. Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass DsbC, welches *in vivo* vor allem eine Reduktase ist, unter den vorliegenden Bedingungen als Thioloxidase hochaktiv ist.

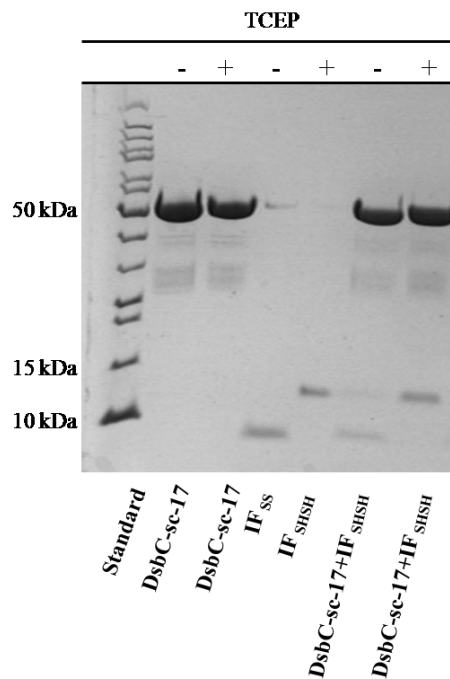


Abbildung 3-39: Analyse der Reaktionsprodukte der Oxidation von IF_{SSH} durch DsbC-sc-17 anhand einer SDS-PAGE. Es sind von links nach rechts der Molekulargewichtsmarker, DsbC-sc-17, IF_{SS}, sowie der Reaktionsansatz nach Inkubation von 10s jeweils mit und ohne Zugabe von TCEP aufgetragen.

c) Kristallisation und Strukturaufklärung von DsbC-sc-17 mit nur einem aktiven Zentrum

Da die *single chain* Konstrukte mit allen drei Linkerlängen die gleichen funktionalen und thermodynamischen Eigenschaften aufwiesen, wurde mit der Variante der mittleren Linkerlänge, DsbC-sc-17, weitergearbeitet. In diesem Konstrukt wurden die Cysteine des redoxaktiven CGYC-Motivs der C-terminalen Thioredoxidomäne gegen Alanine ersetzt (im Folgenden DsbC-sc-17* genannt). DsbC-sc-17* konnte kristallisiert werden. In einer Kooperation mit Dr. R.P. Jakob (AG Prof. N. Ban, ETH Zürich) wurde die Struktur mithilfe der Struktur des reduzierten DsbC (PDB-Eintrag 1TJD, Auflösung 2,5 Å) phasiert und mit einer Auflösung bis 2,3 Å gelöst. Eine Tabelle mit der Datenstatistik der Kristallstruktur findet sich im Anhang (Tabelle 9-7). Der Vergleich der Strukturen von DsbC-sc-17* und DsbC zeigt, dass die kovalente Verknüpfung des Homodimers kaum Einfluss auf die Struktur hat (Abbildung 3-40). Der Linker ist bewusst flexibel gewählt worden und dementsprechend in der Struktur nicht aufgelöst.

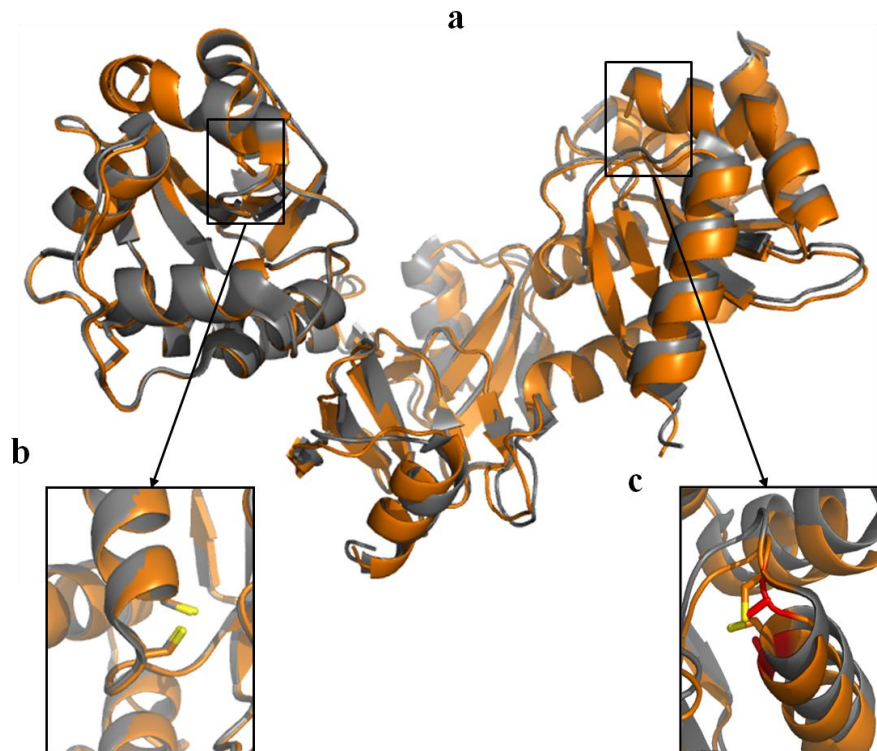


Abbildung 3-40: a) Überlagerung der Kristallstrukturen von DsbC-sc-17* (orange) und reduziertem DsbC (grau, PDB-Eintrag 1TJD) in Bänderdarstellung. b) Vergrößerte Ansicht des N-terminalen CGYC-Motivs der überlagerten Strukturen, wobei die Seitenkettenreste von Cysteinen des CGYC-Motivs im Stäbchenmodell dargestellt sind und Schwefelatome gelb markiert wurden. c) Vergrößerte Ansicht des C-terminalen aktiven Zentrums der überlagerten Strukturen. Die Seitenkettenreste der Cysteine des CGYC-Motivs sind im Stäbchenmodell dargestellt und die Schwefelatome gelb markiert. In DsbC-sc-17* sind diese Cysteine durch Alanine ersetzt. Diese sind in der Vergrößerungsansicht ebenfalls im Stäbchenmodell dargestellt und rot eingefärbt. Die Abbildungen wurden mit PyMOL (DeLano Scientific, 2006) erstellt.

d) Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC-sc-17*

Analog zur Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC (siehe Abschnitt 3.5.3.5) wurde die Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC-sc-17* anhand der integralen Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm durch variierende Konzentrationen an oxidiertem DsbC-sc-17* bei unterschiedlichen pH Werten analysiert. Auch mit nur einem aktiven Zentrum ist DsbC-sc-17* in der Lage, IF_{SHSH} effizient zu oxidieren. In Abbildung 3-41 sind die Raten der einzelnen Reaktionen als Funktion der DsbC-sc-17* Konzentration aufgetragen. Zum Vergleich sind die analogen Daten der Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC bei pH 7,8 eingezeichnet. Abbildung 3-41 und der Vergleich mit Abbildung 3-36 zeigen, dass sich die Raten der Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC-sc-17* von der Oxidation durch DsbC praktisch nicht unterscheiden.

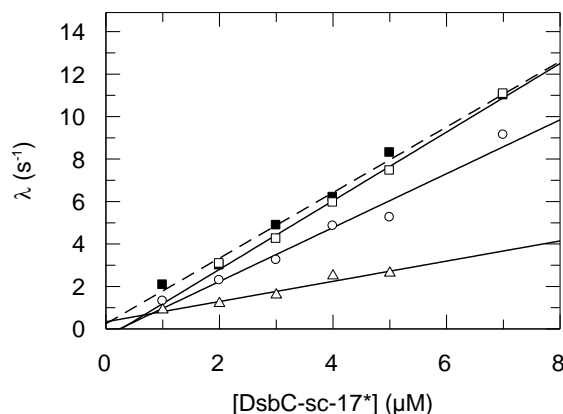


Abbildung 3-41: Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC-sc-17*. Es sind die apparenten Reaktionsraten der Oxidation von $1 \mu\text{M}$ IF_{SHSH} durch variierende Konzentrationen an DsbC in $0,1 \text{ M}$ K-P, 1 mM EDTA bei pH 7,8 (offene Vierecke), pH 7,45 (Kreise) und pH 6,3 (Dreiecke) als Funktion der DsbC-sc-17* Konzentration dargestellt. Zum Vergleich wurden die analogen Daten (gefüllte Vierecke) für wildtypisches DsbC bei pH 7,8 aus Abbildung 3-36 aufgetragen. Die integrale Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 295 nm wurde an einer *stopped flow* Apparatur aufgezeichnet. An die experimentellen Daten wurde eine monoexponentielle Funktion angeglichen und die Raten bestimmt. Die Steigungen der Regressionsgeraden durch die Datenpunkte betragen $0,48 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei pH 6,3, $1,3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei pH 7,45 und $1,6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei pH 7,8.

Für die Oxidationsreaktionen von IF_{SHSH} ist für DsbC die Konzentration des Dimers und für DsbC-sc-17* die des kovalenten Monomers angegeben. Folglich hatte DsbC-sc-17* nur die Hälfte der aktiven Zentren von DsbC zur Verfügung und dennoch sind die Reaktionsgeschwindigkeiten praktisch gleich. Die Oxidationsreaktion setzt sich aus mehreren Schritten zusammen: Die nicht kovalente Interaktion der Reaktionspartner, die Bildung des kovalenten Heterodisulfids, die intramolekulare Umlagerung und die Dissoziation der Reaktionsprodukte. Möglicherweise sind während des komplexen Prozesses nicht beide aktiven Zentren voll zugänglich, sondern ein reagierendes Substrat blockiert die Umsetzung eines weiteren Substrats am zweiten aktiven Zentrum in DsbC und verringert somit die spezifische Aktivität von DsbC.

Die hohe Konkurrenz auf dem Forschungsfeld der Thioloxidasen unterstrichen Arredondo *et al.* mit ihrer im September 2009 veröffentlichten Arbeit⁹⁴. Die Arbeitsgruppe berichtete über die Konstruktion von DsbC *single chain* Varianten, wobei ebenfalls ein Glycin- und Serin-reicher Linker mit einer Länge von 15 Aminosäuren verwendet wurde. Die Arbeitsgruppe analysierte die Fähigkeit der DsbC Konstrukte zur Bildung von Disulfidbrücken *in vivo*, zur Rückfaltung entfalteter reduzierter RNaseA *in vitro* sowie zur Reduktion von Insulin (*in vitro*). Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Georgiou stimmen mit unseren Analysen überein: Für den Substratumsatz durch DsbC sind nicht beide aktive Redoxzentren notwendig. Entscheidend für die Aktivität ist jedoch eine ausgeprägte Substratbindungsstelle. Durch die Dimerisierung von DsbC bildet sich eine ausgedehnte Chaperondomäne, also eine Substratbindungsstelle für nicht native Proteine, deren Gegenwart die Effizienz des Substratumsatzes deutlich erhöht.

3.6 Mia40, eine neuartige Thioloxidase

Mitochondrien stellen neben dem endoplasmatischen Retikulum ein weiteres Kompartiment in eukaryontischen Zellen dar, in dem oxidative Proteinfaltung stattfindet. Lange Zeit glaubte man, dass der Intermembranraum von Mitochondrien (IMS) ebenso reduzierend wie das Cytosol ist, da große Poren in der äußeren Mitochondrienmembran die Diffusion von reduziertem Glutathion aus dem Cytosol in das IMS ermöglichen. Neuerdings wurden aber disulfidbrückenhaltige Proteine im IMS entdeckt und Mia40 als Thioloxidase identifiziert, die die oxidative Proteinfaltung im IMS katalysiert^{50, 95}. Es sind mittlerweile zahlreiche Cysteinereiche Substratproteine (z.B. Tim9, Cox17) bekannt, die nach dem Transport aus dem Cytosol in den IMS Disulfidbrücken ausbilden⁹⁶. Mia40 aus Hefe (*yMia40*) ist über ein N-terminales Membransegment in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Ein langer, flexibler Linkerbereich verbindet diesen Membrananker mit einer globulären Domäne, die aus 60 Aminosäuren besteht, gefolgt von einer ungefalteten, stark geladenen C-terminalen Extension. Humanes Mia40 (*hMia40*) besitzt keinen Membrananker, die globuläre Domäne ist also nicht in der inneren Membran fixiert. Die globuläre Domäne von Mia40 ist hochkonserviert, die Domänen der homologen Proteine der Hefe und des Menschen zeigen eine Sequenzidentität von 68 %. Zudem wurde gezeigt, dass *hMia40* in der Lage ist, einen Hefestamm mit einer Mia40 Deletion zu komplementieren⁹⁷. Die globuläre Domäne vermittelt somit die essentielle Funktion von Mia40. 2008 wurde die NMR Struktur von *hMia40* gelöst⁵⁰. Eine Kristallstruktur von *yMia40* fusioniert mit dem Maltosebindeprotein (MBP) mit geringer Auflösung (Auflösung für das Wildtypprotein: 3 Å) wurde 2009 veröffentlicht⁵¹. MBP besitzt die sechsfache Größe (366 Aminosäuren) der globulären Domäne von *yMia40* und ist deshalb prinzipiell als Fusionspartner zur Kristallisation schlecht geeignet, da durch das große Fusionsprotein intramolekulare Wechselwirkungen verhindert werden können. Deshalb wurde hier *yMia40* ohne Fusionsprotein kristallisiert.

3.6.1 Kristallstruktur von *yMia40*

Verschiedene *yMia40*-Konstrukte wurden erstellt, in *E. coli* BL21 DE3 Zellen rekombinant exprimiert und nach geeigneten Kristallisationsbedingungen gesucht. Nur von der globulären Domäne von *yMia40* mit N-terminalen His-tag ohne die ungefaltete C-terminale Extension (Aminosäuren 290-352) konnten Kristalle erhalten werden, die bis 2,3 Å streuten. Die Daten der Statistik der Kristallstruktur ist in Tabelle 9-8 zusammengefasst.

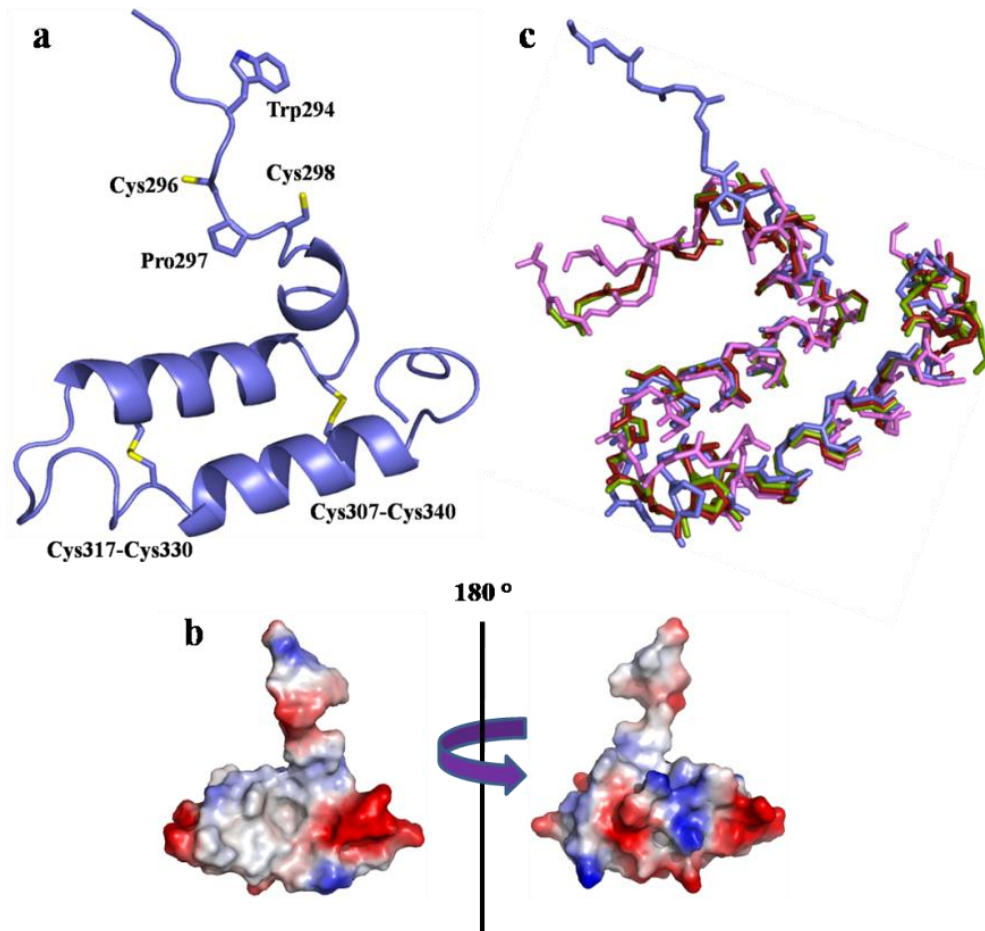


Abbildung 3-42: a) Bänderdarstellung der Kristallstruktur von γ Mia40 (Molekül A in der asymmetrischen Einheit). Die beiden strukturell wichtigen Disulfidbrücken (Cys307-Cys340, Cys317-Cys330), das redoxaktive CPC Motiv (Cys296, Cys298) sowie Trp294 sind im Stäbchenmodell dargestellt (Nummerierung nach Position in Volllängenprotein). b) Oberflächenladungsverteilung von γ Mia40. Die linke Abbildung entspricht der Orientierung von a), die rechte Abbildung ist hierzu um 180° gedreht. Rot entspricht einer negativen, blau einer positiven Ladung. c) Überlagerung der Rückgratstrukturen der in a) dargestellten Struktur (blau) mit der h Mia40 NMR-Struktur (magenta) und der Struktur des Mia40-MBP-Fusionsproteins in dem Mia40 oxidiert vorliegt (grün) bzw. die katalytischen Reste gegen Serin (rot) ausgetauscht sind.

Abbildung 3-42a zeigt eines von zwei Mia40 Molekülen in der asymmetrischen Einheit in Bänderdarstellung. Der Kern des Proteins wird durch zwei antiparallele α -Helices gebildet, die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Zusätzlich findet sich N-terminal ein beweglicher Schwenkarm, auf dem die redoxaktive Disulfidbrücke, und somit das aktive Zentrum lokalisiert ist. Die beiden strukturell wichtigen Disulfidbrücken (Cys307-Cys340, Cys317-Cys330), das redoxaktive CPC Motiv (Cys296, Cys298) sowie Trp294 sind im Stäbchenmodell gezeichnet, wobei die Nummerierung der Position im Volllängenprotein entspricht. In Abbildung 3-42b ist die Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche dargestellt. Mia40 besitzt eine ausgedehnte hydrophobe Fläche, die von den beiden Helices auf der dem aktiven Zentrum zugewandten Seite gebildet wird. Diese in weiß dargestellte Fläche wird in der Literatur als Obstschalen-förmig beschrieben und dient der Substratbindung. Auf der restlichen Proteinoberfläche herrscht eine homogene Ladungsverteilung vor, die eine gute Löslichkeit des Proteins gewährleistet. Der Vergleich

des Rückgrats dieser Kristallstruktur, mit dem der *hMia40* NMR-Struktur und dem der Struktur des Mia40-MBP-Fusionsproteins in dem Mia40 oxidiert vorliegt bzw. die katalytischen Reste gegen Serin ausgetauscht sind, zeigt die hohe Ähnlichkeit der Strukturen (Abbildung 3-42c). Lediglich die Lage des beweglichen Schwenkarms mit dem redoxaktiven CPC-Motiv der neu gelösten Struktur weicht von den anderen Strukturen ab. Die Überlagerung verdeutlicht somit die Rigidität des Proteinkerns und die Beweglichkeit des Schwenkarms. Cystein 296 und 298 liegen im Kristall nicht reduziert vor wie es Abbildung 3-42a suggeriert, sondern bilden Disulfidbrücken mit symmetrieverwandten Molekülen aus der benachbarten asymmetrischen Einheit.

γ Mia40 besitzt nach der Reinigung eine intensiv rot-braune Farbe. Es wurde eine Reinigung unter anaeroben Bedingungen in Kooperation mit S. Knauer am Lehrstuhl für Bioanorganische Chemie von Prof. Dr. H. Dobbek (Universität Bayreuth) durchgeführt und Absorptionsspektren des anaerob gereinigten Proteins unter anaeroben Bedingungen aufgenommen (siehe Abbildung 3-43). Die ausgeprägten lokalen Absorptionsmaxima bei 340 nm und 420 nm sind ein starker Hinweis darauf, dass γ Mia40 bei der heterologen cytosolischen Expression in *E. coli* einen 2Fe-2S-Cluster assembliert. Daithankar *et al.* zeigten, dass Mia40 nur bei rekombinanter Expression in *E. coli* Zellen mit reduzierendem Cytosol eine rötliche Färbung aufweist und diese sauerstoffempfindlich ist⁹⁸. Da von dieser Arbeitsgruppe jedoch keine Reinigung unter anaeroben Bedingungen durchgeführt wurde und der Fe-S-Cluster sauerstoffempfindlich ist, konnte die Arbeitsgruppe den Cluster nicht als 2Fe-2S-Cluster identifizieren. Eine physiologische Funktion der Fähigkeit von γ Mia40 (zumindest bei rekombinanter Expression) Fe-S-Cluster zu assemblieren ist noch nicht bekannt.

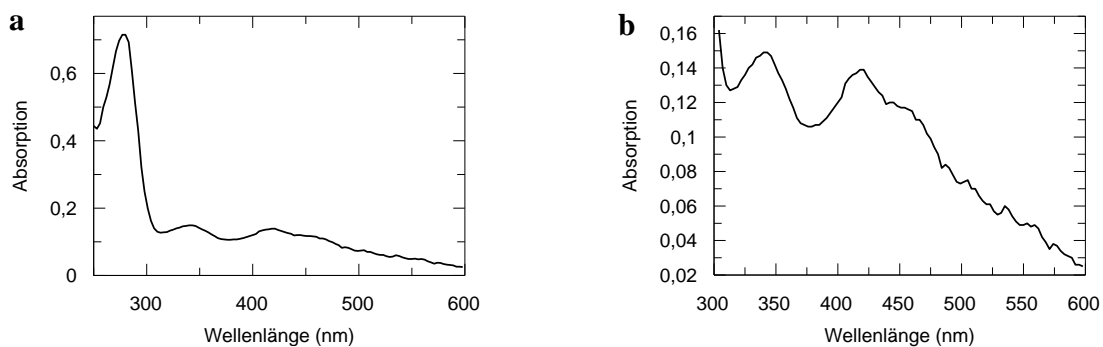


Abbildung 3-43: Absorptionsspektren von heterolog exprimiertem γ Mia40 nach anaerober Reinigung In a) ist das Absorptionsspektrum von 250 – 600 nm und in b) ein Ausschnitt von 300-600 nm dargestellt. Die Spektren wurden unter anaeroben Bedingungen an einem Nanodrop® Spektrophotometer mit einer Schichtdicke von 0,1 cm aufgenommen. Die Messungen fanden unter anaeroben Bedingungen unter Verwendung von anaerobisiertem Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,0) statt.

Die Cysteine 307, 317, 330 und 340 bilden in γ Mia40 strukturell wichtige Disulfidbrücken. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass diese Cysteine für die Assemblierung des 2Fe-2S-Clusters im rekombinanten Protein verantwortlich sind. Die beiden redoxaktiven Cysteine 296

und 298 sind prädestiniert zur Koordination von Metallionen. Der Aufbau eines 2Fe-2S-Clusters benötigt jedoch vier Cysteine bzw. andere geeignete Aminosäuren, die in monomeren γ Mia40 nicht verfügbar. Eine Assemblierung eines 2Fe-2S-Clusters über die Cysteine 296 und 298 ist deshalb nur bei einer Dimerisierung von γ Mia40 möglich.

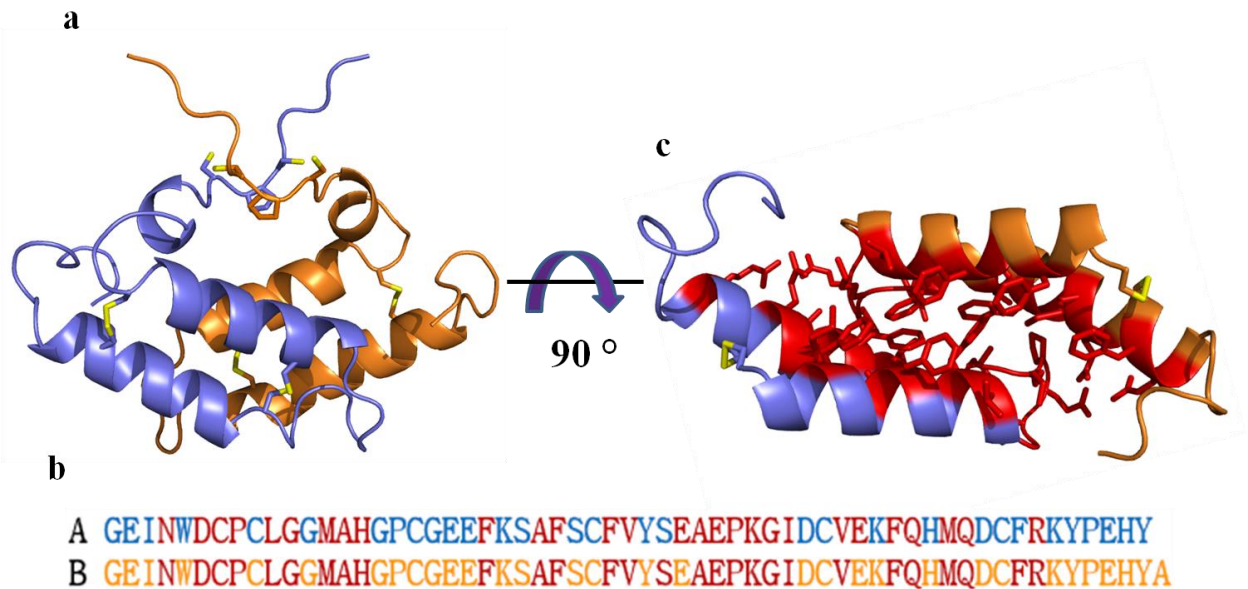


Abbildung 3-44: a) Bänderdarstellung des Mia40 Dimers in der asymmetrischen Einheit. Molekül A ist blau, Molekül B orange eingefärbt. b) Aminosäuresequenzen der Moleküle A und B. Aminosäuren, die laut dem Programm PISA an der Wechselwirkung der beiden Moleküle beteiligt sind, sind rot eingefärbt. c) Bänderdarstellung des Mia40 Dimers. Rot markierte Reste aus b) sind im Stäbchenmodell dargestellt und ebenfalls rot eingefärbt. Zur besseren Übersicht ist nur ein Ausschnitt von Abbildung a) (um 90° gedreht) dargestellt.

Tatsächlich liegt in der asymmetrischen Einheit des Kristalls ein Dimer von γ Mia40 vor (Abbildung 3-44). Das Quartärstrukturanalyseprogramm PISA⁸¹ gibt an, dass die Dimerisierung kein Kristallisationsartefakt ist, sondern beide Monomere ausreichend Wechselwirkungen für eine Dimerisierung zeigen. Die Aminosäuren, die laut PISA-Analyse intermolekulare Wechselwirkungen ausbilden, sind in der Sequenz in Abbildung 3-44b rot markiert. Da die Moleküle eine Kopf-zu-Schwanz Anordnung zeigen, sind im Wesentlichen komplementäre Aminosäuren an der Interaktion beteiligt. Abbildung 3-44c stellt einen um 90° gedrehten Ausschnitt von Abbildung 3-44a dar, in dem die Aminosäuren, die intermolekulare Interaktion eingehen, im Stäbchenmodell dargestellt und ebenfalls rot eingefärbt sind. Die intermolekulare Wechselwirkung wird insbesondere durch die hydrophobe Substratbindungsstelle vermittelt. Abbildung 3-44c zeigt, wie das Homodimer durch eine intensive Stapelung aromatischer Aminosäuren in der Grenzfläche stabilisiert wird. In der Kristallstruktur bilden sich Dimere, die einzelnen Moleküle sind aber über Disulfidbrücken zu Molekülen benachbarter asymmetrischer Zellen kovalent verknüpft. Mia40 wurde aerob gereinigt und auch aerob kristallisiert. Die rot-braune Färbung verblasste nach einigen Tagen, dementsprechend waren die Kristalle farblos. Vermutlich assembliert

Mia40 als Dimer ein 2Fe-2S-Cluster. Während des Kristallisationsprozesses kommt es durch den Kontakt mit Luftsauerstoff zu Oxidationsprozessen, wodurch die 2Fe-2S-Cluster zerfallen und Cystein 296 und 298 Disulfidbrücken zu benachbarten Molekülen im Kristall ausbilden.

Kawano *et al.* klärten die Kristallstruktur des MBP-Mia40 Fusionsproteins auf ⁵¹. In der Struktur interagiert der Linker zwischen dem MBP- und dem Mia40-Anteil in helikaler Struktur mit der Substratbindungsstelle von Mia40, und es wurde daher angenommen, dass dieser Linker ein Substrat nachahmt. Die Interaktion des Linkers mit der Substratbindungsstelle und das 360 Aminosäuren große MBP verhindern wahrscheinlich die Dimerisierung von Mia40. Eine Überlagerung des MBP-Mia40-Fusionsproteins mit Molekül A der γ Mia40 Kristallstruktur verdeutlicht dies (Abbildung 3-45a).

Die Ausbildung eines Homodimers von Mia40 ist interessant, da viele putative Substrate von Mia40 eine sehr ähnliche Struktur wie Mia40 aufweisen und reduzierte und entfaltete Mia40 Moleküle selbst ebenso ein Substrat darstellen. In Abbildung 3-45b ist eine Überlagerung der NMR-Struktur von Cox17 mit Molekül A des γ Mia40 Dimers dargestellt. Die beiden antiparallelen Helizes von Mia40 und Cox17 können perfekt überlagert werden. Die Anordnung von Cox17 zu Molekül B der γ Mia40 Struktur in dieser Abbildung zeigt, wie ein Komplex aus Mia40 und einem möglichen Substrat nach erfolgter Oxidation aussehen könnte.

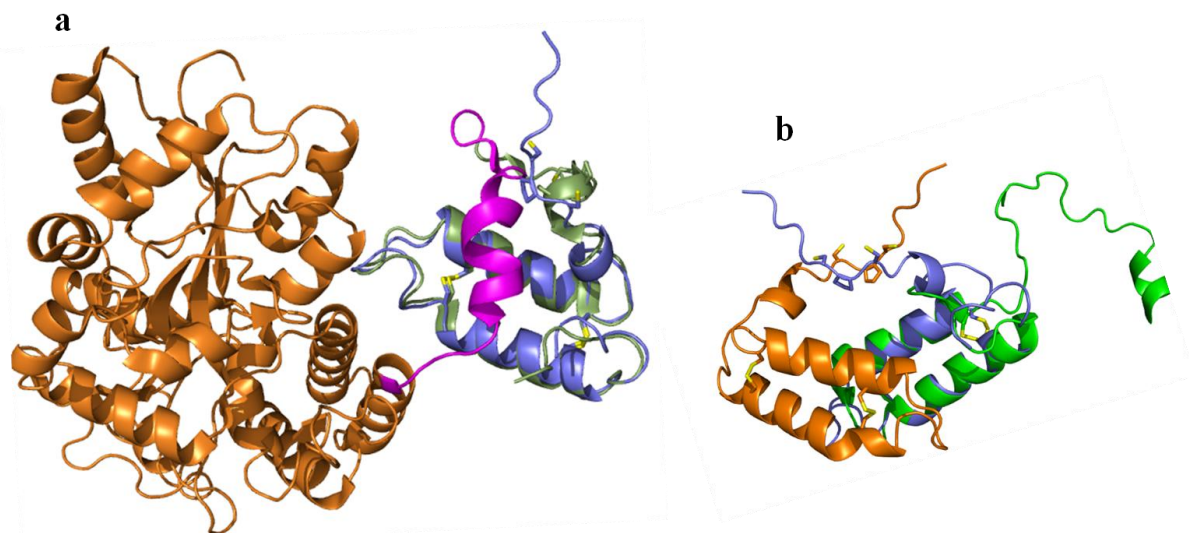


Abbildung 3-45: a) Überlagerung der Struktur des MBP-Mia40 Fusionsproteins (PDB-Eintrag 3A3C) mit der Struktur von Molekül A des γ Mia40 Homodimers in Bänderdarstellung. Die Struktur von MBP ist orange, der Linker des Fusionsproteins magenta, Mia40 im Fusionsprotein oliv und Molekül A des γ Mia40 Homodimers blau eingefärbt. b) Überlagerung der NMR-Struktur von Cox17 (grün; PDB-Eintrag 1Z2G) mit der Struktur des γ Mia40 Homodimers (Molekül A blau, Molekül B orange). Die Darstellungen wurden mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific, 2006) erstellt.

*h*Mia40 wurde ebenfalls heterolog als MBP-Fusionsprotein in *E. coli* Zellen exprimiert und gereinigt. Zur NMR Analyse wurde MBP von *h*Mia40 abgespalten und das isolierte Protein

untersucht. Es konnten keine Anhaltspunkte für eine Dimerisierung von *hMia40* in Lösung gefunden werden⁵⁰.

3.6.2 Oxidation von IF_{SHSH} durch Mia40

Die Thioloxidase-Aktivität der globulären Domäne von γ Mia40 inklusive C-terminaler Extension (Aminosäuren 295-403, im Folgenden γ Mia40*) wurde wie im Fall von DsbA (vgl. Abschnitt 3.5.3.2) mit dem Substratprotein IF_{SHSH} von E. Varga im Rahmen einer Bachelorarbeit⁹⁹ untersucht. Es wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie drei Reaktionsphasen detektiert. Die schnellste Phase läuft im Sekundenbereich und somit in der Totzeit manueller Mischung ab und wurde deshalb nach schneller *stopped flow* Mischung gemessen. Es konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit dieser Phase nachgewiesen werden. Die beiden anderen Reaktionsphasen liefen im Minutenbereich ab. Die schnellere der beiden Phasen ist marginal vom pH Wert der Lösung abhängig. Keine der beiden langsamen Phasen zeigte eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Konzentration der Reaktionspartner.

Das Fluoreszenzsignal der Reaktionsphasen ist eine komplexe Mischung verschiedener Sonden: Zum Einen wird das Fluoreszenzsignal der intrinsischen Fluoreszenzänderung von IF_{SHSH} während der oxidativen Proteinfaltung beobachtet. Zum Anderen ist die Fluoreszenz von Trp294 (siehe Abbildung 3-42) von γ Mia40* sensitiv gegenüber dem Redoxzustand des katalytisch aktiven CPC-Motivs, wobei die Fluoreszenz von γ Mia40* während der Oxidation von IF_{SHSH} stark ansteigt. Aufgrund dieser Komplexität des Fluoreszenzsignals konnten die Reaktionsphasen keinen einzelnen Reaktionsschritten zugeordnet werden.

Um selektiv das Fluoreszenzsignal von IF_{SHSH} während der Oxidationsreaktion beobachten zu können, wurde eine Tryptophan-freie γ Mia40* Variante erstellt, indem Trp294 gegen Phenylalanin ersetzt wurde. Allerdings konnte keine Oxidationsreaktion von IF_{SHSH} durch γ Mia40* W294F beobachtet werden. Die Experimente zeigten Fluoreszenzsignale analog zu Kontrollexperimenten ohne Oxidationsmittel im Ansatz. Weshalb γ Mia40* durch die Substitution W194F die Fähigkeit zur Oxidation von IF_{SHSH} verloren hat, ist noch nicht geklärt.

3.6.3 Mia40 besitzt Chaperonaktivität

Chaperondomänen in Faltungshelfern wie Peptidyl-Prolylisomerasen (z.B. SlyD^{32, 100}) oder Proteindisulfidisomerasen (z.B. PDI¹⁰¹) besitzen eine duale Funktion: Durch die Bindung hydrophober, aggregationsgefährdeter Oberflächen nicht-nativer Substratproteine erhöhen Chaperondomänen zum Einen die lokale Substratkonzentration am aktiven Zentrum der Faltungshelfer und steigern somit die Effizienz der Enzyme. Zum Anderen senken die Faltungshelfer mit Chaperonaktivität die Neigung nicht nativer Proteine zur Aggregatbildung durch die Bindung an deren hydrophobe Oberflächen.

Als Modellsubstrate zur Analyse der Chaperonaktivität von Faltungshelfern werden vor allem chemisch oder thermisch labilisierte Citratsynthase⁷⁸, α -Glucosidase¹⁰², Luziferase aus Glühwürmchen¹⁰³ und β -Galactosidase¹⁰⁴ verwendet. Diese Proteine besitzen in chemisch oder thermisch labilisierte Form eine hohe Neigung zur Aggregation und sind somit hervorragend geeignet um die aggregationshemmende Funktion von Chaperonen untersuchen zu können. Aggregationsprozesse können in Abhängigkeit von der Partikelgröße gut mit Hilfe von Streulichtmessungen verfolgt werden. Zu beachten ist, dass die elastische Lichtstreuung nicht linear von der Größe der Aggregate abhängt⁷⁸. Daher sind Chaperontests eher qualitativer Natur aber für vergleichende Analysen gut geeignet.

Die globuläre Domäne von γ Mia40 inklusive C-terminaler Extension (Aminosäuren 295-403, im Folgenden γ Mia40*) wurde auf die Fähigkeit hin untersucht, die Aggregation von chemisch denaturierter Citratsynthase nach Transfer in Rückfaltungsbedingungen zu verringern. Dazu wurde die Aggregation von entfalteter Citratsynthase (in 50 mM Tris/HCl, pH^{25 °C} 8,0, 20 mM DTE und 6 M GdmCl) durch 200-fache Verdünnung in Endbedingungen von 50 mM Tris/HCl, pH^{25 °C} 8,0, 30 mM GdmCl und 0,1 mM DTT induziert. In Abbildung 3-46 ist der Verlauf der Lichtstreuung in Gegenwart verschiedener Thioloxygenasen als Sonde für die Bildung von Aggregaten gezeigt.

In Abbildung 3-46a ist dargestellt, wie 5 bzw. 10 μ M γ Mia40* die Aggregation von rückfaltender Citratsynthase unterdrücken, in Abbildung 3-46b ist die Chaperonaktivität von 10 μ M γ Mia40* im Vergleich zu 10 μ M DsbA, 10 μ M PDI a'c, 10 μ M DsbC und 1 μ M PDI gezeigt. PDI ist ein etwa zehnfach effektiveres Chaperon als γ Mia40* und DsbC. Die beiden letzteren zeigen erst bei einer Konzentration von 10 μ M eine so starke Unterdrückung der Aggregatbildung wie 1 μ M PDI. Die Anwesenheit von 10 μ M DsbA zeigt ebenso wie 10 μ M des a'c-Fragmentes von PDI keinen Einfluss auf die Aggregation der Citratsynthase. Das Kontrollprotein PDI a'c ist eine Redox-aktive Thioredoxin-Domäne von PDI ohne die hydrophoben Substratbindungsdomänen b und b' (siehe Abschnitt 3.5.3.4).

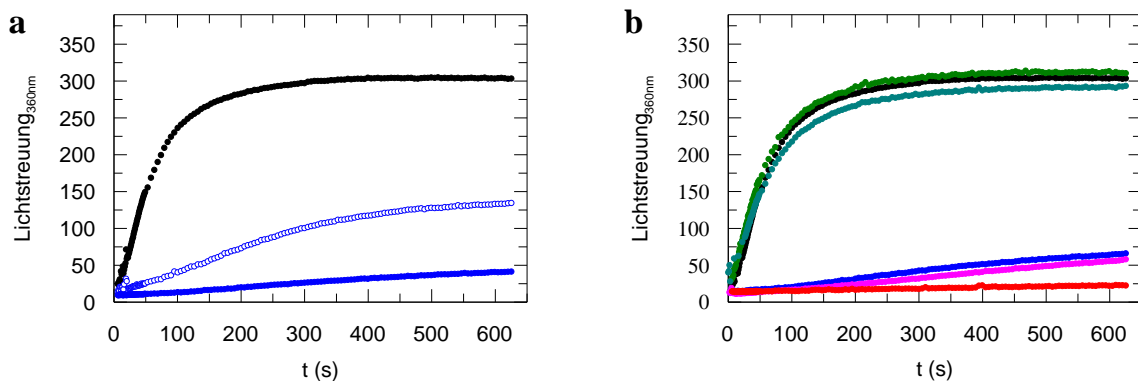


Abbildung 3-46: Citratsynthasetest zur Analyse der Chaperonaktivität. Es wurde der Einfluss verschiedener Thioloxidasen/-isomerasen auf die Aggregation von chemisch denaturierter Citratsynthase untersucht. Dargestellt ist der Verlauf der Lichtstreuung bei 360 nm bei der Aggregation von chemisch denaturierter Citratsynthase in Abwesenheit (●) und a) Gegenwart von 5 (○) und 10 µM (●) yMia40* und b) 1 µM PDI (●), 10 µM yMia40* (●), 10 µM DsbC (●), 10 µM DsbA (●) und 10 µM PDI a'c (●).

Die Aggregation von chemisch denaturierter Citratsynthase (in 50 mM Tris/HCl, pH^{25 °C} 8,0, 6 M GdmCl und 20 mM DTT) wurde durch 200-fache Verdünnung in Endbedingungen von 50 mM Tris/HCl, pH^{25 °C} 8,0, 30 mM GdmCl und 0,2 mM DTT bei 25 °C induziert. Die Citratsynthasekonzentration im Testansatz betrug 0,15 µM. Die Aggregation wurde über die Zunahme des Streulichts bei 360 nm verfolgt (Anregungsspaltbreite 3 nm, Emissionsbandbreite 3 nm).

Offensichtlich ist die Chaperonaktivität nicht alleine durch die Größe der hydrophoben Oberfläche des Faltungshelfers determiniert, wie der Vergleich der Chaperonaktivität von DsbC und yMia40* zeigt. Vermutlich ist yMia40* trotz seiner geringen Größe ein sehr gutes Chaperon, weil es zum einen eine ausgesprochen hydrophobe Bindungsoberfläche besitzt und zum anderen auf der restlichen Proteinoberfläche eine ausgewogene Ladungsverteilung und damit eine hohe Löslichkeit zeigt (siehe Abbildung 3-42b).

3.6.4 Mia40 zeigt keine Disulfidisomeraseaktivität

Im Cytosol von Prokaryoten und Eukaryoten herrschen reduzierende Bedingungen. Proteine, die im nativen Zustand Disulfidbrücken besitzen, werden deshalb nach der Translation in Kompartimente mit oxidierendem Milieu transloziert, wo die oxidative Proteinfaltung stattfindet. Haben Proteine mehr als zwei Cysteine pro Molekül, gibt es mehrere Möglichkeiten Disulfidbrücken auszubilden, jedoch führt nur die korrekte Anordnung der Disulfidbrücken zum nativen Protein. Ist das Protein ungefaltet, bilden sich unter oxidierenden Bedingungen bevorzugt Disulfidbrücken zwischen konsekutiven Cysteinen. Daher kommt es bei der oxidativen Faltung von Proteinen mit Disulfidbrücken zwischen nicht konsekutiven Cysteinen häufig zu Fehlverbrückungen, die für eine produktive Proteinfaltung durch Disulfidisomerasen rearrangiert werden müssen. Disulfidisomerasen sind in der Lage nicht native Disulfidbrücken zu reduzieren, so dass sich diese umlagern, oder bei vollständiger Reduktion erneut oxidiert werden können. Im Periplasma von Prokaryoten gibt es zwei getrennte Systeme für die Katalyse der Bildung und Isomerisierung von

Disulfidbrücken vor. Das oxidierende DsbA/DsbB-System katalysiert unspezifisch die Oxidation von Cysteinen zu Disulfidbrücken und das reduzierende DsbC/DsbG/DsbD-System sorgt für die Isomerisierung von Fehlverbrückungen¹⁰⁵. Im endoplasmatischen Retikulum ist PDI durch die unterschiedlichen Redoxpotentiale der beiden Thioredoxindomänen in der Lage sowohl die Oxidation von Cysteinen als auch die Isomerisierung von Fehlverbrückungen zu katalysieren⁴⁸.

Mia40 oxidiert Cysteine von Substratproteinen im IMS. Die meisten bekannten Substrate von Mia40 enthalten im nativen Zustand mindestens zwei Disulfidbrücken, die nicht konsekutive Cysteine miteinander verknüpfen. Es ist unklar, ob Mia40 selektiv die Oxidation korrekter Disulfidbrücken katalysiert, oder auch in der Lage ist Fehlverbrückungen zu korrigieren.

Die Analyse der Aktivität einer Disulfidisomerase wird klassisch anhand der Reaktivierung von fehlverbrückter RNaseA untersucht. Messsignal ist dabei die Absorptionsänderung bei 286 nm, die durch die Hydrolyse von cCMP¹⁰⁶ durch native RNaseA Moleküle verursacht wird. Dieser Test ist aufgrund der geringen Signaländerung, der ungenau zu bestimmenden Anfangsgeschwindigkeit und der großen Anzahl unterschiedlicher Möglichkeiten der Disulfidbrückenbildung in RNaseA äußerst ungenau. Um die Disulfidisomeraseaktivität von Mia40 sensitiv untersuchen zu können, wurde der klassische Test deshalb optimiert: Es wurde nicht RNaseA, sondern RNaseT1 mit den Punktmutationen S54G und P55N (im Folgenden RNase T1*) ausgewählt, die den Faltungsmechanismus stark vereinfachen¹⁰⁷. Zudem wurde nicht cCMP sondern ein synthetisch hergestelltes Oligonukleotid mit terminalem Quencher und Fluorophor verwendet, das bei der Hydrolyse durch RNase T1 ein hohes und stabiles Messsignal liefert.

RNaseT1 enthält zwei Disulfidbrücken, die nicht konsekutive Cysteine (Cys2-Cys10 bzw. Cys6-Cys103) verknüpfen (Abbildung 3-47). Die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken ist für die konformationelle Faltung und die Funktion von RNase T1* essentiell. RNase T1* mit fehlverbrückten Cysteinen (*scrambled* RNase T1*, im Folgenden *scRNase T1**) wurde erhalten, indem reduzierte RNase T1* in 6 M GdmCl, 0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,8 mit 50 mM oxidiertem Glutathion für vier Stunden inkubiert wurde, da im entfalteten Protein bevorzugt konsekutive Cysteine (Cys2-Cys6 oder Cys6-Cys10) verbrückt werden. *ScRNaseT1** wurde in 0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,0, umgepuffert und die konformationelle Faltung mittels CD Spektroskopie analysiert. In Abbildung 3-47c sind die CD Spektren von 5 mM nativer und *scRNaseT1** bei 15 °C gezeigt. Native RNaseT1* zeigt das typische CD Spektrum eines gefalteten Proteins mit einem Signalmaximum bei 195 nm und lokalen Minima bei 218 und 208 nm, die auf einen helikalen Anteil des Proteins hindeuten (siehe Abbildung 3-47b). Das CD Spektrum von *scRNase T1** zeigt einen gänzlich anderen Kurvenverlauf mit einem Minimum bei 195 nm, der dem eines ungefalteten Proteins (*random coil*) entspricht. Dementsprechend zeigt RNase T1* einen kooperativen thermisch-induzierten Entfaltungsübergang, während bei *scRNase T1** kein Übergang zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt).

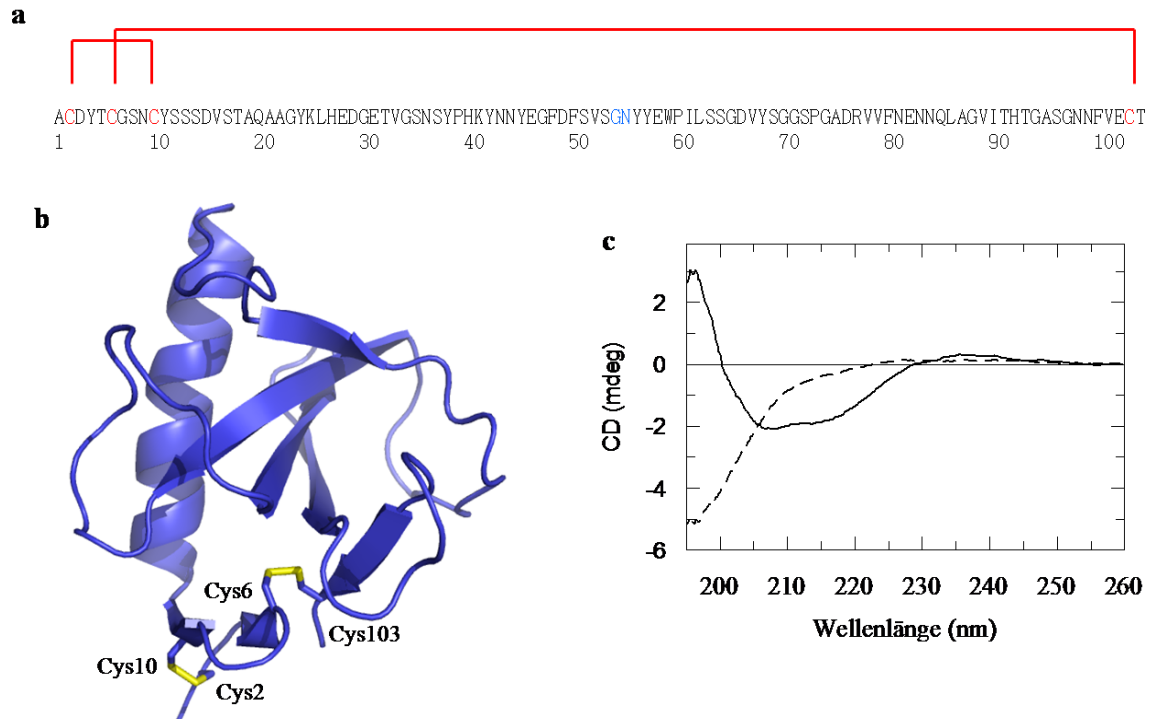


Abbildung 3-47: Primärstruktur von RNaseT1*, in der die Punktmutationen S54G und P55N blau und die Cysteine rot eingefärbt sind. Die Verbrückung der Cysteine durch Disulfidbrücken im nativen Molekül ist durch rote Linien gekennzeichnet. b) Kristallstruktur von RNase T1 (PDB-Eintrag 1RGA) in Bänderdarstellung, in der Cysteinreste im Stäbchenmodell abgebildet sind. c) Vergleich der CD Spektren von 5 μ M RNase T1* (durchgezogene Linie) und scRNase T1* (durchbrochene Linie) in 0,01 M Na-Cacodylat, pH 7,0 bei 15 °C und einer Schichttiefe von 0,1 cm.

Das Substrat für den Aktivitätstest von RNase T1* ist ein terminal mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy5 und Alexa488 markiertes Oligonukleotid der Sequenz (dA)₄-rG-(dA)₄, das von Dr. Tobias Aumüller (Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Prof. Dr. Gunter Fischer) bereitgestellt wurde. RNase T1* hydrolysiert das Oligonukleotid auf der 3'-Seite des Riboguanosylrests. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa488 bei 488 nm wird die Fluoreszenz im intakten Oligonukleotid effektiv durch den Quencher Cy5 gelöscht. Bei der Hydrolyse des Oligonukleotids durch RNase T1* werden Cy5 und Alexa488 räumlich voneinander getrennt, die Fluoreszenzlöscherung nimmt ab und die Alexa488 Fluoreszenz steigt. In Abbildung 3-48a sind Fluoreszenzspektren dargestellt, die in Abständen von 5 min nach Zugabe von 5 nM RNase T1* zu 100 nM Oligonukleotid in 0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,0 aufgenommen wurden. Das Differenzmaximum der Fluoreszenz vor und nach Hydrolyse des Oligonukleotids nach Anregung bei 488 nm liegt bei 517 nm, wobei eine knapp fünffache Erhöhung des Fluoreszenzsignals bei vollständiger Hydrolyse des Oligonukleotids zu beobachten ist. Die lineare Abhängigkeit der Hydrolyserate von der RNase T1* Konzentration wurde durch die Messung einer Eichgeraden nachgewiesen. In Abbildung 3-48b ist das Fluoreszenzsignal der einzelnen Hydrolysereaktionen abgebildet. Die Stabilität des Fluoreszenzsignals zeigt sich daran, dass bei allen Messungen der gleiche Endwert

erreicht wurde. Die Raten aus dem monoexponentiellen Angleich an den Verlauf der Fluoreszenz sind in Abbildung 3-48c als Funktion der RNase T1 Konzentration dargestellt. Es ist eindeutig der lineare Zusammenhang zwischen Hydrolyserate und RNase T1* Konzentration zu erkennen. Die Fehlverbrückung von scRNase T1* beeinträchtigt die Funktionalität stark, scRNase T1* besitzt nur 1% der Aktivität von RNase T1*.

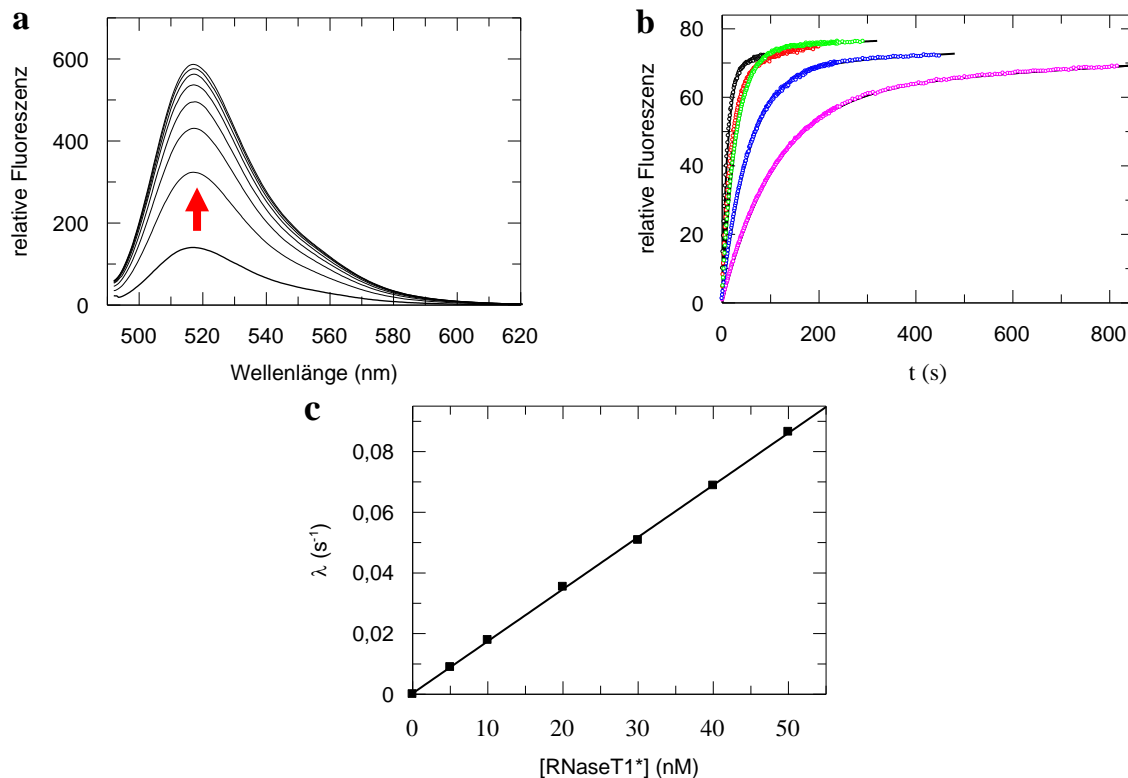


Abbildung 3-48: a) Fluoreszenzspektren von 100 nM Oligonukleotid Cy5-(dA)₄-rG-(dA)₄-Alexa488 nach Anregung bei 488 nm in 0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,0, 15 °C. Es wurden 5 nM RNase T1 zugegeben und in Abständen von 5 min Spektren aufgenommen. b) Verlauf der Fluoreszenz bei 517 nm nach Anregung bei 488 nm während der Spaltung von 20 nM Oligonukleotid durch variierende Konzentrationen an RNase T1 (magenta: 5 nM, blau 10 nM, grün: 20 nM, rot: 30 nM, schwarz 50 nM in 0,05 M Essigsäure, pH 5,3 bei 25 °C). An die Rohdaten wurden monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Raten in c) als Funktion der RNase T1* Konzentration aufgetragen. Die Hydrolyseraten sind linear von der RNase T1 Konzentration abhängig und folgen einer Geraden mit einer Steigung von 1,7 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Die Aktivität der Disulfidisomerasen wurde in einer diskontinuierlichen Versuchsanordnung bestimmt: Zu 1 μM der potentiellen Disulfidisomerase in Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M KCl in Gegenwart einer Mischung aus 5 mM reduzierten und 1 mM oxidierten Gluthations wurden 4 μM scRNase T1* gegeben. In Zeitintervallen wurden Proben aus diesem Reaktionsansatz entnommen und die RNase T1* Aktivität darin anhand der Hydrolyserate des Oligonukleotids bestimmt. Die Aktivitätsmessung erfolgte nach 20facher Verdünnung des Isomeraseansatzes in 50 mM Essigsäure, pH 5,3 mit 10 nM Oligonukleotiden. Bei pH 5,3 ist die RNase T1* Aktivität hoch, Redoxreaktionen von Thiolen aber stark verlangsamt. Die Steigerung der RNase T1 Aktivität bei Rückfaltung von scRNase T1* durch PDI ist in Abbildung 3-49a zu erkennen. Mit steigender Rückfaltungsdauer erreicht das Fluoreszenzsignal der

Hydrolysereaktion schneller den Endwert der Reaktion. Durch den Angleich einer monoexponentiellen Funktion wurde die Rate der Hydrolysereaktion, die ein Maß für die RNase T1 Aktivität ist, bestimmt und in Abbildung 3-49b als Funktion der Rückfaltungsdauer aufgetragen. Die Steigerung der Aktivität, also die Reaktivierung von scRNase T1*, folgt ebenfalls einer monoexponentiellen Funktion. Die daraus bestimmte Rate dient als Parameter für die Aktivität von Disulfidisomerasen.

Das Referenzexperiment ohne PDI zeigt, dass auch das Gemisch aus reduziertem und oxidiertem Glutathion in der Lage ist scRNase T1* rückzufalten, jedoch erheblich langsamer (Abbildung 3-49b). Ohne Glutathion ist keine Rückfaltung von scRNaseT1 zu beobachten. Der Versuchsansatz mit DsbA als Rückfaltungshelfer zeigt, dass DsbA in Übereinstimmung mit der Literatur keine Isomeraseaktivität zeigt. Die Reaktivierung von scRNase T1* ist genauso langsam wie in der Kontrollreaktion.

Die Reaktivierung von scRNase T1* wurde in gleicher Weise mit den Faltungshelfern PDI, DsbC, DsbC-sc-17*, PDI a'c, yMia40* und DsbA durchgeführt und die Raten der Reaktivierung bestimmt. Die normierten monoexponentiellen Funktionen aller Reaktivierungsexperimente sind in Abbildung 3-49c zusammengestellt. Der Vergleich der Graphen bzw. der entsprechenden Raten nach Abzug der Rate der Referenzreaktion (siehe Tabelle 3-6) lässt eine eindeutige Gruppierung zu. yMia40*, DsbA und PDI a'c zeigen keine schnellere Reaktivierung von scRNase T1* als die Kontrollreaktion. PDI und DsbC falten scRNase T1* effektiv zurück, ebenso DsbC-sc-17*, das nur ein aktives Zentrum besitzt. Die Aktivität von DsbC-sc-17* ist im Gegensatz zu DsbC nicht halbiert, obwohl die effektive Konzentration an aktiven Zentren nur halb so hoch ist. Dies deutet darauf hin, dass nicht beide aktiven Zentren in DsbC gleichzeitig zugänglich sind. Dies ist ein ähnliches Ergebnis wie bei der Oxidation von IF_{SHSH} durch DsbC und DsbC-sc-17* (siehe Abschnitt 3.5.3.7d). Die beiden Disulfidisomerasen DsbC und PDI entwickelten sich konvergent: beide sind U-förmig, besitzen hydrophobe Furchen, welche nicht-native Proteine binden und Chaperonaktivität vermitteln, und beide besitzen zwei aktive Zentren. Der scRNase T1* Rückfaltungstest mit DsbC-sc-17* zeigt, dass *in vitro* zwei aktiven Zentren pro Molekül nicht notwendig sind. Der Unterschied in der Aktivität zwischen PDI a'c und PDI kommt offensichtlich durch den Verlust der Chaperondomänen, also den Substratbindungsstellen zustande. DsbA ist eine Thioloxidase und zeigt aufgrund des hohen Redoxpotentials und möglicherweise aufgrund fehlender Chaperonaktivität, keine Isomeraseaktivität. Das Redoxpotential von yMia40* ist noch etwas negativer als das von PDI, zudem besitzt yMia40* eine hydrophobe Substratbindungsstelle mit Chaperonaktivität. Weshalb yMia40* in diesem Experiment dennoch keine Isomeraseaktivität zeigt, kann nicht sicher beantwortet werden. Möglicherweise hat Mia40* eine hohe Substratspezifität¹⁰⁸, oder die Bindung über die Substratbindungsstelle ist nicht dynamisch genug für eine effiziente Isomeraseaktivität.

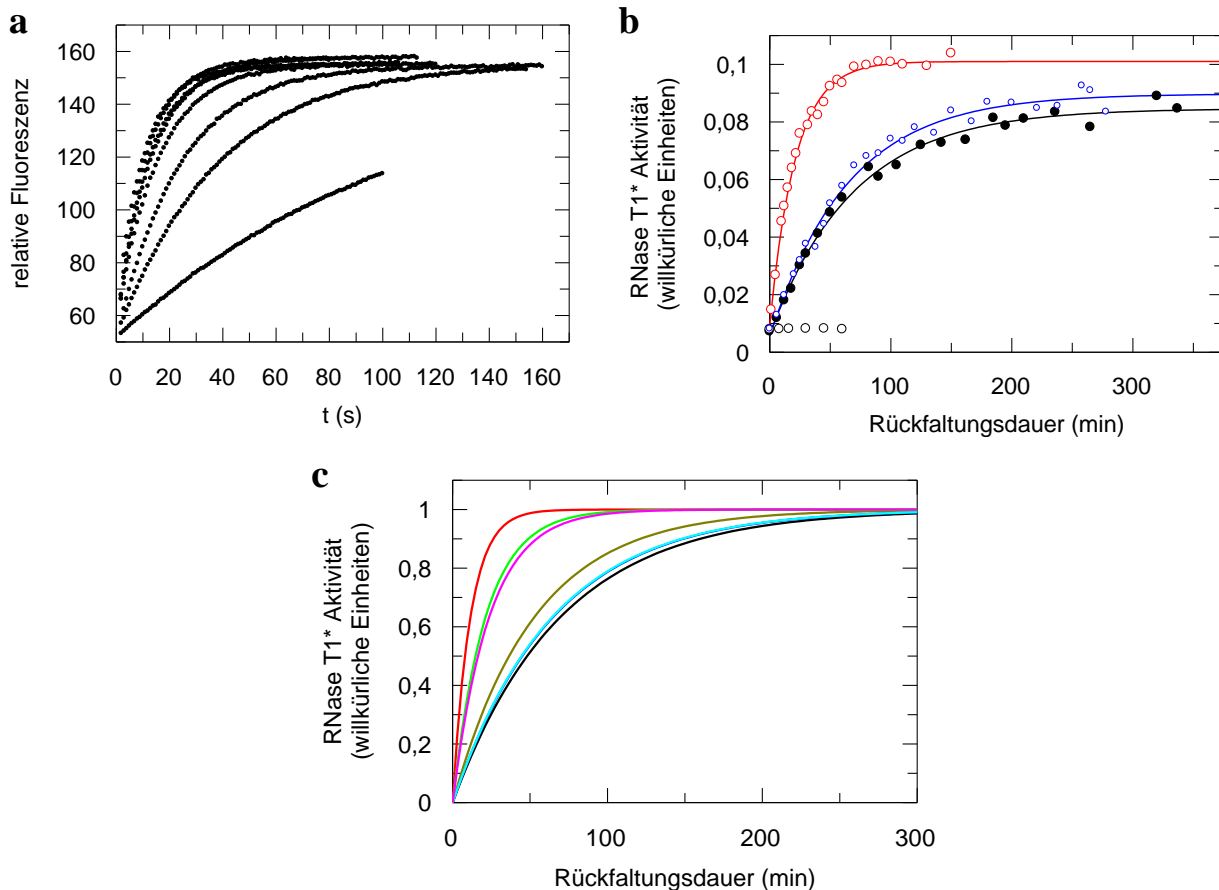


Abbildung 3-49: a) Bestimmung der Hydrolyseaktivität im Rückfaltungsansatz von scRNase T1* nach unterschiedlicher Rückfaltungsdauer in Gegenwart von 1 μM PDI. Gezeigt sind die Fluoreszenzverläufe bei Hydrolyse von 10 nM Cy5-(dA)₄-rG-(dA)₄-Alexa488 in 0,05 M Essigsäure, pH 5,3 bei 25 °C. Aliquots des Rückfaltungsansatzes wurden in Zeitintervallen 20fach in Hydrolysebedingungen nach unterschiedlicher Rückfaltungsdauer (von rechts nach links: 10 s, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30 und 40 min) verdünnt. An die Daten wurde eine monoexponentielle Funktion angeglichen und die Raten als Funktion der Rückfaltungsdauer in b) aufgetragen.

b) Reaktivierung von scRNase T1* als Funktion der Inkubationszeit mit einem Faltungshelfer (rot: Rückfaltung durch PDI, blau: Rückfaltung durch DsbA, schwarz: Referenz ohne Isomerase, ungefüllte Symbole: Referenz ohne Glutathion). Die Steigerung der Aktivität folgt ebenfalls einer monoexponentiellen Funktion mit folgenden Raten: PDI 0,088 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, DsbA 0,016 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Referenz (GSH/GSSG) 0,014 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

c) Normierte Graphen der Reaktivierung von scRNase T1* mit zunehmender Rückfaltungsdauer (Faltungshelfer PDI: rot, DsbC: grün, DsbC-sc-17* magenta, PDI a'c: oliv, yMia40*: türkis, DsbA: blau, schwarz: Referenz). Die Raten der monoexponentiellen Funktionen der Reaktivierung entsprechen für die Referenz (GSH/GSSG) 0,014 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, PDI 0,088 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, DsbA 0,016 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, PDI a'c 0,019 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, DsbC 0,047 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und DsbC-sc-17* 0,043 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Nettoraten der Reaktivierung von RNase T1, also nach Abzug der Referenzreaktionsrate, sind in Tabelle 3-6 zusammengestellt. Rückfaltung von jeweils 4 μM scRNaseT1* erfolgte durch 1 μM Faltungshelfer in 0,1 M Tris/HCl pH^{25 °C} 8,0, 0,1 M KCl in Gegenwart von 5 mM reduziertem Glutathion und 1 mM oxidiertem Glutathion bei 25 °C.

Tabelle 3-6: Zusammenstellung der Raten der scRNase T1* Reaktivierung im diskontinuierlichen Rückfaltungstest als Maß für die Isomeraseaktivität verschiedener Faltungshelfer, sowie die Reduktionspotentiale der aktiven Zentren.

Protein	scRNase T1* Reaktivierung (min^{-1})	Reduktionspotential (mV)
DsbA	0,002	-122
Mia40	0,002	-200
PDI a'c	0,005	-152
DsbC-sc-17*	0,029	-140
DsbC	0,033	-140
PDI	0,074	-188/-152

Es sind die Raten der scRNase T1* Reaktivierung abzüglich der Reaktivierung von scRNase T1* durch GSH/GSSG (Referenz bzw. Hintergrundreaktion) der in Abbildung 3-49c dargestellten Reaktionen für alle verwendeten Faltungshelfer, sowie die Redoxpotentiale ¹⁰⁹ der aktiven Zentren zusammengestellt.

4 Zusammenfassende Diskussion

4.1 Das Gen-3-Protein der filamentösen Phagen fd und IF1 vermittelt die Phageninfektion

4.1.1 Die Domänenanordnungen der Gen-3-Proteine und damit die Infektionsmechanismen der Phagen fd und IF1 sind unterschiedlich

Das Gen-3-Protein (G3P) des Phagen fd ist ein interessantes Modellsystem, um die Bedeutung der Domänenanordnung in einem Mehrdomänenprotein für seine Funktion, hier die Infektion des Phagen, *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Für *in vitro* Analysen wurde das N1N2-Fragment von G3P (G3P*) genutzt. Die feste Domäneninteraktion zwischen N1 und N2 sorgt für eine hohe Stabilität des nativen Proteins, und N2 wird durch die Wechselwirkung mit N1 stark stabilisiert (Erhöhung des T_M um 23 °C). Diese Domäneninteraktion blockiert allerdings den Zugang des bakteriellen Rezeptors TolA-C an seine Bindungsstelle auf N1. Diese Bindung von TolA-C an N1 ist jedoch obligatorisch für den Infektionsprozess. Der Preis für ein globuläres, stabiles G3P* ist deshalb die Notwendigkeit der Domänendissoziation im Verlauf der Infektion. Die initiale Bindung von N2 an den bakteriellen F Pilus führt auf noch unbekannte Weise zu einer Destrukturierung der Gelenkregion von G3P* und initiiert so die Domänendissoziation. Das so generierte, infektiöse Faltungsmittelstadium ist langlebig, weil die Rückfaltung in den nativen stabilen Ruhezustand durch die *trans*-nach-*cis* Isomerisierung (Zeitkonstante 6200 s⁻¹) von Pro213 in der Gelenkregion verlangsamt wird^{12, 80}.

Eine partielle Entfaltung der Struktur in der Gelenkregion alleine ist für die Bindung von TolA-C an N1 nicht ausreichend, es müssen tatsächlich beide Domänen voneinander dissoziieren um die Bindung von TolA-C zu ermöglichen. Dies belegt die Konstruktion einer Interdomänendisulfidbrücke abseits der Gelenkregion in einem ansonsten Cystein-freien G3P*. *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass die Disulfidbrücke unter oxidierenden Bedingungen beide Domänen miteinander verknüpft und so die Bindung an TolA-C blockiert. Dementsprechend ist auch ein Phagenkonstrukt mit dieser G3P*-Variante mit oxidiertem Disulfidbrücke tausendfach weniger infektiös als das gleiche Phagenkonstrukt mit reduziertem Disulfid, d.h. mit nicht aneinander geklammerten Domänen.

Die Infektion von *E. coli* Zellen durch den filamentösen Phagen IF1 läuft nach demselben sequentiellen Muster ab wie die Infektion durch den Phagen fd. Zunächst erfolgt die Bindung von N2 an den bakteriellen Pilus (beim Phagen IF1 an den I Pilus) und anschließend die Bindung von N1 an den terminalen Rezeptor TolA-C (siehe Abschnitt 4.1.3.1 und 4.1.3.2). Anhand von *in vitro* Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass IF1 G3P eine andere Domänenorganisation als das G3P* des Phagen fd besitzt, die sich auch auf den Infektionsmechanismus auswirkt. Messungen der thermodynamischen Stabilität und der Faltungsreaktionen, sowie Titrationsexperimente mit TolA-C beweisen, dass sich N1 und N2 in isolierter Form genauso verhalten wie als Teil von IF1 G3P*. Sie stellen damit zwei stabile,

unabhängige Einheiten dar, die sich gegenseitig weder in ihrer Stabilität noch in ihrem Faltungsverhalten beeinflussen. In nativem IF1 G3P* gibt es keine Domäneninteraktion, die Domänen verhalten sich vielmehr wie Perlen auf einer Schnur, die über einen Linker einer Länge von etwa 20 Aminosäuren verbunden sind. Aufgrund der fehlenden Domänenassoziation ist die Bindungsstelle für TolA-C auf N1 permanent zugänglich. Als Konsequenz der einfacheren Domänenorganisation im Vergleich zu fd G3P* ist keine Dissoziationsreaktion nach Bindung an den Pilus für die weitere Infektion erforderlich.

4.1.2 Der Infektionsmechanismus des Phagen IF1 kann auf den Phagen fd übertragen werden

Es stellt sich die Frage, ob der komplexe Infektionsmechanismus des Phagen fd mit Domänendissoziation und molekularer Zeitschaltuhr für die Lebensdauer des infektiösen Faltungsintermediats notwendig ist, oder ob er durch den einfacheren Infektionsmechanismus des Phagen IF1 ersetzt werden kann. Zur Beantwortung wurde die Domänenorganisation von IF1 G3P* in fd G3P* induziert, indem die Aminosäuren des β -Faltblattstrangs 6 der Gelenkregion von fd G3P* deletiert wurden ($\Delta\beta 6$ -G3P*). Kinetische Untersuchungen, Gleichgewichtsanalysen und Titrationsexperimente mit dem terminalen Rezeptor TolA-C ergaben, dass tatsächlich in $\Delta\beta 6$ -G3P* die Domäneninteraktion zwischen N1 und N2 aufgehoben ist. Aufgrund der marginalen Stabilität von N2, verursacht durch den Wegfall stabilisierender Interaktion mit N1, ist das Phagenkonstrukt fd- $\Delta\beta 6$ -G3P* allerdings deutlich weniger infektiös als der Ausgangsophage. Durch die geringe Stabilität von N2 ($T_M = 37^\circ\text{C}$) entstehen während der Phagenproduktion in *E. coli* Zellen, vermutlich durch Aggregation bedingt, uninfektiöse Phagenpartikel. Tatsächlich konnte die Infektiosität von fd- $\Delta\beta 6$ -G3P* auf das Niveau des Ausgangsphagen fd erhöht werden, indem selektiv die thermodynamische Stabilität der labilen N2 Domäne durch *consensus design* erhöht wurde. Dabei wurde in N2 eine irreguläre Faltblattschleife durch eine β -Faltblattschleife vom Typ I'-turn mit der optimalen Aminosäuresequenz Val-Asn-Gly ersetzt, was zu einer starken Stabilisierung von N2 führte⁶³. Die selektive Stabilisierung der N2 Domäne wurde anhand der gereinigten Proteine mittels thermischer Gleichgewichtsentfaltungen überprüft.

Interessanterweise wird in einem Kompetitionsexperiment dieses stabilisierte Phagenkonstrukt trotzdem schnell durch den Referenzphagen mit wildtypischem G3P* verdrängt, obwohl beide Phagen in getrennten Experimenten die gleiche Infektiosität zeigen. Dies deutet darauf hin, dass der wildtypische Phage schneller infizieren kann als Phagenkonstrukte ohne Domäneninteraktion aber mit stabilisierter N2 Domäne. Der Infektionsvorgang des Phagen fd ist durch die evolutionäre Entwicklung vermutlich auf eine schnelle und somit effiziente Infektion ausgerichtet, was bei den veränderten Phagen nicht in diesem Maße gegeben ist. Möglicherweise verlangsamt auch die durch die Deletion veränderte und nicht optimierte Distanz zwischen den Domänen N1 und N2 die Geschwindigkeit der Infektion.

4.1.3 Die entsprechenden Domänen im Gen-3-Protein der Phagen IF1 und fd erfüllen analoge Aufgaben

4.1.3.1 Die N2 Domäne diktiert die Wirtsspezifität

Die Domänenorganisation im G3P der Phagen IF und fd ist zwar unterschiedlich, die Domänen erfüllen jedoch analoge Aufgaben. Bei der Infektion nehmen beide Phagen zunächst über ihre N2 Domänen Kontakt zu einem bakteriellen Pilus auf. Da sich die Bindungspartner (I Pilus beim Phage IF1 und F Pilus beim Phagen fd) unterscheiden, zeigen die beiden N2 Domänen keine Sequenzhomologie. N2 von G3P diktiert die Wirtsspezifität der Phagen, also ob I Pilus- oder F Pilus-tragende *Enterobacteriaceae* als Wirt dienen. Dies belegen die hier durchgeführten *in vivo* Experimente, in denen die Wirtsspezifität des Phagen fd durch den Austausch seiner eigenen N2 Domäne durch die des Phagen IF1 geändert werden konnte. Die resultierende Phagenchimäre aus fd Phage und der N2 Domäne des Phagen IF1 infiziert nur I Pilus-tragende, nicht aber F Pilus-tragende Zellen.

4.1.3.2 Beide Phagen nutzen ihre N1 Domäne für die Bindung an den bakteriellen Rezeptor TolA-C

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde sowohl die isolierte N1 Domäne des Phagen IF1 als auch der Komplex aus IF1 N1 und TolA-C kristallisiert und die Strukturen mit einer Auflösung von 2,9 Å bzw. 2,5 Å gelöst. Die N1 Domänen der Phagen IF1 und fd sind einander strukturell äußerst ähnlich, obwohl sie eine Sequenzidentität von lediglich 30 % aufweisen. Strukturunterschiede zeigen sich nur in flexiblen Bereichen in denen fd N1 sowohl mit TolA-C als auch mit fd N2 wechselwirkt.

Für die Bindung an den bakteriellen Rezeptor TolA-C verwenden die beiden N1 Domänen das gleiche Bindungsmotiv, d.h. die Ausbildung eines intermolekularen β -Faltblattes. Der unterschiedliche Sequenzkontext führt aber dazu, dass die Affinität von IF1 N1 zu TolA-C etwa zehnfach niedriger ist als von fd N1. Vermutlich ist die Affinität von fd N1 deshalb höher, weil in diesem Fall die Bindung während der Infektion mit der Domänenassoziation von fd G3P* konkurrieren muss. Die N1 Domäne von IF1 G3P* ist in der Lage eine N1 Deletionsmutante des Phagen fd zu komplementieren. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die N1 Domänen der beiden Phagen auch *in vivo* den gleichen Bindungspartner, nämlich TolA-C, besitzen.

4.1.4 Der Vergleich der Phagen IF1 und fd verdeutlicht evolutive Mechanismen

Die Experimente mit den Phagen IF1 und fd veranschaulichen das Baukastenprinzip der Evolution. Vermutlich stammen beide Phagen von einem gemeinsamen Vorfahren ab, daher sind auch die meisten entsprechenden Proteine der beiden Phagen einander sehr ähnlich. Zur Anpassung an unterschiedliche ökologische Nischen, in diesem Fall *Enterobacteriaceae* mit

unterschiedlichen Pili, wurde nur das Adsorptionsprotein angepasst, der restliche Phage blieb weitgehend unverändert.

Das prominenteste Beispiel für diese Art der Evolution sind die 14 eng miteinander verwandten Darwin- oder Galapagosfinken, die ebenfalls alle von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen. Infolge der Anpassung an unterschiedliche ökologische Nischen, in diesem Fall unterschiedliche Nahrung, bildete jede Art eine eigene Schnabelform aus, ansonsten sind sich die Tiere jedoch ebenfalls sehr ähnlich.

Im Laufe ihrer Entwicklung bildeten beiden Phagen stabile Gen-3-Proteine mit eng verwandten N1 und CT Domänen, jedoch unterschiedlichen N2 Domänen aus. Die Stabilität der beiden Gen-3-Proteine entwickelte sich dabei auf unterschiedliche Weise. Während sich in IF G3P zwei eigenständige, stabile Domänen N1 und N2 etablierten, schöpft fd G3P einen Großteil seiner thermodynamischen Stabilität aus der starken Interaktion zwischen den beiden Domänen. Der Grund für diese divergente Entwicklung der Proteinstabilität ist unklar. Sie beruht möglicherweise auf Unterschieden in den Pili, die für die Infektion verwendet werden. Deren Strukturen sind allerdings nicht bekannt.

4.2 Die Chaperondomänen von SlpA und SlyD wurden durch die strukturbasierte Konstruktion von Disulfidbrücken stabilisiert

Native Disulfidbrücken tragen erheblich zur thermodynamischen Stabilität vieler Proteine bei. Der Verlust einer natürlichen Disulfidbrücke geht deshalb häufig mit einer starken Destabilisierung des Proteins einher⁸⁶ und es sind meist viele zusätzliche stabilisierende Mutationen nötig, um den Verlust einer Disulfidbrücke zu kompensieren⁸³. Umgekehrt kann durch den künstlichen Einbau einer Disulfidbrücke die thermodynamische Stabilität eines Proteins erhöht werden. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden die Chaperondomänen (IF Domänen) von SlyD und seinem Homolog SlpA durch die strukturbasierte Konstruktion von Disulfidbrücken stabilisiert.

Die wildtypische IF Domäne von SlpA ist in isolierter Form gefaltet und besitzt mit einem T_M von 55 °C eine nur geringe Stabilität. Mithilfe eines Modells, basierend auf der Struktur von SlyD, wurden sechs Aminosäurepositionen ausgewählt und drei Varianten der IF Domäne von SlpA mit je einer Disulfidbrücke erstellt. Die Substitution der endogenen Aminosäuren gegen Cysteine war bei allen Varianten destabilisierend, wie die Entfaltungsübergänge der reduzierten Varianten zeigten. In oxidiertem Form, d. h. mit ausgebildeter Disulfidbrücke, besaßen alle Varianten jedoch eine höhere Stabilität als das Wildtypprotein. Der destabilisierende Effekt der Cysteinsubstitution wurde also durch den stabilisierenden Effekt der Disulfidbrücke überkompensiert.

Bei der Stabilisierung von T4 Lysozym durch künstliche Disulfidbrücken konnten Matsumura *et al.* eine Korrelation der thermodynamischen Stabilität mit der Schleifengröße, also der Anzahl an Aminosäuren, die von der Disulfidbrücke umschlossen sind, feststellen⁸⁵. Die geringe Anzahl von lediglich drei Varianten lässt im Fall der SlpA IF Domäne eine

Überprüfung dieser Korrelation kaum zu. Es zeigt sich aber, dass die Destabilisierung durch die Cysteinsubstitutionen abnimmt, je näher sie den Kettenenden sind, d.h. je weniger strukturiert ihre Umgebung ist (siehe Abbildung 4-1, untere Balkengrenzen). Die größte Stabilisierung durch Ausbildung der Disulfidbrücke relativ zur reduzierten Form (Erhöhung von T_M um 40 °C), aber auch relativ zum Wildtypprotein (Erhöhung von T_M um 34 °C), zeigt die Variante IF Y9C-T50C, die eine Schleifengröße von 40 Aminosäuren ausbildet.

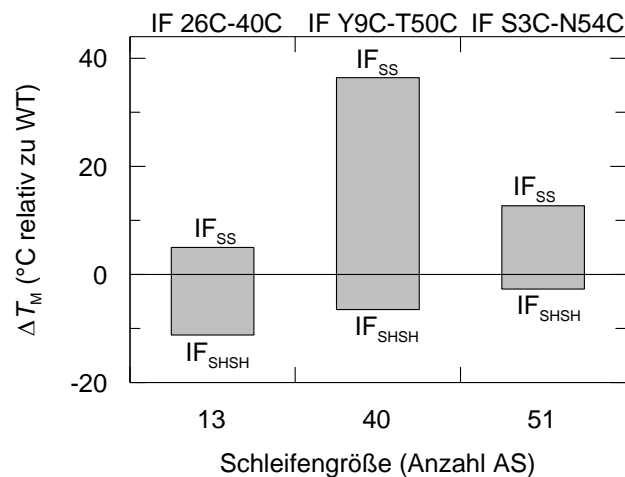


Abbildung 4-1: Auswirkung des Einbaus einer Disulfidbrücke auf die thermodynamische Stabilität der IF Domäne von SlpA. Es ist der Stabilitätsunterschied zum Wildtypprotein (Differenz der T_M -Werte) als Funktion der Schleifengröße, d.h. der von der Disulfidbrücke eingeschlossenen Anzahl an Aminosäuren, dargestellt. Die zugehörige Variante der IF Domäne ist oberhalb der Balken angegeben. Das obere Ende der Balken markiert die Differenz der T_M -Werte des Wildtypproteins und des T_M -Werts der IF Variante in oxidiert Form (IF_{SS}), das untere Ende des Balkens die Differenz der T_M -Werte des Wildtypproteins und des T_M -Werts der IF Domäne in reduzierter Form (IF_{SHSH}). Die Länge der Balken entspricht also der Stabilisierung durch die Ausbildung der Disulfidbrücke. Die Daten sind Tabelle 3-4 entnommen.

Die Erhöhung der thermodynamischen Stabilität aller Proteinvarianten, insbesondere die enorme Stabilisierung der IF Domäne durch die C9-C50 Disulfidbrücke zeigt den Erfolg dieses Projekts bei dem Versuch ein Protein durch den Einbau von Disulfidbrücken zu stabilisieren. Die strukturbasierte Neukonstruktion von Disulfidbrücken ist generell schwierig. Abgesehen von den negativen Effekten der Cystein-Substitutionen führen nicht optimal positionierte Disulfide oft zu Spannungen im nativen Protein, die den stabilisierenden Effekt der Disulfidbrücke sehr leicht zunichtemachen können. Deswegen gibt es neben humaner Carboanhydrase¹¹⁰, T4 Lysozym⁸⁵ oder dimeren ($\beta\alpha$)₄ Halbfässern⁶⁷ in der Literatur nur wenige weitere Beispiele, bei denen der Einbau einer Disulfidbrücke zu einer thermodynamischen Stabilisierung eines Proteins geführt hat.

Im Gesamtprotein SlpA, wie auch im homologen Protein SlyD, werden die Termini der IF Domäne durch die Faltung der FKBP Domäne zusammengehalten^{35, 88, 100}. Dies stabilisiert die IF Domäne entropisch. Bei SlyD hängt die konformationelle Faltung der IF Domäne tatsächlich von dieser Art der Stabilisierung ab. Sie ist in isolierter Form entfaltet. Durch den strukturbasierten Einbau einer Disulfidbrücke, die die Termini der IF Domäne kovalent

verbindet, wurde der Einfluss der FKBP Domäne von SlyD auf die IF Domäne nachgeahmt. Tatsächlich führt die Ausbildung dieses Disulfids zur gekoppelten konformationellen Faltung der IF Domäne. Die Auswahl der Positionen zur Einführung der Cysteine war somit erfolgreich, die Disulfidbrücke stabilisiert die IF Domäne. Eine Quantifizierung des stabilisierenden Effekts wie im Fall der IF Domäne von SlpA (Abbildung 4-1) ist nicht möglich, da die reduzierte Form in diesem Fall entfaltet ist und somit nicht charakterisiert werden kann. Die stabilisierte IF Domäne von SlyD in isolierter Form ist etwas weniger stabil, als wenn die IF Domäne als Teil von SlyD vorliegt. Die Rückfaltungs- und Entfaltungsreaktionen der stabilisierten IF Domäne sind sehr schnell. Sie laufen im unteren Millisekundenbereich ($\tau = 5$ ms) ab und liegen im gleichen Zeitbereich wie die Faltung der IF Domäne als Teil von SlyD. Die kinetischen Analysen belegen, dass die IF Domäne nur in oxidiertem Form konformationell gefaltet ist und durch Reduktion entfaltet werden kann. Die apparenten Raten der oxidativen Faltung bzw. der reduktiven Entfaltung entsprechen in guter Näherung den Oxidations- bzw. Reduktionsraten des Disulfids, da die konformationelle Faltung um drei Größenordnungen schneller abläuft als die Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen. Dies macht diese Variante der IF Domäne zu einem geeigneten Substrat um die Aktivität von Thioloxygenasen in der oxidativen Proteinfaltung zu charakterisieren.

4.3 Chaperondomänen sind als Substratbindungsmodule für die Thioloxygenasefunktion wichtig

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die isolierte IF Domäne von SlyD mit Cystein-Substitutionen (IF_{SHSH}) eingesetzt um die Beschleunigung der oxidativen Proteinfaltung durch die bakterielle Thioloxygenase DsbA W76F W126F (DsbA*) zu analysieren. Die oxidative Faltung konnte anhand der intrinsischen Fluoreszenzänderung der IF Domäne während der Faltung sehr gut verfolgt werden. Untersucht wurde auch die Thioloxygenaseaktivität der eukaryotischen Disulfidisomerase PDI, sowie eines PDI-Fragments, das nur aus der katalytisch aktiven α' Domäne und der C-terminalen Extension besteht (PDI $\alpha'c$). Darüber hinaus konnte die Thioloxygenaseaktivität der homodimeren Disulfidisomerase DsbC aus *E. coli* analysiert werden. Um die Bedeutung der beiden aktiven Zentren für die Funktion von DsbC zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Form von DsbC erstellt, bei der die beiden Monomeren kovalent verbunden waren und ein aktives Zentrum durch zwei Punktmutationen inaktiviert wurde (DsbC-sc-17*). Die Aufklärung der Kristallstruktur von DsbC-sc-17* mit einer Auflösung von 2,3 Å zeigte, dass diese kovalente Verknüpfung der Ketten keinen Einfluss auf die Struktur von DsbC hat. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse war sichergestellt, dass alle untersuchten Faltungsenzyme, unabhängig vom Reduktionspotential des katalytischen Disulfids, in der vollständig oxidierten Form eingesetzt wurden.

Die oxidative Faltung ist ein komplexer Vorgang: Zunächst reagiert ein Thiolation des reduzierten Substrats nukleophil mit einem Cystein des katalytischen Disulfids der Oxidase

und es bildet sich ein kovalent verbrückter Komplex. Dieser Reaktion geht möglicherweise in einigen Fällen eine nicht kovalente Komplexbildung voraus. Anschließend greift das freie Thiolation des Substratproteins nukleophil am Substrat-Cystein des Heterodisulfids an und so entsteht eine intramolekulare Disulfidbrücke im Substratprotein. Im letzten Schritt dissoziieren oxidiertes Substrat und reduzierte Thioloxydase.

Bei der Oxidation von IF_{SHSH} durch PDI, DsbC, DsbC-sc-17* und DsbA* wurde jeweils eine schnelle und eine langsame Reaktionsphase detektiert. Die schnelle Phase war in allen Fällen abhängig vom pH Wert des Puffers und der Konzentration der Thioloxydase. Dies deutet darauf hin, dass diese Phase der Bildung des Heterodisulfids entspricht. Die langsame Phase war vom pH und der Oxidasekonzentration unabhängig und stellt wahrscheinlich die Dissoziation der Reaktionspartner nach Ablauf der Reaktion dar.

Für das a´c-Fragment von PDI ohne Chaperondomäne und mit nur einem aktiven Zentrum war die katalysierte Faltung von IF_{SHSH} ebenfalls konzentrationsabhängig, aber sehr langsam und einphasig. Vermutlich bestimmt hier die langsame Ausbildung des gemischten Disulfids die Geschwindigkeit der gesamten oxidativen Faltungsreaktion.

Die Zunahme der Raten der schnellen Reaktion als Funktion der Proteinkonzentration ist ein Maß für die Effizienz der Thioloxydasen analog dem k_{cat}/K_M -Wert anderer Enzyme. Die Geradensteigungen sind mit den Reduktionspotentialen der Faltungshelfer in Tabelle 4-1 zusammengestellt.

Tabelle 4-1: Zusammenstellung der katalytischen Effizienz bei der Oxidation von IF_{SHSH} und der Reduktionspotentialen der untersuchten Thioloxydasen

Protein	Effizienz ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Reduktionspotential (mV)
DsbA	0,08	-122
PDI a´c	0,01	-152
DsbC-sc-17*	1,6	-140
DsbC	1,6	-140
PDI (a/a´)	3,2	-175 (-188/-152)

Es sind die Steigungen der Regressionsgeraden aus der Auftragung der Reaktionsraten der Oxidation von IF_{SHSH} (pH 7,8) als Funktion der Faltungshelferkonzentration, zusammen mit den biochemischen Standardreduktionspotential der Faltungshelfer dargestellt ¹⁰⁹. Die angegebenen Geradensteigungen sind ein Maß für die Effizienz der Thioloxydasen, analog dem k_{cat}/K_M -Wert anderer Enzyme

Je negativer das Reduktionspotential eines Proteins ist, desto stärker ist seine Wirkung als Reduktionsmittel. Die Potentialdifferenz zwischen Thioloxydase und IF_{SHSH} ist die thermodynamische Triebkraft der Oxidationsreaktion, wobei für entfaltete Proteine wie IF_{SHSH} ein Reduktionspotential von -220 mV angenommen wird ⁴⁸. Unter den hier getesteten Faltungshelfern ist die Potentialdifferenz zu IF_{SHSH} bei DsbA am größten. Am schnellsten wird IF_{SHSH} jedoch durch PDI oxidiert, am langsamsten durch PDI a´c, gefolgt von DsbA. Die

Aktivität ist also nicht mit den Reduktionspotentialen der Thioloxygenasen korreliert, wie häufig vermutet wird. Das Reduktionspotential ist ein thermodynamischer, kein kinetischer Parameter und enthält folglich keine Information über die Reaktionsgeschwindigkeit. Es gibt lediglich an, ob bzw. wie weit eine Reaktion abläuft. Geschwindigkeitsbestimmend sind aber Faktoren wie die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums, oder die Affinität für das Substrat. Die in diesen Versuchsreihen aktivsten Faltungshelfer sind die Disulfidisomerasen PDI und DsbC. Beide Proteine besitzen eine U-förmige Quartärstruktur, bei der zwei Thioredoxindomänen mit den aktiven Zentren die Schenkel des U, und Chaperondomänen, die als Substratbindungsstellen fungieren, die Basis des U bilden. Dabei sind nicht die beiden gegenüberliegenden aktiven Zentren in einem Molekül für die hohe Oxidaseaktivität von DsbC und PDI verantwortlich, sondern die Chaperondomänen. So besitzt DsbC-sc-17* nur noch eines der beiden aktiven Zentren, aber einen intakten Chaperonbereich. Die nahezu unveränderte Aktivität gegenüber wildtypischem DsbC zeigt, dass nicht beide katalytischen Disulfide gleichzeitig für Substrate zugänglich und zudem nicht die zwei aktiven Zentren in einem Molekül für die hohe Enzymaktivität verantwortlich sind. Wird dagegen bei PDI ein aktives Zentrum und zusätzlich die Substratbindungsstelle deletiert (PDI a'c), resultiert dies in einer sehr starken Abnahme der Aktivität. Dieser Aktivitätsverlust korreliert also mit dem Verlust der Substratbindungsstellen.

Chaperondomänen als Substratbindungsstellen sind auch bei der anderen Klasse der Faltungshelfer, den Peptidyl-Prolylisomerasen sehr wichtig. Hier sorgt eine zusätzliche Chaperondomäne für eine effiziente Katalyse der Prolylisomerisierung in faltenden Proteinen. Auch hier führt die relativ unspezifische aber gute Bindung von Substratproteinen zu einer starken Erhöhung der Effizienz der Peptidyl-Prolylisomerasen^{32,44}. Tatsächlich zeigen Experimente mit Chimären aus der Chaperondomäne von Disulfidisomerasen und der Peptidyl-Prolylisomerasedomäne von Prolylisomerasen, dass die Verwendung von Chaperondomänen als Substratbindungsstellen generisch ist und diese unter Funktionserhalt zwischen den Faltungshelfern ausgetauscht werden können (mündl. Mitteilung A.-J. Geitner). Hydrophobe Bindungsoberflächen bzw. Chaperondomänen in Faltungshelfern eignen sich prinzipiell sehr gut für die Substratbindung, da sie zwischen nativen und nicht-nativen Bindungspartnern unterscheiden können und die Bindung ausreichend dynamisch für einen schnellen Substratumsatz ist.

DsbA, das *in vivo* die Funktion einer Thioloxygenase hat, war in diesen *in vitro* Tests nur mäßig aktiv. In entfalteten Polypeptidketten, z.B. nach der Translokation ins Periplasma, bilden sich unter oxidativen Bedingungen bevorzugt konsekutive Disulfide aus. Die Ausbildung nativer Disulfide ist dagegen umso wahrscheinlicher, je strukturierter das Protein vorliegt. Eine eher langsame Oxidation entfalteter Polypeptidketten durch DsbA könnte deshalb *in vivo* durchaus wünschenswert sein, um die vollständige Translokation von Proteinen und die Ausbildung von Teilstrukturen vor der Oxidation zu ermöglichen. Auf diese Weise kann möglicherweise die Bildung nicht nativer Disulfide verringert werden.

4.4 Chaperondomänen sind als Substratbindungsmodule für die Disulfidisomerasefunktion wichtig

Besitzen Proteine mehr als zwei Cysteine, können sich während der oxidativen Faltung nicht-native Disulfidbrücken ausbilden. Da Proteine mit fehlverbrückten Cysteinen nicht in die biologisch aktive Struktur falten können und damit potentiell zytotoxisch sind, gibt es zelluläre Systeme (Disulfidisomerasen), die in der Lage sind nicht-native Disulfidbrücken aufzulösen. Die katalytischen Disulfide der Disulfidisomerasen liegen *in vivo* zumindest teilweise reduziert vor und können so nicht-native Disulfidbrücken in Substratproteinen reduzieren. Entweder erfolgt dann im teilreduzierten Substratprotein die Isomerisierung der verbliebenen nicht-nativen Disulfidbrücken hin zur nativen Konformation, oder das Substratprotein wird durch die Disulfidisomerasen vollständig reduziert, so dass erneut eine oxidative Faltung erfolgt. *In vivo* laufen wahrscheinlich beide Vorgänge ab¹⁰⁵.

Zur Bestimmung der Schlüsselkomponenten eines Faltungshelfers für eine Disulfidisomeraseaktivität wurde die bakterielle Disulfidisomerase DsbC, die DsbC-Variante mit nur einem katalytisch aktiven Disulfid DsbC-sc-17*, die eukaryontische Disulfidisomerase PDI, das PDI Fragment mit nur einem katalytischen Disulfid und ohne Substratbindungsstelle PDI a'c und die Thioloxidase DsbA auf ihre Disulfidisomeraseaktivität getestet. Hierzu wurde ein neuer, sensitiver Test auf Basis von fehlverbrückter RNase T1 und Fluorophor-markierten Oligonukleotiden etabliert, deren Hydrolyse fluoreszenzspektroskopisch beobachtet werden kann. Die Reaktivierung fehlgefalteter RNase T1 erfordert die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken. Sie wurde durch Inkubation mit Faltungshelfern in Gegenwart einer Mischung aus 5 mM GSH und 1 mM GSSG initiiert, und die RNase Aktivität des Rückfaltungsansatzes in Zeitintervallen anhand der Hydrolyse der Oligonukleotide bestimmt. Im Gegensatz zu den vorhandenen Testsystemen auf Basis der Reaktivierung von fehlverbrückter RNaseA und cCMP als Substrat ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, sowie die Reproduzierbarkeit dieses Rückfaltungstests sehr gut.

PDI und DsbC zeigen in diesem Test die höchste Disulfidisomeraseaktivität. DsbC-sc-17* mit nur noch einem aktiven Zentrum reaktiviert fehlgefaltete RNase T1 fast genauso schnell wie wildtypisches DsbC mit zwei aktiven Zentren (Tabelle 3-6). Die Deletion der Substratbindungsstelle zusätzlich zu einem aktiven Zentrum in PDI (PDI a'c) resultiert jedoch in einem Aktivitätsverlust. Wie bei der Katalyse der oxidativen Faltung (4.3), ist also die Substratbindung über die Chaperondomänen auch für die Aktivität als Disulfidisomerase entscheidend und nicht die Gegenwart zweier aktiver Zentren in einem Molekül. Die sehr ähnlichen Aktivitäten von DsbC und DsbC-sc-17* zeigen zudem, dass in DsbC nicht beide katalytischen Disulfide gleichzeitig zugänglich sind. Möglicherweise sind aber bei komplexeren Substratproteinen mit einer höheren Anzahl nicht-nativer Disulfide zwei aktive Zentren für die Isomeraseaktivität von Vorteil, dies würde die konvergente Entwicklung der Quartärstruktur von DsbC und PDI erklären.

Die fehlende Disulfidisomeraseaktivität von DsbA kann durch die schwach ausgeprägte Substratbindungsstelle, oder aber das hohe Reduktionspotential begründet sein, das möglicherweise keine Katalyse der Reduktion zulässt (Tabelle 3-6). Dies ist jedoch schwer abzuschätzen, da das Reduktionspotential nicht-nativer Disulfidbrücken unbekannt ist.

4.5 Mia40 ist eine neuartige Thioloxidase im Intermembranraum von Mitochondrien

4.5.1 Mia40 besitzt keine strukturelle Ähnlichkeit zu bekannten Thioloxidasen

Der Intermembranraum von Mitochondrien (IMS) ist neben dem endoplasmatischen Retikulum ein weiteres Zellkompartiment, in dem Disulfidbrücken-haltige Proteine gefunden wurden. Kürzlich wurde Mia40 als die primäre Thioloxidase im IMS identifiziert ⁵⁰. In dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur von Mia40 mit einer Auflösung von 2,3 Å gelöst. Der Vergleich dieser Struktur mit der NMR-Struktur von Mia40 und der Kristallstruktur eines Fusionsproteins aus MBP und wildtypischen Mia40 ⁵¹ (Auflösung 3 Å) zeigt, dass sich die Proteinkerne aller Strukturen von Mia40 nahezu perfekt decken und sich nur die Lage des aktiven Zentrums unterscheidet. Dies veranschaulicht das Bauprinzip von Mia40: Die Kombination eines rigiden schalenförmigen Proteinkerns, der eine ausgeprägt hydrophobe Oberfläche präsentiert, mit einem beweglichen Schwenkarm, auf dem das katalytische Disulfid, also das aktive Zentrum lokalisiert ist. Damit unterscheidet sich Mia40 von allen bekannten Thioloxidasen, bei denen als Gerüstprotein für das katalytische Disulfid eine Thioredoxindomäne verwendet wird.

4.5.2 Mia40 assembliert bei rekombinanter Expression ein 2Fe-2S-Cluster

Gereinigtes Mia40, das rekombinant im Cytosol von *E. coli* exprimiert wurde, weist eine rötlich-braune Färbung auf. Anhand von Absorptionsspektren von anaerob gereinigtem Mia40 wurde gezeigt, dass Mia40 ein 2Fe-2S-Cluster assembliert. Dies wird wahrscheinlich durch die Dimerisierung zweier Mia40 Moleküle ermöglicht. Ob die Fähigkeit der 2Fe-2S-Cluster Assemblierung von Mia40 physiologisch wichtig ist, ist ungeklärt. Bekannt ist aber, dass die Fe-S-Cluster (ISC) Assemblierungsmaschinerie der mitochondrialen Matrix eng mit der Bildung cytosolischer Fe-S-Cluster verknüpft ist. Ist der Transport von Komponenten der ISC Maschinerie durch das IMS gestört, ist auch die Biogenese von Fe-S-Proteinen im Cytosol beeinträchtigt ¹¹¹. Ein wichtiger Bestandteil des Transportwegs durch den IMS ist die Thioloxidase Erv1, die außerdem spezifisch mit Mia40 interagiert und dessen katalytisches Disulfid oxidiert. Wird Erv1 *in vivo* ausgeschaltet, ist die Fe-S-Cluster Bildung im Cytosol gestört ¹¹². Die nachgewiesene Interaktion mit Erv1 und die Fähigkeit zur Assemblierung von Fe-S-Clustern deuten darauf hin, dass Mia40 ein weiteres Bindeglied zwischen mitochondrialer und cytosolischer ISC Assemblierungsmaschinerie sein könnte.

4.5.3 Mia40 zeigt eine hohe Chaperonaktivität

In *in vitro* Experimenten zeigt Mia40 eine hohe Chaperonaktivität. Trotz seiner geringen Größe von 12 kDa (inklusive C-terminaler Extension) hemmt Mia40 die Aggregation von rückfaltender Citratsynthase etwa so gut wie DsbC (ca. 51 kDa). Neben Mia40 zeigen viele weitere Faltungshelfer Chaperonaktivität, z.B. die Disulfidisomerasen PDI und DsbC, oder die Peptidyl-Prolylisomerasen Triggerfaktor und SlyD³². Vermutlich ist die Chaperonaktivität kein Selbstzweck der Faltungshelfer, sondern ein positiver, sekundärer Effekt der hydrophoben Substratbindungsstelle.

4.5.4 Mia40 zeigt *in vitro* keine Disulfidisomeraseaktivität

Die meisten der bekannten Disulfid-haltigen Proteine im IMS besitzen mehr als zwei Cysteine¹¹³. Da deshalb prinzipiell eine Fehlverbrückung dieser Proteine möglich ist, wurde vermutet, dass Mia40 als Thioloxidase und gleichzeitig auch als Disulfidisomerase fungiert, analog zu PDI im ER. In den hier durchgeführten *in vitro* Experimenten zeigt Mia40 keine Disulfidisomeraseaktivität. Es ist nicht in der Lage die Reaktivierung fehlverbrückte RNase T1 zu katalysieren, obwohl es die Merkmale einer Disulfidisomerase besitzt. Mia40 weist ein niedriges Reduktionspotential auf, das sogar noch etwas niedriger als das von PDI ist (Tabelle 3-6). Zudem zeigt Mia40 eine ausgeprägte Chaperonaktivität und sollte daher in der Lage sein, nicht native Proteine zu binden.

Möglicherweise zeigt Mia40 *in vitro* keine Disulfidisomeraseaktivität, weil es eine hohe Substratspezifität¹⁰⁸ besitzt und daher RNase T1 nicht als Substrat akzeptiert. Tatsächlich haben alle bekannten Substratproteine von Mia40 eine ähnliche Struktur, die darüber hinaus homolog zu der von Mia40 ist. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Bindung von Mia40 an RNase T1 nicht dynamisch genug für einen effizienten Substratumsatz ist.

Möglicherweise besitzt Mia40 *in vivo* aber auch tatsächlich keine Disulfidisomeraseaktivität. Die Substrate von Mia40 besitzen zwar mehr als zwei Cysteine und Fehlverbrückungen sollten daher möglich sein. Wenn aber die Proteine schon im reduzierten Zustand in eine nativ ähnliche Struktur falten können ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass bei der Oxidation nicht-native Disulfide entstehen. Zur Beantwortung dieser Fragen werden in zukünftigen Experimenten Mia40 Varianten ohne katalytisches Disulfid zur Bestimmung der Bindung geeigneter Substratproteine (z.B. RCM-RNase T1) erstellt. Außerdem werden natürliche Substratproteine von Mia40 und die Analyse ihrer oxidativen Faltung in Gegenwart von Mia40 Aufschluss über den Mechanismus der Interaktionen von Mia40 und seinen Substratproteinen geben.

5 Zusammenfassung

Die filamentösen Phagen IF1 und fd sind eng miteinander verwandt. Dies spiegelt sich auch bei der Infektion von *E. coli* Zellen wider, die bei beiden Phagen nach einem Zweischnittmechanismus abläuft, der durch die jeweiligen Gen-3-Proteine (G3P) vermittelt wird. Im ersten Schritt bindet die N2 Domäne von G3P an den bakteriellen Pilus, beim Phagen IF1 an den I Pilus, beim Phagen fd an den F Pilus. Durch die spezifische Bindung an einen Pilus bestimmt also die N2 Domäne von G3P die Wirtsspezifität des Phagen. Alleine durch Substitution der endogenen N2 Domäne des Phagen fd gegen die N2 Domäne des Phagen IF1 kann die Wirtsspezifität des Phagen fd hin zu I Pilus-tragenden Zellen verändert werden. Im zweiten Schritt der Infektion interagiert in beiden Fällen die N1 Domäne mit dem bakteriellen Rezeptor TolA-C. *In vitro* binden die N1 Domänen der G3Ps beider Phagen mit demselben Bindungsmuster an die gleiche Stelle von TolA-C. Dies konnte durch die Aufklärung der Kristallstrukturen der isolierten IF1 N1 Domäne, sowie der Struktur des Komplexes aus IF1 N1 und TolA-C nachgewiesen werden. Höchstwahrscheinlich erfüllen sie auch *in vivo* die gleiche Aufgabe, da sie sich gegenseitig funktional komplementieren können.

Obwohl die Abfolge der Bindungsschritte bei der Infektion gleich ist, unterscheidet sich der molekulare Mechanismus der Infektion, da die G3Ps der Phagen IF1 und fd eine verschiedenartige Domänenorganisation besitzen. Im G3P des Phagen IF1 stellen N1 und N2 zwei eigenständige und stabile Einheiten dar, gleich Perlen auf einer Schnur. Sie beeinflussen sich gegenseitig nicht, daher sind die Bindungsstellen für I Pilus und TolA-C permanent zugänglich.

Im Gegensatz dazu liegt das native G3P des Phagen fd in einer geschlossenen, inaktiven Konformation vor, in der N1 und N2 fest miteinander assoziiert sind und die Bindungsfläche für TolA-C auf N1 in der Grenzfläche zwischen N1 und N2 verborgen ist. Die Bindung von N2 an den bakteriellen F Pilus führt zu einer partiellen Destrukturierung der Gelenkregion zwischen N1 und N2 und so zur Domänen dissoziation, wodurch die Bindungsstelle für TolA-C auf N1 zugänglich wird. Die Rückfaltung dieses infektiösen Faltungsintermediats in den thermodynamisch stabilen, geschlossenen Zustand ist durch eine langsame *trans*-nach-*cis* Isomerisierung eines Prolins in der Gelenkregion kontrolliert.

Dieser komplexe, an die partielle Entfaltung von G3P gekoppelte Infektionsmechanismus des Phagen fd konnte in den einfacheren Infektionsmechanismus des Phagen IF1 überführt werden, indem die Domäneninteraktion durch die Deletion von sieben Aminosäuren im Gelenkbereich zwischen N1 und N2 aufgelöst wurde. Eine Erhöhung der Infektionsraten auf das Niveau des Referenzphagen fd wurde durch eine nachträgliche selektive Stabilisierung der N2 Domäne erreicht.

Die Phagen fd und IF1 entwickelten unterschiedliche Strategien um Infektiosität und eine hohe thermodynamische Stabilität der G3Ps zu vereinen. In IF1 G3P bildeten sich zwei eigenständige, stabile Domänen aus, die nicht miteinander interagieren. In fd G3P hingegen

etablierte sich eine geschlossene Konformation, in der die labile N2 Domäne durch eine starke Assoziation mit der N1 Domäne stabilisiert wird.

Die Notwendigkeit der Domänen dissoziation in G3P während der Infektion durch den Phagen fd wurde durch die Konstruktion eines G3Ps nachgewiesen, in dem N1 und N2 durch eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft sind. Diese Verknüpfung verhindert die Domänen dissoziation und folglich die Infektion. Das Phagenkonstrukt mit dieser G3P Variante als Vermittler der Infektion ermöglicht eine steuerbare Infektion, die durch Reduktion der Disulfidbrücke induziert werden kann.

Die Konstruktion von Disulfidbrücken wurde ebenfalls benutzt, um die Chaperondomäne der Peptidyl-Prolylisomerase SlpA enorm zu stabilisieren. In weitergehenden Untersuchungen werden die Disulfidbrücken in das Vollängenprotein SlpA eingebaut, um die Auswirkung dieser entropischen Stabilisierung auf Funktion und Stabilität des Zweidomänenproteins analysieren zu können.

Die Chaperondomäne der Peptidyl-Prolylisomerase SlyD, die in isolierter Form ungefaltet vorliegt, konnte ebenfalls durch den Einbau einer Disulfidbrücke stabilisiert werden. Die konformationelle Faltung dieser stabilisierten Variante ist strikt an die Ausbildung der Disulfidbrücke gekoppelt. Daher eignet sich dieses Protein hervorragend als Substrat, um die Beschleunigung der oxidativen Faltung durch verschiedene Thioloxygenasen zu charakterisieren. Die Effizienz der Katalyse der oxidativen Faltung korreliert dabei nicht mit dem Reduktionspotential der Faltungshelfer, sondern mit der Fähigkeit nicht-native Substratproteine über hydrophobe Bindungsflächen, hier Chaperondomänen, zu binden. Dementsprechend zeigten die Disulfidisomerasen PDI und DsbC die stärkste Beschleunigung der oxidativen Faltung. Die Bedeutung der Chaperondomäne für DsbC konnte durch den Einsatz einer Variante mit nur noch einem aktiven Zentrum, aber intakter Chaperondomäne analysiert werden. Für diese Variante wurde die Kristallstruktur gelöst (Auflösung 2,3 Å).

Die Bindung nicht-nativer Substrate über Chaperondomänen, sowie ein geeignetes Reduktionspotential des katalytischen Disulfids, sind ebenfalls Voraussetzungen für eine Disulfidisomeraseaktivität von Faltungshelfern. Deshalb besitzen PDI und DsbC neben einer hohen Thioloxygenaseaktivität auch eine hohe Disulfidisomeraseaktivität. Für diese Untersuchungen wurde ein sensitiver Test auf Grundlage der Reaktivierung fehlgefalteter RNase T1 und der Hydrolyse von Fluorophor-markierten Oligonukleotiden etabliert und zur Analyse von PDI, DsbC und DsbA eingesetzt.

Mia40 ist eine neuartige Thioloxygenase im Intermembranraum von Mitochondrien. Für Mia40 konnte die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,3 Å gelöst werden. Dies entspricht einer wesentlichen Verbesserung im Vergleich zur 3 Å-Struktur eines Fusionsproteins aus wildtypischem Mia40 und Maltosebindeprotein. Mia40 zeigt keine strukturelle Ähnlichkeit zu bekannten Thioloxygenasen. Ein weiteres Novum für eine Thioloxygenase ist die Fähigkeit zur Assemblierung eines 2Fe-2S-Clusters, wie es durch rekombinant produziertes Mia40 geschieht. Die physiologische Bedeutung ist noch ungeklärt.

Wie viele andere Faltungshelfer wirkt Mia40 als Chaperon, *in vitro* verhindert es effektiv die Aggregation rückfaltender Citratsynthase.

Mia40 zeigt *in vitro* lediglich Oxidase,- aber keine Disulfidisomeraseaktivität. Ob Mia40 *in vivo* ausschließlich als Thioloxidase wirkt, oder bei speziellen Substraten doch fehlerhafte Disulfidbrücken auflösen kann, ist noch unklar. Weitergehende Analysen zur Bindung permanent ungefalteter Substrate mit Disulfid-freien Varianten von Mia40, sowie die Charakterisierung der Interaktion von Mia40 mit natürlichen Substraten werden weiteren Aufschluss über Substratspezifität und den katalytischen Mechanismus von Mia40 bringen.

6 Summary

The close relationship between the filamentous phages fd and IF1 is reflected in the infection mechanism. Both phages infect *E. coli* cells by using their gene-3-proteins (G3P) in a two step fashion. First, they establish contacts to the bacterial cell via an interaction of the N2 domain of their G3Ps with the bacterial sex pilus. By binding to a specific pilus, the N2 domain of G3P determines the host specificity of the phage: phage IF1 infects only *E. coli* strains bearing I pili, phage fd infects only *E. coli* strains bearing F pili. The substitution of the endogenous N2 domain of phage fd by the N2 domain of phage IF1 was sufficient to alter the host specificity of phage fd from cells bearing F pili towards cells bearing I pili.

In the second step, the N1 domain binds to the C-terminal domain of the periplasmic receptor TolA. The N1 domains of both phages bind in a similar fashion to the same site on TolA-C. This could be demonstrated by solving the crystal structure of the complex between IF1 N1 and TolA-C (resolution 2.5 Å), as well as the crystal structure of isolated IF N1 (resolution 2.9 Å). The N1 domains of both phages have in all probability the same function *in vivo*, as they are able to complement each other functionally.

Although the chronology of the binding steps is the same for both phages, the molecular mechanism of infection differs due to a different domain organization in their G3Ps. In G3P of the phage IF1, N1 and N2 behave like pearls on a string. They are structurally independent and stable domains that are permanently active for binding.

In contrast, G3P of phage fd exists in a closed, inactive state in which the two domains are tightly associated. This ensures a high stability of G3P, but renders the phage incompetent for infection because the binding site for TolA-C is buried at the domain interface. The initial binding of N2 to the F pilus leads to a local unfolding and prolyl *cis*-to-*trans* isomerization of Pro213 in the hinge between the domains. This abolishes the domain interactions and exposes the binding site of N1 for TolA-C. *Trans*-Pro213 arrests G3P in the unlocked infectious form, and the slow *trans*-to-*cis* isomerization is used as a timer to control the life time of the infectious, but partially unfolded form of G3P.

This complex, unfolding-coupled infection mechanism could be changed to the simple infection mechanism of phage IF1 by deleting seven residues in the hinge between N1 and N2 and thus eliminating the interdomain interaction in G3P of phage fd. Infection rates as high as those of wildtype phage fd could be attained by improving the conformational stability of the N2 domain.

The two phages fd and IF1 used different evolutionary strategies to reconcile infectivity with a high stability of their G3Ps. In the G3P of phage IF1, the two domains N1 and N2 are independent entities and show high thermodynamic stabilities. Phage fd developed a closed form in which the labile N2 domain is stabilized and protected from unfolding by a tight association with the N1 domain.

That domain dissociation in G3P of phage fd is in fact a prerequisite for the infection process was demonstrated by connecting N1 and N2 covalently via a disulfide bond. The

phage construct with this G3P variant allows a controllable infection, which can be induced by the reduction of the disulfide, thus breaking the covalent linkage between the two domains.

A massive stabilization of the isolated chaperone domain of the peptidyl-prolyl isomerase SlpA could be achieved by inserting artificial disulfide bonds. In on-going studies, these disulfide bonds will be introduced into the full length protein SlpA to analyze the effects on the function and the thermodynamic stability of this two domain protein.

The chaperone domain of the SlpA-homolog SlyD, which is unfolded in isolated form, could also be stabilized by the introduction of a disulfide bond. The stabilization results in a conformational refolding reaction of this protein domain, which is coupled with disulfide bond formation. Therefore this construct could be used to characterize the acceleration of oxidative folding by the folding helpers DsbA, DsbC and PDI. A DsbC construct with only a single active site but an intact chaperone domain was used to elucidate the importance of chaperone domains as substrate binding sites in DsbC. The crystal structure of this DsbC variant was solved with a resolution of 2.3 Å. The performance of thiol oxidases as folding helpers does not correlate with their reduction potential. Instead, PDI and DsbC caused the strongest acceleration, presumably because they contain powerful chaperone domains. These serve as substrate binding sites, which are able to discriminate between native and non-native proteins.

The ability to bind non-native proteins via chaperone domains, together with a suitable reduction potential are also prerequisites for folding helpers to show disulfide isomerase activity. Therefore, PDI and DsbC are not only good thiol oxidases, but also efficient disulfide isomerases. For analyzing disulfide isomerase activity, we established an assay for disulfide isomerase activity, based on the reactivation of scrambled RNase T1. A sensitive probe for RNase activity is provided by the fluorescence change caused by the hydrolysis of a labeled oligonucleotide.

Mia40 is a novel thiol oxidase, which is located in the intermembrane space of mitochondria. The crystal structure of Mia40 could be solved to a resolution of 2.3Å, which is a considerable improvement in comparison with the existing structure of a fusion protein consisting of wildtype Mia40 and maltose binding protein (resolution 3 Å). Mia40 shows no structural relationship to other known thiol oxidases. Another novelty is the ability of recombinantly produced Mia40 to assemble a 2Fe-2S-cluster. However, the physiological role of the Fe-S-cluster assembly remains unclear. Like many other folding helpers, Mia40 displays also chaperone activity. It inhibits effectively the aggregation of refolding citrate synthase.

In vitro, Mia40 solely displays thiol oxidase, but no disulfide isomerase activity. Whether Mia40 functions *in vivo* simply as thiol oxidase, or whether it is also able to shuffle non-native disulfides in specific substrate proteins remains unclear. Future studies will focus on the binding of permanently unfolded proteins to disulfide-free Mia40 variants as well as on the interaction of Mia40 with natural substrate proteins to elucidate the substrate specificity and the catalytic mechanism of Mia40.

7 Abkürzungsverzeichnis

AEDANS	5-(((Acetylamino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
Amp	Ampicillin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	Circulardichroismus
cfu	<i>colony forming unit</i> (Kolonie-bildende Einheit)
ΔC_p	Wärmekapazitätsänderung während der Entfaltung eines Proteins bei konstantem Druck
$\Delta\beta 6$ -G3P*	fd G3P*, bei dem die Aminosäuren 157-162 deletiert sind
$\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG	$\Delta\beta 6$ -G3P*, bei dem die Aminosäuren 96-102 gegen die Sequenz Val-Asn-Gly substituiert sind
Cm	Chloramphenicol
CT	C-terminale Domäne des Gen-3-Proteins
Cyp18	Cyclophilin 18
d	Schichtdicke
D	Denaturierungsmittel
$[D]_{1/2}$	Mittelpunkt des Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltungsübergangs
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
dNTP	Desoxyribonukleotide
DsbC-sc-14/17/20	DsbC Varianten, bei denen die beiden Untereinheiten des Homodimers kovalent über einen Linker der Länge von 14, 17 oder 20 Aminosäuren verbunden sind
Dsb-sc-17*	DsbC-sc-17 Variante, in der die Cysteine des katalytischen Zentrums der C-terminalen Untereinheit gegen Alanine substituiert sind
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
dYT	double <i>yeast-tryptone</i> -Medium
ϵ_λ	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
ER	endoplasmatisches Retikulum
fd G3P*	Fragment des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen fd, bestehend aus den beiden N-terminalen Domänen (Aminosäuren 1-219) inklusive der stabilisierenden Mutationen T13I, T101I, Q129H und D209Y
fd N1	N1 Domäne von fd G3P* (Aminosäuren 1-62)
fd N2	N2 Domäne von fd G3P* (Aminosäuren 102-205)
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
G3P	Gen-3-Protein filamentöser Phagen
G3P*-Clamp	OSS-G3P*-Var21 aus der Arbeit von Kather <i>et al.</i> ⁸³ mit den zusätzlichen Mutationen D24C, G153C
ΔG_D	freie Enthalpie der Entfaltungsreaktion
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
ΔH_D	Enthalpie der Entfaltungsreaktion
IAEDANS	5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure

IF1 G3P*	Fragment des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen IF1, bestehend aus den beiden N-terminalen Domänen (Aminosäuren 1-264)
IF1 N1	N1 Domäne von IF1 G3P* (Aminosäuren 1-65)
IF1 N2	N2 Domäne von IF1 G3P* (Aminosäuren 84-264)
IF Domäne	<i>insert in flap</i> Domäne, Chaperondomäne von SlyD und SlpA
IF _{SHSH}	isolierte Chaperondomäne von SlyD mit den Aminosäuresubstitutionen D72C, N122C und D101W in reduzierter Form
IFSS	isolierte Chaperondomäne von SlyD mit den Aminosäuresubstitutionen D72C, N122C und D101W in oxidiert Form
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k_{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion
K_D	Dissoziationskonstante
k_{NU}	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Entfaltungsreaktion
k_{UN}	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Rückfaltungsreaktion
λ	apparente Ratenkonstante ($k_{NU} + k_{UN}$)
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge
m	Kooperativitätsparameter der Entfaltungsreaktion ($\delta\Delta G_D / \delta\Delta[D]$)
m_{NU}	kinetischer m -Wert der Entfaltungsreaktion ($\delta\ln k_{NU} / \delta\Delta[D]$)
m_{UN}	kinetischer m -Wert der Rückfaltungsreaktion ($\delta\ln k_{UN} / \delta\Delta[D]$)
MBP	Maltose-Bindeprotein
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i> (Verhältnis von Phagen zu Zellen)
n	Brechungsindex
N	nativer Zustand eines Proteins
N1	N1-Domäne des Gen-3-Proteins
N2	N2-Domäne des Gen-3-Proteins
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBS-Puffer	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDI	Proteindisulfidisomerase
PDI a'c	Fragment von PDI bestehend aus der a Domäne mit C-terminaler Extension (Aminosäuren 360-511)
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PNK	Polynukleotidkinase
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SlpA	<i>SlyD like protein</i>
SlyD	<i>sensitive to lysis D</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
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TolA-C	C-terminale Domäne von TolA bzw. isoliertes Fragment (AS 295-421 + Cys-(Ala) ₃ -(His) ₆)
TolA-C_AEDANS	AEDANS-markiertes TolA-C
Tricin	N-(Tris(hydroxymethyl)-methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
τ	Zeitkonstante einer Reaktion
T_M	Mittelpunkt des thermischen Entfaltungübergangs
U	entfalteter Zustand eines Proteins
ÜNK	Übernachtkultur
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp (Protein mit unveränderter Aminosäuresequenz)

8 Literaturverzeichnis

1. Anfinsen, C.B., Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 1973. **181**(96): p. 223-30.
2. So much more to know. *Science*, 2005. **309**: p. 78-102.
3. Levinthal, C.J., Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.*, 1968. **65**: p. 44-45.
4. Bartlett, A.I. and S.E. Radford, An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(6): p. 582-8.
5. Gianni, S., et al., Identification and characterization of protein folding intermediates. *Biophys Chem*, 2007. **128**(2-3): p. 105-13.
6. Dobson, C.M., Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. **15**(1): p. 3-16.
7. Brockwell, D.J. and S.E. Radford, Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr Opin Struct Biol*, 2007. **17**(1): p. 30-7.
8. Wolynes, P.G., Folding funnels and energy landscapes of larger proteins within the capillarity approximation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(12): p. 6170-5.
9. Dill, K.A., et al., The protein folding problem. *Annu Rev Biophys*, 2008. **37**: p. 289-316.
10. Dill, K.A. and H.S. Chan, From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol*, 1997. **4**(1): p. 10-9.
11. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(6): p. 574-81.
12. Eckert, B., et al., Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005. **12**(7): p. 619-623.
13. Marvin, D.A., Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol*, 1998. **8**(2): p. 150-158.
14. Model, P. and M. Russel, Filamentous Bacteriophage, in *The Bacteriophages*, R. Calendar, Editor. 1988, Plenum Publishing: New York. p. 375-456.
15. Lubkowski, J., et al., Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure*, 1999. **7**(6): p. 711-722.
16. Lubkowski, J., et al., The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of G3P. *Nature Structural Biology*, 1998. **5**(2): p. 140-147.
17. Holliger, P., L. Riechmann, and R.L. Williams, 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*, 1999. **288**(4): p. 649-657.
18. Martin, A. and F.X. Schmid, The folding mechanism of a two-domain protein: folding kinetics and domain docking of the gene-3-protein of phage fd. *J. Mol. Biol.*, 2003. **329**: p. 599-610.
19. Martin, A. and F.X. Schmid, A proline switch controls folding and domain interactions in the gene-3-protein of the filamentous phage fd. *J. Mol. Biol.*, 2003. **331**: p. 1131-1140.
20. Weininger, U., et al., A remote prolyl isomerization controls domain assembly via a hydrogen bonding network. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(30): p. 12335-40.
21. Eckert, B., Die Bedeutung der Stabilität und des Faltungsmechanismus des Gen-3-Proteins filamentöser Phagen für die Infektion von Escherichia coli, Dissertation 2007, Universität Bayreuth.
22. Ellis, R.J. and A.P. Minton, Cell biology: join the crowd. *Nature*, 2003. **425**(6953): p. 27-8.
23. Ellis, R.J. and A.P. Minton, Protein aggregation in crowded environments. *Biol Chem*, 2006. **387**(5): p. 485-97.
24. Fink, A.L., Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des*, 1998. **3**(1): p. R9-23.
25. Dobson, C.M., Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(9): p. 329-32.
26. Stefani, M., Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1739**(1): p. 5-25.
27. Hartl, F.U., Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996. **381**(6583): p. 571-580.

28. Ellis, R.J. and S.M. van der Vies, Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, 1991. **60**: p. 321-47.
29. Ferbitz, L., et al., Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature*, 2004. **431**(7008): p. 590-596.
30. Cheng, M.-Y., et al., Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature*, 1989. **337**: p. 620-625.
31. Sanders, S.L., et al., Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell*, 1992. **69**(2): p. 353-65.
32. Knappe, T.A., et al., Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. *J Mol Biol*, 2007. **368**(5): p. 1458-68.
33. Kandror, O., et al., Trigger factor is involved in GroEL-dependent protein degradation in Escherichia coli and promotes binding of GroEL to unfolded proteins. *EMBO Journal*, 1995. **14**(23): p. 6021-6027.
34. Heras, B., et al., Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(24): p. 8876-81.
35. Hottenrott, S., et al., The Escherichia coli SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(25): p. 15697-15701.
36. Tian, G., et al., The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell*, 2006. **124**(1): p. 61-73.
37. Stoller, G., et al., Identification of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase bound to the Escherichia coli ribosome as the trigger factor. *EMBO Journal*, 1995. **14**: p. 4939-4948.
38. Ramm, K. and A. Plückthun, High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric E. coli peptidyl-prolyl-isomerase FkpA. *J Mol Biol*, 2001. **310**(2): p. 485-98.
39. Landry, S.J. and L.M. Gierasch, Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to in vivo protein folding. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struc.*, 1994. 23645-669.
40. Cheng, H.N. and F.A. Bovey, Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycyl-L-proline. *Biopolymers*, 1977. **16**: p. 1465-1472.
41. Scherer, G., et al., Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998. **120**: p. 5568-5574.
42. Stewart, D.E., A. Sarkar, and J.E. Wampler, Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *Journal of Molecular Biology*, 1990. **214**: p. 253-260.
43. Schmid, F.X., Prolyl isomerases. *Adv. Protein Chem.*, 2002. **59**: p. 243-282.
44. Jakob, R.P., et al., Chaperone domains convert prolyl isomerases into generic catalysts of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(48): p. 20282-7.
45. Mamathambika, B.S. and J.C. Bardwell, Disulfide-linked protein folding pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2008. **24**: p. 211-35.
46. McCarthy, A.A., et al., Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from Escherichia coli. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(3): p. 196-9.
47. Heras, B., et al., The name's bond. disulfide bond. *Curr Opin Struct Biol*, 2007. **17**(6): p. 691-8.
48. Hatahet, F. and L.W. Ruddock, Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(11): p. 2807-50.
49. Schirra, H.J., et al., Structure of reduced DsbA from Escherichia coli in solution. *Biochemistry*, 1998. **37**(18): p. 6263-76.
50. Banci, L., et al., MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(2): p. 198-206.
51. Kawano, S., et al., Structural basis of yeast Tim40/Mia40 as an oxidative translocator in the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(34): p. 14403-7.
52. Tanford, C., The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science*, 1978. **200**(4345): p. 1012-8.
53. Thornton, J.M., Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol*, 1981. **151**(2): p. 261-87.
54. Pace, C.N., et al., Forces contributing to the conformational stability of proteins. *Faseb J*, 1996. **10**(1): p. 75-83.

55. Martin, A., T.A. Baker, and R.T. Sauer, Protein unfolding by a AAA+ protease is dependent on ATP-hydrolysis rates and substrate energy landscapes. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. **15**(2): p. 139-45.
56. Arnold, F.H., et al., How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(2): p. 100-6.
57. Tokuriki, N. and D.S. Tawfik, Stability effects of mutations and protein evolvability. *Curr Opin Struct Biol*, 2009. **19**(5): p. 596-604.
58. Alexander, P.A., et al., A minimal sequence code for switching protein structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(50): p. 21149-54.
59. Eijsink, V.G., et al., Rational engineering of enzyme stability. *J Biotechnol*, 2004. **113**(1-3): p. 105-20.
60. Fukuchi, S. and K. Nishikawa, Protein surface amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. *J Mol Biol*, 2001. **309**(4): p. 835-43.
61. Perl, D., et al., Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(5): p. 380-383.
62. Reetz, M.T., J.D. Carballeira, and A. Vogel, Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. **45**(46): p. 7745-51.
63. Jakob, R.P., et al., Elimination of a cis-proline-containing loop and turn optimization stabilizes a protein and accelerates its folding. *J Mol Biol*, 2010. **399**(2): p. 331-46.
64. Wunderlich, M., et al., Optimization of the gbeta1 domain by computational design and by in vitro evolution: structural and energetic basis of stabilization. *J Mol Biol*, 2007. **373**(3): p. 775-84.
65. Kather, I., C.A. Bippes, and F.X. Schmid, A stable disulfide-free gene-3-protein of phage fd generated by in vitro evolution. *J Mol Biol*, 2005. **354**(3): p. 666-78.
66. Tian, G., et al., The catalytic activity of protein-disulfide isomerase requires a conformationally flexible molecule. *J Biol Chem*, 2008. **283**(48): p. 33630-40.
67. Richter, M., et al., Computational and experimental evidence for the evolution of a (beta alpha)8-barrel protein from an ancestral quarter-barrel stabilised by disulfide bonds. *J Mol Biol*, 2010. **398**(5): p. 763-73.
68. Riechmann, L. and P. Holliger, The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell*, 1997. **90**(2): p. 351-360.
69. Krebber, C., et al., Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel in vivo selection for protein-ligand interactions. *J Mol Biol*, 1997. **268**(3): p. 607-18.
70. Emsley, P. and K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
71. Adams, P.D., et al., PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010. **66**(Pt 2): p. 213-21.
72. Guex, N. and M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997. **18**(15): p. 2714-2723.
73. Schagger, H. and G. von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 1987. **166**: p. 368-379.
74. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, Molecular Cloning - A laboratory manual. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory press.
75. Privalov, P.L., Physical basis of the stability of the folded conformations of proteins. *IN Protein folding*, 1993.
76. Beasty, A.M., et al., 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*, 1986. **25**(10): p. 2965-74.
77. Santoro, M.M. and D.W. Bolen, Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl α - chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 1988. **27**: p. 8063-8068.
78. Buchner, J., H. Grallert, and U. Jakob, Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods Enzymol*, 1998. **290**: p. 323-38.

79. Martin, A. and F.X. Schmid, 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.*, 2003. **328**: p. 863-875.
80. Eckert, B. and F.X. Schmid, A conformational unfolding reaction activates phage fd for the infection of Escherichia coli. *J Mol Biol*, 2007. **373**(2): p. 452-61.
81. Krissinel, E. and K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol*, 2007. **372**(3): p. 774-97.
82. Jakob, R.P. and F.X. Schmid, Energetic coupling between native-state prolyl isomerization and conformational protein folding. *J Mol Biol*, 2008. **377**(5): p. 1560-75.
83. Kather, I., et al., Changing the determinants of protein stability from covalent to non-covalent interactions by in vitro evolution: a structural and energetic analysis. *J Mol Biol*, 2008. **381**(4): p. 1040-54.
84. Combet, C., et al., Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics*, 2002. **18**(1): p. 213-4.
85. Matsumura, M., et al., Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(17): p. 6562-6.
86. Pace, C.N., et al., Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**: p. 11820-11825.
87. Weininger, U., et al., The prolyl isomerase domain of PpiD from Escherichia coli shows a parvulin fold but is devoid of catalytic activity. *Protein Sci*, 2010. **19**(1): p. 6-18.
88. Zoldak, G., et al., Consequences of domain insertion on the stability and folding mechanism of a protein. *J Mol Biol*, 2009. **386**(4): p. 1138-52.
89. Myers, J.K., C.N. Pace, and J.M. Scholtz, Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Science*, 1995. **4**: p. 2138-2148.
90. Hwang, C., A.J. Sinskey, and H.F. Lodish, Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 1992. **257**(5076): p. 1496-502.
91. Hennecke, J., et al., Quenching of tryptophan fluorescence by the active-site disulfide bridge in the DsbA protein from Escherichia coli. *Biochemistry*, 1997. **36**(21): p. 6391-6400.
92. Rietsch, A., et al., Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol*, 1997. **179**(21): p. 6602-8.
93. Stepanenko, O.V., et al., Conformational change of the dimeric DsbC molecule induced by GdnHCl. A study by intrinsic fluorescence. *Biochemistry*, 2004. **43**(18): p. 5296-303.
94. Arredondo, S.A., et al., Role of dimerization in the catalytic properties of the Escherichia coli disulfide isomerase DsbC. *J Biol Chem*, 2009. **284**(36): p. 23972-9.
95. Mesecke, N., et al., A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*, 2005. **121**(7): p. 1059-69.
96. Sideris, D.P., et al., A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J Cell Biol*, 2009. **187**(7): p. 1007-22.
97. Chacinska, A., et al., Mitochondrial biogenesis, switching the sorting pathway of the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem*, 2008. **283**(44): p. 29723-9.
98. Daithankar, V.N., S.R. Farrell, and C. Thorpe, Augmenter of liver regeneration: substrate specificity of a flavin-dependent oxidoreductase from the mitochondrial intermembrane space. *Biochemistry*, 2009. **48**(22): p. 4828-37.
99. Varga, E., Charakterisierung der thermodynamischen Stabilität und Oxidaseaktivität von Mia40, Bachelorarbeit 2009, University Bayreuth.
100. Weininger, U., et al., NMR solution structure of SlyD from Escherichia coli: spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function. *J Mol Biol*, 2009. **387**(2): p. 295-305.
101. Cai, H., C.C. Wang, and C.L. Tsou, Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(40): p. 24550-24552.
102. Höll-Neugebauer, B., et al., Reconstitution of a Heat Shock Effect In vitro - Influence of GroE on the Thermal Aggregation of alpha-Glucosidase from Yeast. *Biochemistry*, 1991. **30**(50): p. 11609-11614.
103. Hestekamp, T. and B. Bukau, Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in E.coli. *Embo J*, 1998. **17**(16): p. 4818-28.

104. Freeman, B.C., D.O. Toft, and R.I. Morimoto, Molecular chaperone machines: Chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science*, 1996. **274**(5293): p. 1718-1720.
105. Shouldice, S.R., et al., In vivo oxidative protein folding can be facilitated by oxidation-reduction cycling. *Mol Microbiol*, 2010. **75**(1): p. 13-28.
106. Crook, E.M., A.P. Mathias, and B.R. Rabin, Spectrophotometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of cytidine 2':3'-phosphate. *Biochem J*, 1960. **74**: p. 234-8.
107. Kiefhaber, T., et al., Replacement of a cis proline simplifies the mechanism of ribonuclease T1 folding. *Biochemistry*, 1990. **29**: p. 6475-6480.
108. Chacinska, A., et al., Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *Embo J*, 2004. **23**(19): p. 3735-46.
109. Wouters, M.A., S.W. Fan, and N.L. Haworth, Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*. **12**(1): p. 53-91.
110. Martensson, L.G., M. Karlsson, and U. Carlsson, Dramatic stabilization of the native state of human carbonic anhydrase II by an engineered disulfide bond. *Biochemistry*, 2002. **41**(52): p. 15867-75.
111. Lill, R. and U. Muhlenhoff, Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem*, 2008. **77**: p. 669-700.
112. Lange, H., et al., An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep*, 2001. **2**(8): p. 715-20.
113. Longen, S., et al., Systematic analysis of the twin cx(9)c protein family. *J Mol Biol*, 2009. **393**(2): p. 356-68.

9 Anhang

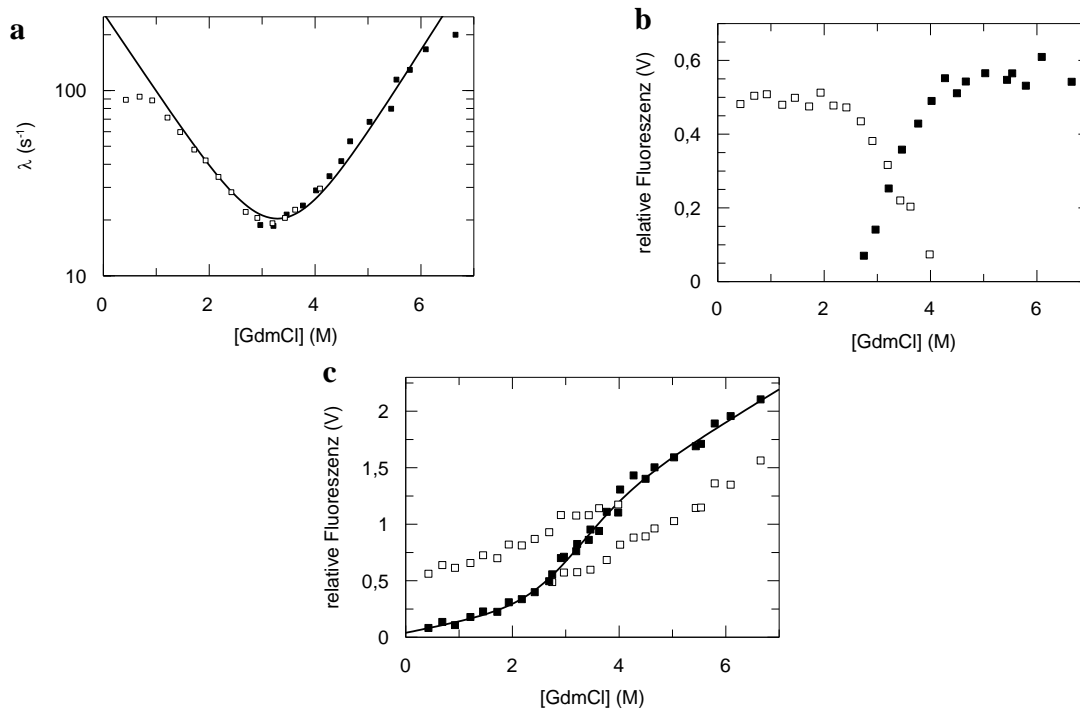


Abbildung 9-1: (a) Chevron-Auftragung der Faltungsraten der N1 Domäne in $\Delta\beta 6$ -G3P*. (b) Auftragung der Amplituden der Rückfaltungs- (\square) und Entfaltungsreaktionen (\blacksquare) gegen die GdmCl-Konzentration. (c) Auftragung der Start- (\square) und Endwerte (\blacksquare) der Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen gegen die GdmCl-Konzentration. Die durchgezogene Linie repräsentiert den Angleich gemäß eines Zweizustandsmodells an die Datenpunkte.

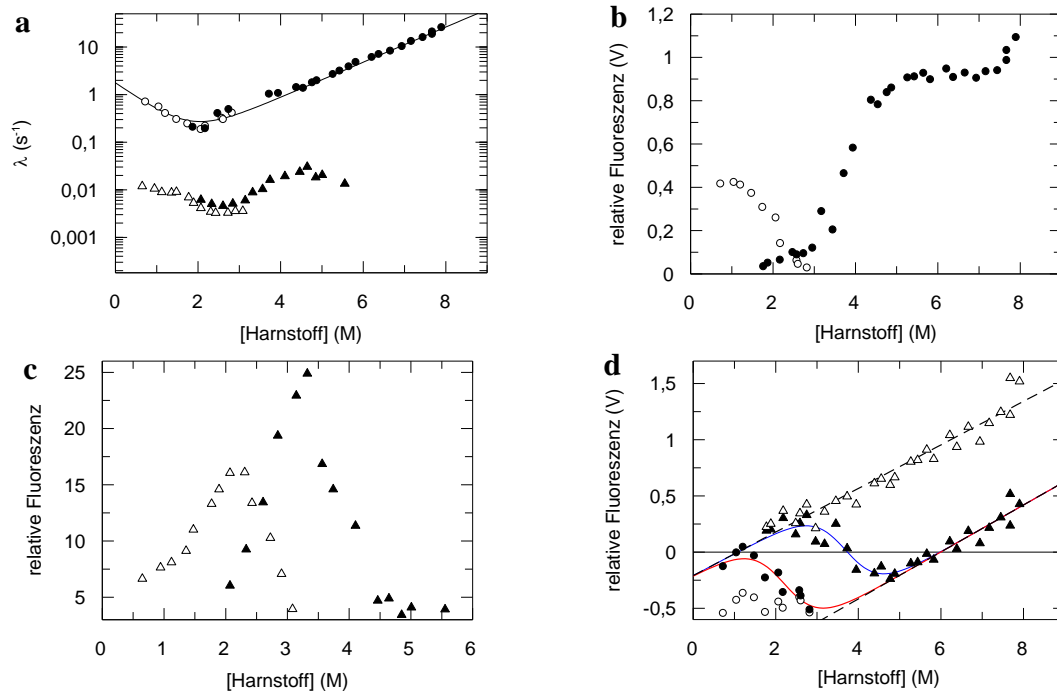


Abbildung 9-2: (a) Chevron Auftragung der Faltungsraten der N2 Domäne in $\Delta\beta 6\text{-G3P}^*$. (b,c) Auftragung der Amplituden der Rückfaltungs- (\circ , Δ) und Entfaltungsreaktionen (\bullet , \blacktriangle) gegen die Harnstoff-Konzentration. In (b) sind die Amplituden der schnellen Faltungsreaktion von N2, in (c) die Amplituden der langsamen Faltungsreaktion von N2 dargestellt. (d) Auftragung der Start- (\circ , Δ) und Endwerte (\bullet , \blacktriangle) der schnellen Faltungsreaktionen von N2. Die Hysterese der Endwerte der Ent- und Rückfaltung ist auf die langsame Isomerisierungsreaktion von Prolin 161 zurückzuführen. Die rote Kurve zeigt einen Angleich nach einem Zweizustandsmodell an die Daten der Rückfaltung, die blaue Kurve an die Daten der Entfaltung (Tabelle 9-5).

Tabelle 9-1: Zusammenstellung der Sequenzidentitäten der Proteine der filamentösen Phagen IF1 und fd

Protein	Funktion	Sequenzidentität (%)
G1P	Phagenassemblierung	64
G2P	Replikation	14
G3P	Hüllprotein	30
	N1 Bindung TolA-C	31
	N2 Pilus Bindung	9
	CTD Verankerung des G3P in Phagenhülle	45
G4P	Phagenfreisetzung	52
G5P	ss-DNA Bindeprotein	10
G6P	Hüllprotein	53
G7P	Hüllprotein	48
G8P	Hüllprotein	58
G9P	Hüllprotein	40

Die Sequenzidentitäten wurden mit Hilfe des Programms BioEdit berechnet.

Tabelle 9-2: Parameter der Analyse der thermodynamischen Messungen der isolierten Domänen N1 und N2, sowie von N1 und N2 in fd G3P* und IF1 G3P*

	IF1 G3P				fd G3P*			
	N1	isolierte N1	N2	isolierte N2	N1	isolierte N1	N2	isolierte N2
Datenquelle								
a) Thermischer Übergang								
T_M	66,9	67,2	53,5	53,0	66,0	67,5	61,2	37,8
ΔH_{vH}	214	232	492	548	228	235	640	310
$\Delta G_D^{65^\circ\text{C}/55^\circ\text{C}}$	1,2	1,5	-2,3	-3,4	0,7	1,7	-11,3	-20,4
b) GdmCl-induzierter Übergang								
$[\text{GdmCl}]_M$	3,6	3,6	1,42	1,47	3,2	3,3	1,4	n.d.
m	8,6	7,8	19,4	20,1	8,9	8,9	18,8	n.d.
$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$	31,3	29,0	27,7	29,7	28,6	29,2	26,6	n.d.

a) Für alle Proteine sind die Temperatur am Übergangsmittelpunkt T_M , die van't Hoff Enthalpie der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt (ΔH_{vH}) und die Gibbs freie Enthalpie der Entfaltung ($\Delta G_D^{65^\circ\text{C}/55^\circ\text{C}}$) bei 65 °C bzw. 55 °C (N2 Domäne von IF G3P*) angegeben. Der Fehlerbereich ist $\pm 0,5$ °C für den Übergangsmittelpunkt und $\pm 5\%$ für ΔH_{vH} . Die thermodynamischen Parameter der CD-Messung der Entfaltung von fd G3P und den isolierten Domänen wurden von ⁷⁹ und ⁸² übernommen. Die CD-Daten wurden mittels nicht-linearer Regression mit einer festgesetzten Änderung der Wärmekapazität ΔC_p von 1000 J mol⁻¹ K⁻¹ für die N1 Domäne und von 10000 J mol⁻¹ K⁻¹ für die N2 Domäne in fd G3P* bzw. 8000 J mol⁻¹ K⁻¹ für IF1 G3P* analysiert. Die Übergänge wurden mit 4 μM Protein (bzw. 2 μM Protein für N2 in IF G3P*) in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichttiefe von 1 cm gemessen.

b) Der Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmCl}]_M$, der Wert des Kooperativitätsparameters am Übergangsmittelpunkt m und die Gibbs freie Enthalpie der Entfaltung bei 25 °C $\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ sind für die Entfaltung der Domänen N1 und N2 von IF1 G3P* und fd G3P* angegeben. Wegen der geringen Stabilität der isolierten N2 Domäne von fd G3P* konnten die entsprechenden Daten nicht erhoben werden. Aufgrund der relativ geringen Änderungen der Fluoreszenz wird die Genauigkeit der thermodynamischen Parameter mit $\pm 10\%$ abgeschätzt. Die Daten für fd G3P* wurden der Publikation von Martin *et al.* ⁷⁹ entnommen. Der Übergang der isolierten N1 Domäne von IF1 G3P* wurde anhand der Fluoreszenz bei 325 nm, der der isolierten N2 Domäne von If1 G3P* bei 360 nm und der von IF1 G3P* bei 340 nm jeweils nach Anregung bei 280 nm detektiert. Die experimentellen Daten der isolierten Domänen wurden gemäß einem Zweizustandsmodell, die Daten von IF1 G3P* gemäß einem Dreizustandsmodell analysiert. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0,5 μM in 0,1 M K-Phosphat, pH 7,0.

Tabelle 9-3: Statistik der Diffraktionsdaten und der Strukturverfeinerung des Kristalls von IF1 N1 und dem Komplex aus IF1 und TolA-C

	IF1 N1	IF1 N1/TolA-C
Totale/Unabhängige Reflexe	67023/5589	65604/15411
R_s^*	0,106 (0,68)	0,044 (0,65)
Auflösungsgrenze (Å)	35–2,92 (3,00– 2,92)	32,2–2,47 (2,53–2,47)
Vollständigkeit (%)	99,7 (100,0)	97,5 (89,0)
$(I)/(\sigma I)$	20,6 (3,9)	21,0 (2,2)
Modell R/R_{free} -Faktor †, %	24,3/26,7	18,1/22,9
Standardabweichung von idealer Geometrie		
Bindungslängen (Å)	0,010	0,007
Bindungswinkel (°)	1,1	1,0
Ramachandran Analyse (%)		
am meisten favorisierte Region/erlaubte Region/generell erlaubte Region/unerlaubte Region	84,5/15,5/0,0/0,0	88,8/11,2/0,0/0,0

* $R_s = \frac{\sum_h \sum_i I_i(h) - \langle I(h) \rangle / \sum_i \sum_i I_i(h)}{\sum_i \sum_i I_i(h)}$, wobei i die unabhängigen Beobachtungen der Reflektion h sind.
†Der R_{free} Faktor wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig entfernt wurden, bevor die Verfeinerung ausgeführt wurde.

Tabelle 9-4: Parameter der Faltungsreaktionen der isolierten Domänen N1 und N2, sowie der Domänen in $\Delta\beta 6$ -G3P*

	k_{UN} (s ⁻¹)	k_{NU} (s ⁻¹)	m_{UN} (M ⁻¹)	m_{NU} (M ⁻¹)	[Denat.] _M (M)	ΔG_{D} (kJ mol ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)
G3P*							
N1 isoliert	261,7	0,326	-0,98	1,037	3,3	16,6	5,0
N2 isoliert	3,87	0,043	-1,71	0,77	1,8	10,8	6,0
$\Delta\beta 6$-G3P*							
Domäne N1	225,3	0,291	-0,94	1,081	3,3	16,5	4,8
Domäne N2	1,74	0,029	-1,37	0,851	1,8	9,8	5,3

Die kinetischen Daten wurden anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals in *stopped flow*- bzw. Handmisch-Experimenten bestimmt und nach einem Zweizustandsmodell analysiert. Die mikroskopischen Raten der Rückfaltung k_{UN} und Entfaltung k_{NU} bei 0 M GdmCl, sowie die kinetischen m -Werte der Rückfaltung m_{UN} und Entfaltung m_{NU} sind in der Tabelle angegeben. Der Übergangsmittelpunkt [GdmCl]_M wurde nach folgender Gleichung berechnet: $[\text{GdmCl}]_{\text{M}} = \ln(k_{\text{NU}}/k_{\text{UN}})/m_{\text{UN}} - m_{\text{NU}}$. Der Kooperativitätsparameter m wurde aus den kinetischen m -Werten bestimmt ($m = RT(m_{\text{NU}} - m_{\text{UN}})$). Die Gibbs freie Energie ΔG_{D} der Entfaltung bei 25 °C für N1 und bei 15 °C für N2 wurde wie folgt berechnet: $\Delta G_{\text{D}} = -RT \ln(k_{\text{NU}}/k_{\text{UN}})$. Daten der isolierten N2 Domäne: Dr. R.P. Jakob.

Tabelle 9-5: Parameter der Start-/Endwertanalyse der Domänen N1 und N2 in $\Delta\beta 6$ -G3P*

	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	[GdmCl] _M (M)	ΔG_D (kJ mol ⁻¹)
Domäne N1	4,5	3,3	13,8
Domäne N2	n.d.	n.d.	n.d.
Rückfaltung	5,7	2,2	12,7
Entfaltung	5,8	3,7	21,6

Die kinetischen Daten wurden anhand des Fluoreszenzsignals in *stopped flow*- bzw. Handmisch-Experimenten bestimmt und die Start-/Endwerte der Faltungsreaktionen nach einem Zweizustandsmodell analysiert. Es sind die Werte des Übergangsmittelpunkts [GdmCl]_M, des Kooperativitätsparameters m und die Gibbs freie Energie der Denaturierung ΔG_D bei 25 °C für die N1 Domäne von G3P $\Delta\beta 6$ und bei 15 °C für die N2 Domäne von G3P $\Delta\beta 6$ angegeben.

Tabelle 9-6: Stabilitätsdaten für $\Delta\beta 6$ -G3P* und $\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG aus der thermischen Entfaltung

		T_M (°C)	ΔH_{vH} (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{40/60^\circ C}$ (kJ mol ⁻¹)
Übergang N2	$\Delta\beta 6$ -G3P*	35,3	328	-5,2
	$\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG	44,9	375	5,6
Übergang N1	$\Delta\beta 6$ -G3P*	64,3	208	2,6
	$\Delta\beta 6$ -G3P*-VNG	64,2	254	3,1

Für die verschiedenen G3P*-Varianten sind die Schmelztemperaturen T_M , die Enthalpien der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt ΔH_{vH} und die freien Enthalpien der Entfaltung $\Delta G_D^{40^\circ C}$ und $\Delta G_D^{60^\circ C}$ angegeben. Die Übergänge der N2 Domäne wurden anhand der Absorption bei 296 nm verfolgt und gemäß einem Dreizustandsmodell analysiert. Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde eine konstante Änderung der Wärmekapazität von $\Delta C_p = 8000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ für N2 und von $\Delta C_p = 1000 \text{ J mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ für N1 angenommen.

Tabelle 9-7: Datenstatistik zur Kristallstruktur von DsbC-sc-17*

	DsbC-sc-17*
Totale/Unabhängige Reflexe	72352/19891
R_s^*	0,064 (0,34)
Auflösungsgrenze (Å)	23,5–2,3 (2,42–2,3)
Vollständigkeit (%)	99,8 (95,3)
$(I)/(\sigma I)$	14,7 (3,5)
Modell R/R_{free} -Faktor, % †	18,0/23,4
Standardabweichung von idealer Geometrie	
Bindungslängen (Å)	0,010
Bindungswinkel (°)	1,2
Ramachandran Analyse (%):	
am meisten favorisierte Region/erlaubte Region/generell erlaubte Region/unerlaubte Region	94,7/5,3/0,0/0,0

* $R_s = \frac{\sum_h \sum_i I_i(h) - \langle I(h) \rangle}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$, wobei i die unabhängigen Beobachtungen der Reflektion h sind.
†Der R_{free} Faktor wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig entfernt wurden, bevor die Verfeinerung ausgeführt wurde.

Tabelle 9-8: Datenstatistik zur Kristallstruktur von yMia40

	Mia40
Totale/Unabhängige Reflexe	6,825 / 100,396
R_s^*	0,04 (0,52)
Auflösungsgrenze (Å)	30 – 2,35 (2,40 – 2,35)
Vollständigkeit (%)	99,6 (100 %)
$(I)/(\sigma I)$	45,2 (6,3)
Modell R/R_{free} -Faktor, % †	23,2 / 27,6
Standardabweichung von idealer Geometrie	
Bindungslängen (Å)	0,009
Bindungswinkel (°)	1,1
Ramachandran Analyse (%):	
am meisten favorisierte Region/erlaubte Region/generell erlaubte Region/unerlaubte Region	83,0/17,0/0,0/0,0

* $R_s = \frac{\sum_h \sum_i I_i(h) - \langle I(h) \rangle}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$, wobei i die unabhängigen Beobachtungen der Reflektion h sind.
†Der R_{free} Faktor wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig entfernt wurden, bevor die Verfeinerung ausgeführt wurde.

Die in dieser Arbeit zur Klonierung und Mutagenese von Proteinen, sowie die zur Erstellung verschiedener Phagenkonstrukte verwendeten Oligodesoxyribonukleotide sind in Tabelle 9-9 aufgeführt.

Tabelle 9-9: Auflistung aller verwendeter Oligonukleotide

Name	Basensequenz in 5'→3'Richtung	Verwendung
Phagen- und G3P-spezifische Oligodesoxyribonukleotide		
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Kolonie-PCR, Sequenzierung
T7-Terminator	GTTATGCTAGTTATTGCTCA	Kolonie-PCR, Sequenzierung
fdg3pN	TTATTATTCGCAATTCCTTT	Kolonie-PCR, Sequenzierung
fdsseq	AGCCGCCGCCAGCGTTAACC	Kolonie-PCR, Sequenzierung
fdlseq	CAAGGCCAATCGTCTGACC	Kolonie-PCR, Sequenzierung
fdsp16	GCATTTTCGGTCATAGC	Kolonie-PCR, Sequenzierung
fdvg3pa	GGTTGTTGCCTTCGTAGTGG	Kolonie-PCR, Sequenzierung
g3pNNdea	GGAATTCATATGGCTGAAACTGTTGAA AGTTG	Klonierung G3P*, <i>NdeI</i> -Schnittstelle
g3pCHisb	CGGGATCCTTAATGATGATGATGATGAT GCCCCGACGGAGCATTGACAGGAGG	Klonierung G3P*, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
g3pN1ssNa	GGAATTCATATGAAAAAATTATTATTC GCAATTCC	Klonierung G3P*, <i>NdeI</i> -Schnittstelle
BEg3pΔβ6a	ATC AAC CCT CTC GAC GGC ACT TAT CCG	<i>BluntEnd</i> , Deletion Falt- blattstrang Δβ6 in G3P*
BEg3pΔβ6b	TGT ATC ACC GTA CTC AGG AGG TTT AGT	<i>BluntEnd</i> , Deletion Falt- blattstrang Δβ6 in G3P*
Mega_G3P_D 24C(+)	TGC AAA ACT TTA GAT TGG TAC GCT AAC TAT	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion G3P*-Clamp
Mega_G3P_D 24C(-)	GTC TTT CCA GAC GTT AGT AAA TGA ACC	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion G3P*-Clamp
Mega_G3P_G1 53C(+)	TGC ACT GTT ACT CAA GGC ACT GAC C	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion G3P*-Clamp
Mega_G3P_G1 53C(-)	CGT ATA AAC AGT TAA TGC CCC CTG	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion G3P*-Clamp
If_N1_Sfi(+)	G GGCCCAGCCGGCC GCA ACT ACA GAC GCT GAA TGT	Kolonie-PCR, Klonierung von N1 IF1 G3P* in fd, <i>Sfi</i> - Schnittstelle
If_N1_KpnI(-)	CGG GGT ACC CTA GCC AGA GCC ATC AGC	Kolonie-PCR, Klonierung von N1 IF1 G3P* in fd, <i>KpnI</i> -Schnittstelle
If_N2_Sfi(+)	G GGCCCAGCCGGCC AAT TCT ACG CCA GAT ACA	Kolonie-PCR, Klonierung von N2 IF1 G3P* in fd, <i>Sfi</i> - Schnittstelle
If_N2_KpnI(-)	CGG GGT ACC CTA CCC GTT GCT ACC CTG ATA	Kolonie-PCR, Klonierung von N2 IF1 G3P* in fd, <i>KpnI</i> -Schnittstelle
BE Delta N1(+)	GGT GGC GGT ACT AAA CCT CCT	<i>BluntEnd</i> , Deletion von N1 in G3P* in fd, KPCR
BE Delta N1(-)	AGC GGA GTG AGA ATA GAA AGG	<i>BluntEnd</i> , Deletion von N1 in G3P* in fd
g3p_124S125L_ BEb	GGATTAGGATTAGCGGGGTTTTGC	KPCR
Fd_delta_N2(-)	GCC ACC ACC CTC ATT TTC AGG	<i>BluntEnd</i> , Deletion von N2 in G3P* in fd

Fd_delta_N2(+)	TCC GGG GCC CAG CCG GCC	<i>Blunt End</i> , Deletion von N2 in G3P* in fd
IF1_G3P_His ₆ NdeI (+)	G GAA TTC CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GCA ACT ACA GAC GCT GAA TGT TTA	Kolonie-PCR, Klonierung von IF1 G3P* in pET11a, <i>NdeI</i> -Schnittstelle, His ₆ -tag
IF1_G3P_NdeI (+)	G GAA TTC CAT ATG GCA ACT ACA GAC GCT GAA TGT TTA	Kolonie-PCR, Klonierung von IF1 G3P* in pET11a, <i>NdeI</i> -Schnittstelle
IF1_G3P_As 81BamHI (-)	CGG GAT CC TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG GCC AGA GCC ATC AGC AGC	Kolonie-PCR, Klonierung von IF1 N1 in pET11a, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
IF1_G3P_As 100NdeI (+)	G GAA TTC CAT ATG AAT TCT ACG CCA GAT ACA GTA ACA	Kolonie-PCR, Klonierung von IF1 N2 in pET11a, <i>NdeI</i> -Schnittstelle
IF1_G3P_As 280His ₆ BamHI (-)	CGG GAT CC TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG CCC GTT GCT ACC CTG ATA ATT	Kolonie-PCR, Klonierung von IF1 G3P* in pET11a, <i>BamHI</i> -Schnittstelle, His ₆ -tag
IF1_G3P_As28 0BamHI (-)	CGG GAT CC TCA CCC GTT GCT ACC CTG ATA ATT	Kolonie-PCR, Klonierung von IF1 G3P* in pET11a, <i>BamHI</i> -Schnittstelle,

Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung und Mutation weiterer Proteine

IF- BsaI a	AT GGT CTCT TGGT ATG GTG CCG TCA CCG GAC CTG ATT CAG	Klonierung SlpA, <i>BsaI</i> -Schnittstelle
IF- BamHI_b	CG GGA TCC TTA CTC CAA GGT CTG CCC GGC CAG	Klonierung SlpA, <i>BsaI</i> -Schnittstelle
IF_S3/D5C(+)	TTC TCC CGC CGT GAA TTT ATG G	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion von Disulfidbrücken in IF SlpA
IF_S3C(-)	GTA CTG AAT CAG GTC CGG GCA CGG CAC	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion von Disulfidbrücken in IF SlpA
IF_Y9C(-)	GCA CTG AAT CAG GTC CGG TGA CGG	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion von Disulfidbrücken in IF SlpA
IF_T50/N54C(-)	AAT GGA GTC GCC GTT AAT TTC	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion von Disulfidbrücken in IF SlpA
IF_N54C(+)	ACC GTT GAT TTC TGC CAT CCG CTG GCC	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion von Disulfidbrücken in IF SlpA
IF_T50C(+)	TGC GTT GAT TTC AAC CAT CCG	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion von Disulfidbrücken in IF SlpA
IF_I26C_V40C (+)	GAT GGC AGT GAG ATG CCT GGC TGC ATC CGC GAA	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion von Disulfidbrücken in IF SlpA
IF_I26C_V40C (-)a	CAT TGC GGT AAA AAG CAT GCA TGC GCC AAT	<i>BluntEnd</i> , Konstruktion von Disulfidbrücken in IF SlpA
IF-SlyD_ BsaI_a	AT GGT CTCT TGGT CAG TAC GAC GAA AAC CTG GTG CAA CGT	Kolonie-PCR, Klonierung IF Domäne von SlyD, <i>BsaI</i> -Schnittstelle
IF_SlyD- BsaI_D3C_a	AT GGT CTCT TGGT CAG TAC TGC GAA AAC CTG GTG CAA CGT	Kolonie-PCR, Klonierung IF Domäne von SlyD, <i>BsaI</i> -Schnittstelle, Mutation D3C
IF- SlyD_ N53C_BamHI_b	CG GGA TCC TTA TTC CAG GTT CTG ACC GGC CAG CAT GTG GCA ACC ATC AAC CAC	Kolonie-PCR, Klonierung IF Domäne von SlyD, <i>BamHI</i> -Schnittstelle, Mutation N53C
IF- SlyD_ BamHI_b	CG GGA TCC TTA TTC CAG GTT CTG ACC GGC	Kolonie-PCR, Klonierung IF Domäne von SlyD, <i>BamHI</i> -Schnittstelle

PDI_NdeI_His6_N(+)	G GAA TTC CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GCA GCG CAA CAA GAG GCT GTG GCC CCT	Kolonie-PCR, Klonierung yPDI, <i>NdeI</i> -Schnittstelle, N- terminaler His ₆ -tag
PDI_NdeI_N(+)	G GAA TTC CAT ATG CAA CAA GAG GCT GTG GCC CCT	Kolonie-PCR, Klonierung yPDI, <i>NdeI</i> -Schnittstelle,
yPDI_G451_NdeI_His ₆	G GAA TTC CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GCA GCG GGTG AAA TCG ACG GTT CCG TT	Kolonie-PCR, Klonierung yPDI, BamHI-Schnittstelle, C-terminaler His ₆ -tag
PDI_BamHI_C (-)	CG GGA TCC TTA CAA TTC ATC GTG AAT GGC ATC	Kolonie-PCR, Klonierung yPDI, <i>BamHI</i> -Schnittstelle
Sumo_Dsb-C_Bsa(+)	AT GGT CTCT TGGT GCT GAT GAC GCG GCA ATT CAA	Kolonie-PCR, Klonierung <i>E.c.</i> DsbC, <i>BsaI</i> -Schnittstelle
Sumo_Dsb-A_Bsa(+)	AT GGT CTCT TGGT GCG CAG TAT GAA GAT GGT AAA CA	Kolonie-PCR, Klonierung <i>E.c.</i> DsbC, <i>BsaI</i> -Schnittstelle
Sumo_Dsb-C_BamHI(-)	CG GGA TCC TTA TTT ACC GCT GGT CAT TTT TTG GTG TTC G	Kolonie-PCR, Klonierung <i>E.c.</i> DsbC, <i>BamHI</i> - Schnittstelle
Sumo_Dsb-A_BamHI(-)	CG GGA TCC TTA TTT TTT CTC GGA CAG ATA TTT CAC	Kolonie-PCR, Klonierung <i>E.c.</i> DsbC, <i>BamHI</i> - Schnittstelle
Mia40_BsaI(+)	AT GGT CTCT TGGT GGT GAG ATA AAT TGG GAC TGT C	Kolonie-PCR, Klonierung yMia40 (inkl. C-term. Extension), <i>BsaI</i> - Schnittstelle
Mia40_BamHI (-)	CG GGA TCC TTA AGG TTT GGA TTC CTC ATT CAA	Kolonie-PCR, Klonierung yMia40 (inkl. C-term. Extension), <i>BamHI</i> - Schnittstelle
Mia_BamHI _{labAs353}	CG GGA TCC TTA TAG TTG TTC TGC ATA ATG CT	Kolonie-PCR, Klonierung yMia40 bis As353, <i>BamHI</i> - Schnittstelle
Mia40nheI_N-His	GAA TTC GCTAGC ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GCA GCG GGT GAG ATA AAT TGG GAC TGT C	Kolonie-PCR, Klonierung Mia40, N-term His ₆ -tag, <i>NheI</i> -Schnittstelle
DsbC_BamHI(-)	CG GGA TCC TTA TTT ACC GCT GGT CAT TTT TTG	Kolonie-PCR, Klonierung <i>E.c.</i> DsbC, <i>BamHI</i> - Schnittstelle
DsbC_NdeI_His6(+)	G GAA TTC CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GCA GCG GCT GAT GAC GCG GCA ATT	Kolonie-PCR, Klonierung <i>E.c.</i> DsbC, <i>NdeI</i> - Schnittstelle, N-term. His ₆ - tag
DsbC-(GGSE) (-)	GCC GGT ACC CTC AGA CCC GCC ACC CTC AGA GCC CCC ACC TTT ACC GCT GGT CAT TTT TTG	Kolonie-PCR, Konstruktion Einkettenkonstrukt DsbC, Schnittstelle <i>KpnI</i>
DsbC-(GGSE) ₂₀ (+)	CGG GGT ACC GGT GGC GGG TCT GAG GGG GGT GGC GCT GAT GAC GCG GCA ATT	Kolonie-PCR, Konstruktion Einkettenkonstrukt DsbC (Linker 20 AS), Schnittstelle <i>KpnI</i>
DsbC-(GGSE) ₁₇ (+)	CGG GGT ACC GGT GGC GGG TCT GCG GCT GAT GAC GCG GCA ATT	Kolonie-PCR, Konstruktion Einkettenkonstrukt DsbC, Linker 18 AS), Schnittstelle <i>KpnI</i>

DsbC-(GGSE) ₁₄ (+)	CGG GGT ACC GGT GGC GCT GAT GAC GCG GCA ATT	Kolonie-PCR, Konstruktion Einkettenkonstrukt DsbC (Linker 14 AS), Schnittstelle <i>KpnI</i>
DsbC_C120_123A(+)	GCC GGT TAC GCG CAC AAA CTG CAT GAG CAA ATG	<i>BluntEnd</i> , Mutation C120A, C123A
DsbC_CzuA(-)	GGT AAT ATC AGT AAA CAC GGT GA	<i>BluntEnd</i> , Mutation C120A, C123A

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2006 bis Juni 2010 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Franz X. Schmid angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die gewährte Freiheit bei der Projektauswahl bedanken, wodurch er mir eine abwechslungs- und vor allem lehrreiche Doktorarbeitszeit ermöglichte.

Vielen Dank an meine Laborkolleginnen und -kollegen Barbara Eckert, Anne-Juliane Geitner, Roman Jakob, Insa Kather, Johanna Koch, Stephanie Thoms, Michael Wunderlich und Gabriel Zoldak für ihren fachlichen Rat, ihre Hilfsbereitschaft und die meist angenehme Zeit im Labor. Ein besonderer Dank gilt Martin Pfeiffer, Kerstin Rink, Edina Varga und Bettina Zierer für ihre Mitarbeit im Rahmen ihrer Mitarbeiterpraktika, Bachelor-, Master-, und Diplomarbeiten.

Mein herzlicher Dank gilt Anne-Juliane Geitner, Johanna Koch und Stephanie Thoms für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Roman Jakob, Christian Löw, Uli Weininger und Gabriel Zoldak für die vielen Ratschläge und Diskussionen, bei denen ich viel gelacht und noch mehr gelernt habe.

Vielen Dank auch an Prof. Holger Dobbek und sein gesamtes Team, insbesondere Stefan Knauer, die es mir ermöglichten Erfahrungen in der Kristallographie zu sammeln. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. J. Balbach und Uli Weininger für die reibungslose Zusammenarbeit, sowie bei Dr. Tobias Aumüller für die Bereitstellung der markierten Oligonukleotide.

Und nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Danke, dass ihr an mich glaubt und mich immer unterstützt.

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. Juni 2010

Stefan Lorenz