

Kombination von Substratanreicherung und Katalyse als generelles Prinzip von Faltungshelferenzymen

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin
Anne-Juliane Geitner
aus Lutherstadt Wittenberg

Bayreuth 2012

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

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

Promotionsgesuch eingereicht am: 11. April 2012

Zulassung durch die Prüfungskommission: 18. April 2012

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 15. Juni 2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Beate Lohnert

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Franz X. Schmid (Erstgutachter)

Prof. Dr. Thomas Scheibel (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Carlo Unverzagt (Vorsitzender)

Prof. Dr. Olaf Stemmann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 HIV und die Bedeutung von Chaperonen in der HIV-Diagnostik	1
1.2 Das Faltungsproblem: Theorie und Realität	2
1.3 Molekulare Chaperone	3
1.4 Thioldisulfidoxidoreduktasen	5
1.5 Peptidylprolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	6
1.5.1 Die Isomerisierung der Peptidylprolylbindung als limitierender Schritt der Proteinfaltung	6
1.5.2 Peptidylprolylisomerasen sind vielfältig in Struktur, Funktionalität und Spezifität	8
1.5.3 Verbesserung der Faltungshelferfunktion von hFKBP12 durch Insertion der verwandten IF-Domäne von SlyD	10
1.5 Problemstellung der Arbeit	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide	13
2.1.2 Nährmedien	13
2.1.3 Enzyme, Peptide und Proteine	14
2.1.4 Oligodesoxyribonukleotide	14
2.1.5 Chemikalien	14
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.7 Geräte	15
2.1.8 Computerprogramme	16
2.2 Methoden	16
2.2.1 Gelelektrophoretische Methoden	16
2.2.1.1 Agarose Gelelektrophorese	16
2.2.1.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	17
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.2.2.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	17
2.2.2.2 Einführung von Mutationen durch <i>blunt-end</i> Mutagenese	18
2.2.2.3 Erzeugung von Genfragmenten und Einführung von Mutationen durch <i>overlap extension</i> PCR	18
2.2.2.4 Kolonie-PCR	19
2.2.3 Isolierung und Reinigung von DNA	19
2.2.3.1 Elution von DNA aus Agarose-Gelen	19
2.2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA	20
2.2.4 Klonierung verschiedener Proteinvarianten	20
2.2.4.1 Restriktion des Vektors und der Genfragmente	20
2.2.4.2 Ligation	20
2.2.5 Herstellung und Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.2.5.1 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.2.5.3 Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.2.6 Experimente zur Komplementation von <i>E. coli</i> Δ <i>surA</i> Δ <i>skp</i> Doppeldeletionsmutanten	21
2.2.7 Fermentation und Reinigung der Protein-Varianten	22
2.2.7.1 Test auf Überexpression eines Proteins	22
2.2.7.2 Fermentation der Proteinvarianten	22
2.2.7.3 Reinigung mittels Affinitäts- und Gelpermeationschromatographie	23
2.2.7.4 Reinigung mittels Anionenaustausch- und Gelpermeationschromatographie	24

2.2.7.5	Reinigung mit Hilfe der Sumo-Fusionstechnologie	24
2.2.7.6	Reinigung mittels Periplasmaaufschluss und Anionenaustauschchromatographie	26
2.2.8	Modifikation von Proteinen	27
2.2.8.1	Reduktion und Carboxymethylierung von RNaseT1	27
2.2.8.2	Markierung der RNaseT1 _{Cys} mit IAEDANS	27
2.2.9	Spektroskopische Charakterisierung	27
2.2.9.1	Probenvorbereitung und Konzentrationsbestimmung	27
2.2.9.2	Circulardichroismusspektren	28
2.2.9.3	Fluoreszenzspektren	29
2.2.10	Bestimmung der konformationellen Stabilität	29
2.2.10.1	Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge	29
2.2.10.2	Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge	32
2.2.11	Experimente zur Kinetik der Proteinfaltung	34
2.2.12	Energietransfer auf RNaseT1 _{Cys} -AEDANS und Kinetik der Assoziation	36
2.2.12.1	Gleichgewichtstitrationen	36
2.2.12.2	Kinetik der Assoziation mit RNaseT1 _{Cys} -AEDANS	37
2.2.13	Katalyse der prolinlimitierten Proteinfaltung	37
2.2.13.1	Messung der katalysierten Rückfaltung von RCM-T1 durch Prolylisomerasen	37
2.2.13.2	Messung der katalysierten Rückfaltung von N2 durch Prolylisomerasen	39
2.2.13.3	Michaelis-Menten-Kinetik der katalysierten Faltung von RCM-T1	39
2.2.14	Katalyse der Prolylisomerisierung in kurzen Peptiden	40
2.2.15	Untersuchung der Chaperonaktivität von Prolylisomerasen	41
3	Ergebnisse und Diskussion	43
3.1	Die Prolylisomerase SlpA	43
3.1.1	Die Ursache der geringen Aktivität von SlpA liegt nicht in der Tertiärstruktur begründet	43
3.1.2	Gute Chaperoneigenschaften und geringe Isomeraseaktivität sind hochkonserviert in allen SlpA-Proteinen	45
3.1.3	Die IF-Domäne stabilisiert die FKBP-Domäne und ist auch in isolierter Form vollständig gefaltet	53
3.1.4	Die Domänen von <i>E. coli</i> SlpA stabilisieren sich gegenseitig	56
3.1.5	Die Bindung von SlpA an RNaseT1 ist sehr dynamisch und vergleichbar mit SlyD	65
3.1.6	Die IF-Domäne aus SlpA stabilisiert auch die FKBP-Domäne von SlyD	72
3.1.7	Die Chimäre aus SlpA und SlyD ist ein effektiver Faltungshelfer	76
3.2	Konstruktion artifizierender Faltungshelfer durch Kombination aus der PPIase hFKBP12 und nicht-verwandten Chaperondomänen	79
3.2.1	Die apikale Domäne von GroEL als Chaperondomäne	80
3.2.2	Die Länge des Linkers zwischen den Domänen der GroEL-Chimäre ist kritisch für Stabilität und Aktivität	81
3.2.3	Das Einführen einer Disulfidbrücke lässt Stabilität und Aktivität unbeeinflusst	88
3.2.4	Die b'-Domäne von PDI aus <i>S. cerevisiae</i> als Chaperondomäne	89
3.2.5	Die Chaperondomäne von SurA als Bindungsdomäne	94
3.2.6	Die kovalente Verknüpfung von Prolylisomerase und Chaperondomäne ist für die Faltungshelferaktivität essentiell	98
3.2.7	Für Proteinsubstrate mit negativ geladenen Resten vor Prolin zeigen die Chimären eine enorme Steigerung der Faltungsaktivität	99
3.2.8	Die Anwesenheit einer Chaperondomäne setzt die Substratspezifität des aktiven Zentrums der Prolylisomerase herab	102

3.2.9 Die Substratbindung der chimären Faltungshelfer ist hochdynamisch	105
3.3 Insertion einer Chaperondomäne in die Parvulindomänen der Prolylisomerase	
SurA.....	111
3.3.1 Konstruktion der chimären Parvuline	112
3.3.2 Die Insertion der IF-Domäne destabilisiert die Parvulin-Domänen	114
3.3.3 Eine aktive Prolylisomerasedomäne ist essentiell für ein effizientes Faltungsenzym	116
3.3.3 Die Parvulin-Chimären sind in der Lage entfaltete Proteinsubstrate zu binden und besitzen <i>in vitro</i> Chaperonaktivität	118
3.3.4 Die IF-Domäne kann die <i>in vivo</i> -Funktion der SurA-Chaperondomäne nicht komplementieren.....	120
4 Zusammenfassende Diskussion.....	123
4.1 SlpA - ineffiziente Prolylisomerase aber effizientes Chaperon	123
4.1.1 Hohe Chaperonaktivität und niedrige Prolylisomeraseaktivität sind konserviert innerhalb der SlpA-Familie.....	123
4.1.2 Die Bindung von SlpA ist hochaffin und sehr dynamisch - die niedrige Faltungshelferaktivität ist somit in der Prolylisomerasedomäne begründet	124
4.1.2 Aufgrund der unterschiedlichen Stabilitäten ihrer IF-Domänen unterscheiden sich SlyD und SlpA grundlegend in ihren Faltungsmechanismen	125
4.2 Substratanreicherung und Katalyse innerhalb verschiedener Domänen ist ein allgemeines Prinzip von Faltungshelferenzymen.....	126
4.2.1 Domäneninsertionen sind kritisch für Stabilität und Aktivität der Wirtsdomäne	126
4.2.2 Die Stabilität der Wirtsdomäne kann durch Optimierung des Linkersbereiches und durch kovalente Verknüpfung durch Disulfidbrücken verbessert werden.....	127
4.2.3 Durch die kovalente Verknüpfung von PPIase und Chaperondomäne kann die Faltungshelferfunktion der PPIase enorm gesteigert werden	128
4.2.4 Die Erniedrigung der Substratspezifität durch Anwesenheit einer Chaperondomäne ist ein generischer Effekt	129
4.2.5 Eine hohe Affinität und Dynamik der Bindung sind essentiell für effiziente Faltungshelferenzyme	130
5 Publikationsliste	133
6 Zusammenfassung	135
7 Summary.....	137
8 Abkürzungsverzeichnis	139
9 Literaturverzeichnis	143
10 Anhang	151

1 Einleitung

1.1 HIV und die Bedeutung von Chaperonen in der HIV-Diagnostik

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) ist die Ursache für das „erworbene Immunschwächesyndrom“ (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS), einer derzeit noch unheilbaren Immunschwächekrankheit. Das zur Familie der Retroviren gehörende HI-Virus wurde erstmals 1983 isoliert und als verantwortlicher Faktor für AIDS-Erkrankungen identifiziert (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). In Deutschland liegt die geschätzte Zahl der Personen, die Ende 2011 mit HIV infiziert bzw. an AIDS erkrankt waren, bei ca. 73 000 (Robert Koch-Institut, 2011). Weltweit sind etwa 34 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert, wobei bisher 25 Millionen Menschen ihr Leben verloren haben (UNAIDS, 2010). Diese Zahlen zeigen, dass trotz des großen medizinischen Fortschritts der letzten Jahre immer noch kein Heilmittel gegen HIV gefunden werden konnte. Um Fortschritte in der Behandlung und insbesondere auch in der Diagnostik von HIV erzielen zu können, ist es wichtig, die molekulare Grundlage der HIV-Infektion zu verstehen.

Das HI-Virus bindet an Wirtszellen, die den notwendigen Rezeptor CD4 besitzen (Dalglish *et al.*, 1984), dies sind insbesondere Zellen, die an der Immunantwort beteiligt sind, beispielsweise T-Helferzellen. Sowohl das Anheften an die Zelloberfläche als auch die anschließende Fusion mit der Zellmembran, wodurch das Eindringen des Virus in die Wirtszelle ermöglicht wird, werden durch Glykoproteine auf der Virusoberfläche vermittelt. Bei HIV-1 (Subtyp des HI-Virus) besteht dieses Oberflächenglycoprotein aus zwei nicht kovalent-assoziierten Untereinheiten, der gp120- und der gp41-Untereinheit. Die Infektion der Wirtszelle wird durch die Interaktion von gp120 mit dem Oberflächenrezeptor CD4 (Maddon *et al.*, 1986; McDougal *et al.*, 1986) und weiteren chemokinen Corezeptoren (Alkhatib *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996) vermittelt. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch gp41 exponiert wird. gp41 kann dann über ein N-terminales Fusionspeptid mit der Zelle wechselwirken und damit die Membranfusion von Virus und Wirtszelle ermöglichen (Gallagher, 1987; Bosch *et al.*, 1989).

Die Grundlage der Diagnostik von HIV-Infektionen ist der Nachweis von Antikörpern, die bei einer HIV-Infektion gegen solche viralen Strukturproteine gebildet werden. Dabei werden virale Antigene aus infizierten Zellkulturen genutzt, um indirekt mittels Immunoblots und ELISA die Antikörper nachzuweisen. Um diagnostisch relevante Antigene wie gp41 nicht aus infektiösem Zellmaterial reinigen zu müssen, werden diese durch prokaryontische Expression gewonnen. Für die Nutzung in Immunoblots müssen die Antigene zusätzlich modifiziert werden, um an Trägermaterialien gekoppelt werden zu können. Demzufolge müssen sie bei den für die Modifikation notwendigen Bedingungen in löslicher Form vorliegen. Aufgrund der konformationellen Flexibilität, der hohen Hydrophobizität und der geringen Löslichkeit von gp41 ist seine rekombinante Produktion und anschließende Modifikation äußerst schwierig.

Lösliche und in ihrer reaktiven Struktur vorliegende immundominante virale Antigene sind ein wichtiges Instrument sowohl in der HIV-Diagnostik als auch in der Impfstoffentwicklung. Um die Löslichkeit solcher Antigene zu erhöhen und ihre Verwendung in der Diagnostik zu ermöglichen, werden unter anderem Fusionsproteine hergestellt, bei denen Teile der Antigene mit molekularen Chaperonen (frz. Anstandsdame) kovalent verknüpft sind (Scholz *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2006). Chaperone schützen andere Proteine vor Aggregation, fehlerhafter Assoziation und erhöhen ihre Löslichkeit. Durch die Fusion von Antigenen und Chaperonen konnte die Löslichkeit der Virusoberflächenproteine erhöht und somit die Verwendung für immundiagnostische Tests verbessert werden. Die Anwesenheit der Chaperone als Faltungshelfer und Aggregations-Hemmer ist sowohl in der Immundiagnostik (Scholz *et al.*, 2008) als auch bei der Proteinfaltung in der Zelle (Hartl *et al.*, 2011) von enormer Bedeutung.

1.2 Das Faltungsproblem: Theorie und Realität

Für die biologische Funktion von Proteinen ist ihre dreidimensionale Struktur entscheidend. Der Begriff Proteinfaltung beschreibt den Prozess der Bildung dieser nativen Struktur, wobei die notwendige Information dafür allein in der Aminosäuresequenz festgelegt ist (Anfinsen, 1973). Dieser Prozess läuft bei vielen kleinen Proteinen innerhalb von wenigen Millisekunden ab. Unter der Voraussetzung, dass bei der Faltung eines mit 70 AS vergleichsweise kleinen Proteins jede AS nur zwei Zustände einnehmen kann und für jede Konformationsänderung 10^{-13} s benötigt werden, so würde der Prozess der Faltung $2^{70} \cdot 10^{-13}$ s also zwischen drei und vier Jahre dauern. Dieser scheinbare Widerspruch zwischen der theoretisch nötigen Zeitspanne bei einem statistischen Absuchen der möglichen Konformationen nach der richtigen, nativen Struktur und der Geschwindigkeit mit der die Proteinfaltung tatsächlich stattfindet, wird als Levinthal-Paradoxon bezeichnet (Levinthal, 1968). Proteinfaltung kann demzufolge kein Zufallsprozess sein!

Wie ist es also möglich, dass die Faltung vieler Proteine innerhalb von Millisekunden abläuft? Im Gegensatz zur Annahme von Levinthal wird heute davon ausgegangen, dass es nicht nur eine Konformation des denaturierten Zustands sondern viele Konformationen gibt. Dabei entsprechen die möglichen Konformationen lokalen energetischen Minima, die in ihrer Gesamtheit annähernd durch eine Energiehyperfläche beschrieben werden können (Dill & Chan, 1996; Wolynes, 1997). Um die native Struktur, die den niedrigsten energetischen Zustand der Hyperfläche darstellt, zu erreichen, müssen zahlreiche Energiebarrieren überwunden werden, die intermediäre nativähnliche Faltungszustände widerspiegeln. *In vitro* und besonders *in vivo* kann es dazu kommen, dass bei langsamen Schritten der Faltung solche Intermediate akkumulieren. Durch die hohen Konzentrationen an Makromolekülen innerhalb der Zelle wird die Aggregation von Proteinen begünstigt (Ellis & Minton, 2003). Zudem sind in der Zelle viele unstrukturierte oder teilgefaltete naszierende Polypeptidketten vorhanden, die während der Biosynthese am Ribosom, aufgrund der zum Cytosol exponierten Bereiche, sehr aggregationsanfällig sind (Agashe & Hartl, 2000; Feldman & Frydman, 2000). Aggregation kann zur Bildung von ungeordneten (amorphen) oder geordneten Aggregaten

(Fibrillen) führen, die sich zu Amyloidstrukturen zusammenlagern können. Solche fehlgefalteten zytotoxischen Proteine sind Ursache zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Chorea Huntington (Muchowski, 2002; Cohen & Kelly, 2003; Dobson, 2004; Chiti & Dobson, 2006). Daher ist es notwendig, die Lebensdauer aggregationssensitiver Intermediate zu verkürzen und die Konzentration an teil- oder fehlgefalteten Proteinen herabzusetzen. Um dies zu realisieren, haben sich im Laufe der Evolution sogenannte Faltungshelferproteine entwickelt. Zu den Faltungshelfern gehören neben den Proteindisulfidisomerasen (Freedman *et al.*, 1994; Gruber *et al.*, 2006) und den Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen (Schmid, 2002; Fanghänel & Fischer, 2004), die langsame Schritte in der Proteinfaltung katalysieren, die molekularen Chaperone.

1.3 Molekulare Chaperone

Chaperone wurden ursprünglich definiert als eine heterogene Klasse von Proteinen, die die korrekte Assemblierung anderer Proteine begünstigen, selbst jedoch nicht Teil des finalen nativen Zustands sind (Ellis & van der Vies, 1991). Durch reversible Bindung an hydrophobe, entfaltete bzw. teilgefaltete Proteine, setzen sie die Konzentration an aggregationssensitiven Oberflächen herab (Landry & Gierasch, 1994; Buchner, 1996) und minimieren damit die für die Zelle gefährliche Aggregation fehlgefalteter Proteine. Es existieren zahlreiche Klassen von Chaperonen, die komplexe Signalwege und Netzwerke bilden. Die wohl bekannteste Gruppe ist die Klasse der Hitzeschockproteine (Hsp), deren Expression unter Stressbedingungen (Hitze, oxidativer oder chemischer Stress) hochreguliert wird. Desweiteren sind Chaperone beteiligt an der *de novo* Faltung naszierender Polypeptidketten (Ferbitz *et al.*, 2004), am Aufbau von Proteinkomplexen (Cheng *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1990), am intrazellulären Proteintransport (Sanders *et al.*, 1992), an der Proteinqualitätskontrolle und an proteolytischen Abbauprozessen (Wickner *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2011). Zu den wichtigsten Chaperonfamilien gehören die Hsp70-Chaperone und die Chaperonine (Hsp60), wobei der GroEL/ES-Komplex der wahrscheinlich bekannteste Vertreter der Hsp60-Chaperone ist (Abbildung 1-1a).

GroEL ist ein ca. 800-900 kDa großer Proteinkomplex, der aus 14 identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Die Untereinheiten bilden zwei heptamere Ringe, die jeweils zylinderförmig angeordnet sind. Ein Monomer ist aus drei Domänen aufgebaut: der äquatorialen Domäne, in der die ATP-Bindungsstelle lokalisiert ist, der apikalen Domäne und der intermediären Domäne, die beide miteinander verbindet (Braig *et al.*, 1994). Die apikale Domäne ist für die Substratbindung verantwortlich und bildet durch ihre hydrophobe Oberfläche den zentralen Hohlraum des Chaperonins. Dies ermöglicht die Faltung der entfalteten oder partiell gefalteten Proteine in einem vom Cytosol abgetrennten Reaktionsraum („Anfinsen-Käfig“ (Ellis, 1994)). Den „Deckel“ der zylinderförmigen Struktur bildet das Cochaperon GroES, das ebenfalls einen heptameren Ring bildet und über die apikalen Domänen mit GroEL wechselwirkt. Die Bindung an entfaltete Substrate induziert die ATP-Bindung und die

Wechselwirkung mit GroES. Dadurch kommt es zu strukturellen Umlagerungen, wodurch die hydrophobe Oberfläche im zentralen Hohlraum zu einer hydrophilen Oberfläche wird, was zu einem Schließen des Hohlräum führt (Xu *et al.*, 1997). Das Substratprotein faltet im Inneren des „Käfigs“ und wird nach ATP-Hydrolyse zusammen mit GroES wieder entlassen (Weissman *et al.*, 1996).

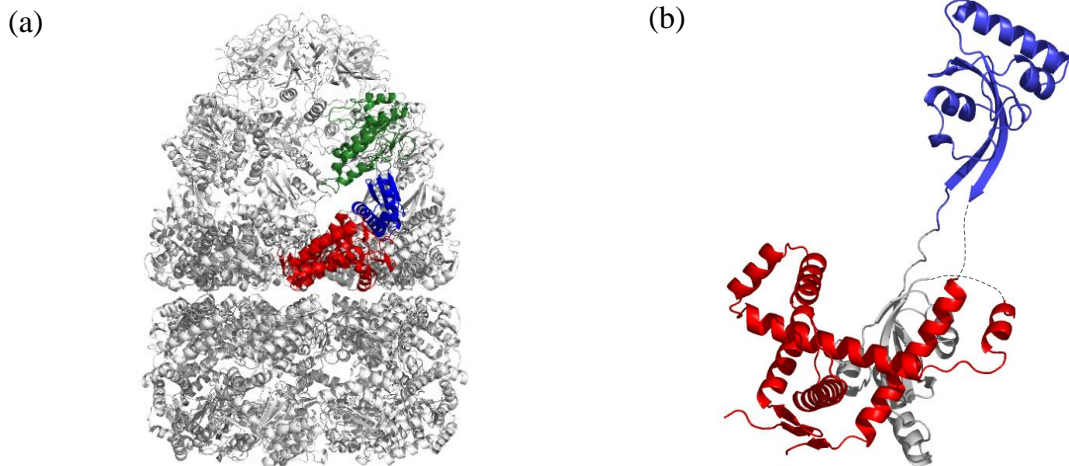


Abbildung 1-1: Tertiärstruktur (a) des GroEL/ES-Proteinkomplexes und (b) von SurA aus *E. coli*. Ein GroEL-Monomer ist farbig dargestellt: die äquatoriale Domäne ist in rot, die intermediäre Domäne in blau und die apikale Domäne in grün gezeigt. Die Chaperondomäne von SurA ist in rot dargestellt, die Parvulindomäne 1 in grau und die Parvulindomäne 2 in blau. In der Struktur nicht aufgelöste Polypeptidverbindungen sind als unterbrochene Linien gezeigt. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Pymol (DeLano, 2003) unter Verwendung der pdb-Einträge 1AON (GroEL, Xu *et al.*, 1997) bzw. 1M5Y (SurA, Bitto & McKay, 2002) erstellt.

Die molekularen Mechanismen der ATP-getriebenen Chaperonkomplexe des bakteriellen Cytoplasmas sind inzwischen gut verstanden. Allerdings existieren im Cytoplasma noch zahlreiche andere Chaperone, von denen viele in der Lage sind, ihre Faltungsaktivität auch ohne Umsatz von Energieäquivalenten auszuüben. In anderen Zellkompartimenten, wie z. B. dem Periplasma, ist eine energieunabhängige Faltungshelferaktivität sogar essentiell. Aufgrund der Bedingungen im Periplasma (Fehlen von Energieäquivalenten, oxidierende Bedingungen, stetiger Austausch mit dem äußeren Medium) werden an die Chaperone des Periplasmas besondere Ansprüche gestellt (Wülfing & Plückthun, 1994). Ein bekannter Vertreter der periplasmatischen Chaperone ist das *survival protein A* (SurA) aus *E. coli*. SurA wurde ursprünglich als wichtiger Faktor für das Überleben der *E. coli* Zelle während der stationären Phase entdeckt (Tormo *et al.*, 1990). Der *SurA*⁻ Phenotyp zeigt zahlreiche physiologische Defekte, wie mucoide Kolonien, Sensitivität gegenüber hydrophoben Antibiotika, verschiedenen Salzen und SDS. Zellen die eine Mutation im SurA-Gen tragen, besitzen weniger Porine in der äußeren Membran (OMPs) als Wildtyp-Zellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass SurA an der Faltung und Assemblierung des Membran-Maltose-Transporters LamB beteiligt ist, was zu dem Schluß führte, dass SurA an der Reifung der OMPs beteiligt ist (Lazar & Kolter, 1996; Rouviere & Gross, 1996) und somit als Chaperon

fungiert. Da SurA im Periplasma lokalisiert ist, ist seine Chaperonfunktion, im Gegensatz zu den Haupt-Chaperonen des Cytoplasmas DnaK und GroEL/GroES, unabhängig von ATP. SurA ist aus einer Chaperondomäne und zwei Prolylisomerasedomänen aufgebaut (Bitto & McKay, 2002). Die Prolylisomerasedomänen gehören zur Familie der Parvuline, wobei jedoch nur die Parvulindomäne2 (Par2) PPIase-Aktivität besitzt. Die Chaperondomäne besteht aus der N-terminalen Domäne und einer C-terminalen Helix, wobei insbesondere die Reste 21-133 an der Prolin-unabhängigen Substratbindung beteiligt sind (Webb *et al.*, 2001). Während die Chaperondomäne und die Parvulindomäne1 (Par1) die Haupteinheit des SurA-Proteins bilden, ist Par2 durch zwei lange Polypeptidlinker mit dieser Einheit verbunden. Die Funktion von SurA, bei der Porin-Assemblierung beteiligt zu sein, wurde zuerst Par2 zugeschrieben (Missiakas *et al.*, 1996; Rouviere & Gross, 1996). Es wurde jedoch inzwischen gezeigt, dass nur das Vorhandensein der Chaperondomäne für die *in vivo*-Funktion von SurA essentiell ist (Behrens *et al.*, 2001). Das Beispiel von SurA zeigt, dass viele Faltungshelfer modular aufgebaut sind und ihre Domänen verschiedene Funktionen wahrnehmen.

1.4 Thioldisulfidoxidoreduktasen

Die Ausbildung, Auflösung und Umlagerung von Disulfidbrücken ist einer der langsamen Schritte der Proteinfaltung, welcher durch Thioloxygenasen, -reduktasen oder Proteindisulfidisomerasen katalysiert wird. Dadurch wird die Lebensdauer aggregationsanfälliger zytotoxischer Intermediate verkürzt, die häufig vor langsamen Faltungsprozessen akkumulieren. Da im Cytoplasma das Glutathion-Redoxsystem fehlt und daher reduzierende Bedingungen herrschen, müssen die Polypeptidketten nach der Synthese in gesonderte Kompartimente mit oxidierenden Bedingungen transloziert werden. Der Großteil der bisher bekannten Thioldisulfidoxidoreduktasen gehört zur Thioredoxin-Faltungsfamilie. Das redoxaktive, katalytische Zentrum der Thioredoxindomänen beinhaltet ein Cys-Xaa-Xaa-Cys-Motiv. Aufgrund der strukturellen Umgebung besitzen die katalytischen Cysteine ein höheres Redoxpotential als die Cysteine der entfalteten Substratproteine, wodurch die Oxidation bzw. Isomerisierung der Disulfidbrücken im Substrat ermöglicht wird. Die meisten Thioldisulfidoxidoreduktasen verfügen über zusätzliche Chaperondomänen, die die Wechselwirkung mit den entfalteten Substraten vermitteln. Im Periplasma der Prokaryonten wird die kovalente Verknüpfung der Cysteinreste von der Thioloxygenase DsbA katalysiert. Besitzt das Substrat mehr als zwei Cysteinreste, kann es zur Ausbildung von fehlerhaften Disulfidbrücken kommen. Die Thiolisomerase DsbC ist in der Lage, solche fehlverknüpften Disulfide zu reduzieren und die korrekten Disulfidbrücken einzuführen. Die Funktionen von DsbA und DsbC sind bei Eukaryonten in einem Enzym vereint, der Proteindisulfidisomerase (PDI, Abbildung 1-2).

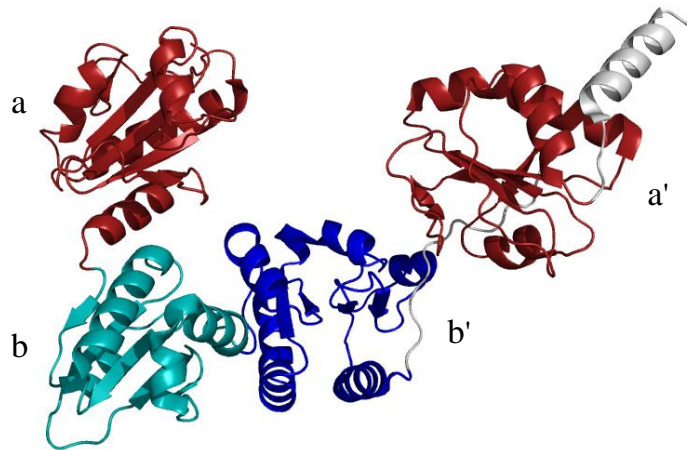


Abbildung 1-2: Tertiärstruktur der Proteindisulfidisomerase aus *Sacharomyces cerevisiae*. Die redoxaktiven Thioredoxin Domänen a und a' sind in rot dargestellt, die b-Domäne in cyan, die b' Domäne in blau, die x-Region zwischen b' und a' sowie die C-terminale Signalsequenz sind in grau dargestellt. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Pymol (DeLano, 2003) unter Verwendung des pdb-Eintrages 2B5E (Tian *et al.*, 2006) erstellt.

Die Proteindisulfidisomerase aus *Sacharomyces cerevisiae* hat zusätzlich zu ihren katalytisch aktiven Thioredoxin-domänen a und a' zwei inaktive Thioredoxin-domänen, die als Bindungsdomänen fungieren. Die Domänen sind hufeisenförmig in der Reihenfolge abb'xa'c angeordnet (Tian *et al.*, 2006), wobei die Chaperondomänen b und b' die Furche des Hufeisens bilden (Abbildung1-2). Zwischen b' und a' existiert eine zusätzliche Schleife, die als x-Region bezeichnet wird (Pirneskoski *et al.*, 2004), im C-terminalen Bereich (c) ist die ER-Erkennungssequenz lokalisiert. Die b-Domäne und insbesondere die b'-Domäne binden entfaltete Substrate (Klappa *et al.*, 1998), die dann innerhalb der katalytischen Zentren a und a' oxidiert, isomerisiert bzw. reduziert werden. Ähnlich wie bei SurA kommt es somit auch bei PDI zu einer räumlichen Trennung der katalytischen Module und der Substratbindungsmodule.

1.5 Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen

1.5.1 Die Isomerisierung der Peptidylprolylbindung als limitierender Schritt der Proteinfaltung

Neben der Bildung von Disulfidbrücken ist die Isomerisierung der Peptidbindung zwischen Prolin und der vorhergehenden Aminosäure ein weiterer geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Proteinfaltung. Die Peptidbindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und dem Stickstoffatom ist mit $0,15 \text{ \AA}$ kürzer als für eine C-N-Bindung erwartet, da die beteiligten Atome sp^2 -hybridisiert vorliegen. Aufgrund des daraus resultierenden partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung zeigt diese eine planare Geometrie. Aufeinanderfolgende C_α -Atome können somit entweder *cis*- oder *trans*-Konformation einnehmen (Diederwinkel ω von 0° oder 180°). Aufgrund der sterischen Hinderungen der beiden C_α -Atome benachbarter Aminosäuren, ist die *trans*-Konformation energetisch

wesentlich günstiger. Nach der Biosynthese am Ribosom liegen daher vermutlich alle Peptidbindungen in der *trans*-Konformation vor. In Oligopeptiden nehmen etwa 0,1 bis 0,5 % der Peptidbindungen die sterisch ungünstige *cis*-Konformation ein (Ramachandran & Mitra, 1976; Scherer *et al.*, 1998). Auch in gefalteten Proteinen sind *cis*-Peptidbindungen sehr selten (Stewart *et al.*, 1990; Macarthur & Thornton, 1991; Jabs *et al.*, 1999; Pal & Chakrabarti, 1999). Eine Ausnahme bildet dabei jedoch die Peptidbindung zwischen Prolin und der entsprechenden Aminosäure vor Prolin (Abbildung 1-3).

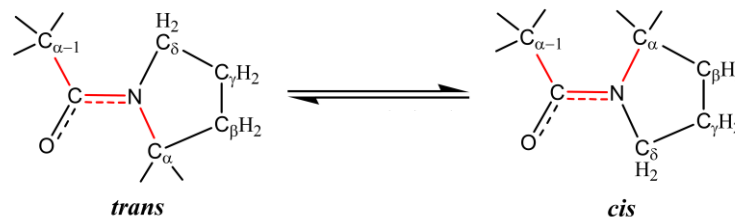


Abbildung 1-3: *cis/trans*-Isomerisierung einer Peptidylprolylbindung. Die Bindungen zwischen den Atomen der aufeinanderfolgenden Aminosäuren Xaa und Prolin, die den Diederwinkel aufspannen, sind in rot dargestellt. Das Gleichgewicht befindet sich zu 70 bis 90 % auf der Seite der *trans*-Konformation, die Aktivierungsenergie der *trans/cis*-Isomerisierung liegt bei 80 kJ mol^{-1} . Die Abbildung wurde der Arbeit Eckert und Schmid (2006) entnommen.

Das C_{α} der Aminosäure Xaa befindet sich aufgrund des Pyrrolidin-Rings des Prolins immer *cis*-ständig zu einem C-Atom (C_{α} oder C_{δ}) des Prolinrestes (Abbildung 1-3). Das *trans*-Isomer der Peptidylprolylbindung ist gegenüber dem *cis*-Isomer demzufolge nur wenig energetisch favorisiert. In Oligopeptiden liegt der Anteil des *cis*-Isomers zwischen 10 und 30 % und ist abhängig von der flankierenden Aminosäure Xaa (Cheng & Bovey, 1977; Grathwohl & Wüthrich, 1981; Reimer *et al.*, 1998). In gefalteten Proteinen nehmen etwa 5 bis 7 % aller Peptidylprolylbindungen die *cis*-Konformation ein (Stewart *et al.*, 1990). Bei einigen Proteinen ist der isomere Zustand der Peptidylprolylbindung nicht eindeutig identifiziert, wodurch die Peptidylprolylbindung in einem *cis/trans*-Isomerisierungsgleichgewicht vorliegt. Beispiele dafür sind die Staphylokokkennuklease (Evans *et al.*, 1987), Calbindin (Chazin *et al.*, 1989) oder die N2-Domäne des Phagen fd (Jakob & Schmid, 2008). Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Prolylbindung ist die Aktivierungsenergie mit 80 kJ mol^{-1} für die Drehung um die Peptidbindung sehr hoch. Folglich ist die Isomerisierung von Peptidylprolylbindungen eine sehr langsame Reaktion mit Zeitkonstanten zwischen 10 und 100 s bei $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Schmid, 2002). Während der Faltung vieler Proteine ist eine solche Prolylisomerisierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und stellt demzufolge einen zentralen Prozess während der Faltung dar. Bei der durch das Gen-3-Protein vermittelten Infektion von *E. coli*-Zellen durch den Phagen fd (Eckert *et al.*, 2005) oder bei der Regulation der Affinität der SH2-Domäne der Tyrosinkinase Itk (Mallis *et al.*, 2002; Andreotti, 2003), fungiert eine Prolylisomerisierung sogar als molekularer Schalter. Faltungsintermediate, die vor solch einem langsamen Prozess akkumulieren, können jedoch für die Zelle toxisch sein.

Peptidylprolylisomerasen (kurz: Prolylisomerasen oder auch PPIasen) verkürzen die Lebensdauer solcher Intermediate, indem sie die Isomerisierung von Peptidylprolylbindungen katalysieren.

1.5.2 Peptidylprolylisomerasen sind vielfältig in Struktur, Funktionalität und Spezifität

Neben den Thioldisulfidoxidoreduktasen sind die Prolylisomerasen die zweite Gruppe von Faltungshelfern, die geschwindigkeitsbestimmende Schritte bei der Proteinfaltung beschleunigen und somit die Lebensdauer aggregationsanfälliger Intermediate herabsetzen. PPIasen sind in allen Organismen vertreten und kommen, wie schon am Beispiel von SurA gezeigt, häufig in Kombination mit Chaperondomänen vor. Die erste PPIase - Cyclophilin A - wurde 1984 aus Schweinenierenextrakt isoliert (Fischer *et al.*, 1984a). 1987 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass prolinlimitierte Faltungsreaktionen von Proteinen durch Prolylisomerasen beschleunigt werden (Lang *et al.*, 1987). PPIasen werden in drei unabhängige Familien unterteilt, die keine Sequenzhomologie zueinander zeigen: die Cyclophiline, die Parvuline und die FK506-Bindungsproteine (FKBP).

Die Cyclophiline sind ubiquitäre Enzyme, die in ihrem Kernbereich hochkonserviert sind und in allen Organismen vorkommen. Cyclophilin ist der intrazelluläre Rezeptor des Immunsuppressivums Cyclosporin A (Fischer *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1989). Den Kernbereich der Cyclophiline bildet ein β -Fass, dessen acht β -Stränge über eine Schleife und drei Helices verbunden sind (Ke, 1992). Die Bindungsstelle für Cyclosporin A und andere Substrate ist in einer hydrophoben Bindungstasche an der Oberfläche der β -Faltblattstränge lokalisiert (Kallen *et al.*, 1991; Kallen & Walkinshaw, 1992; Mikol *et al.*, 1994). Viele Cyclophiline besitzen eine sehr hohe Prolylisomeraseaktivität gegenüber Tetrapeptidsubstraten und zeigen eine geringe Substratspezifität. Zudem sind Cyclophiline in der Lage, prolinlimitierte Faltungsreaktionen in Proteinsubstraten zu beschleunigen (Lang *et al.*, 1987). Die FKBP-Proteine kommen ebenfalls in allen Organismen, sowohl als Eindomänenproteine oder als Teil von Mehrdomänenproteine, vor und sind in zahlreiche physiologische Prozesse involviert (Galat & Metcalfe, 1995; Fischer & Aumüller, 2003). Ihre Prolylisomeraseaktivität wird reversibel durch die Bindung an das Immunsuppressivum FK506 oder an Rapamycin inhibiert (Harding *et al.*, 1989). Analog zu den Cyclophilinen ist die immunsuppressive Wirkung von FK506 auf die Bindung des FK506-FKBP-Komplexes an Calcineurin und die sich daraus ergebende Hemmung der T-Zell-Proliferation zurückzuführen (Schreiber, 1991; Clardy, 1995). Der am besten untersuchte Vertreter dieser Familie ist das aus 107 AS bestehende humane 12 kDa-Protein hFKBP12 (Abbildung 1-4). FKBP-Proteine, und so auch hFKBP12, besitzen eine konservierte Struktur aus fünf β -Faltblattsträngen, zwei kurzen α -Helices und einer großen Schleife, die die Faltblattstränge 5 und 6 verbindet, der sogenannte *flap* (Michnick *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1991; Van Duyne *et al.*, 1993).

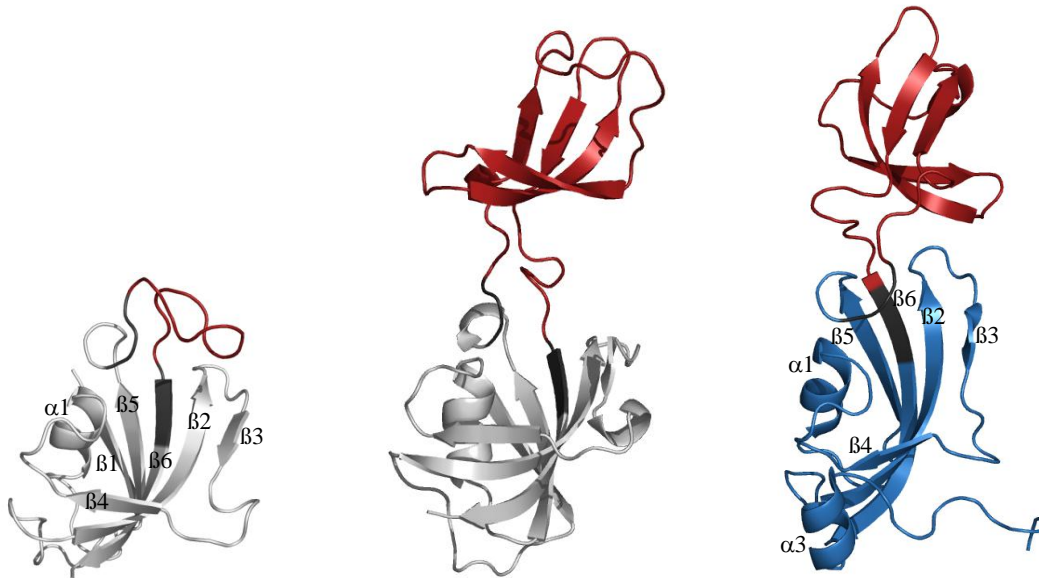


Abbildung 1-4: Vergleich der Tertiärstrukturen von hFKBP12, der Chimäre hFKBP12-IF und SlyD (von links nach rechts). Die FKBP-Domäne von hFKBP12 ist grau, der *flap* von hFKBP12 und die IF-Domäne von SlyD rot, die FKBP-Domäne von SlyD blau. Die Tripeptidmotive, die in vielen FKBP-Proteinen konserviert sind und als Verknüpfungspunkte für die Konstruktion der Chimäre hFKBP12-IF dienen, sind dunkelgrau dargestellt. Die Faltschichten der FKBP-Domänen sind entsprechend ihrer Sequenz nummeriert. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Pymol (DeLano, 2003) unter Verwendung der pdb-Einträge 1FKF (hFKBP12) bzw. 2K8I (SlyD) erstellt. Die Kristallstruktur der Chimäre hFKBP12-IF wurde von R. Jakob gelöst.

Im Gegensatz zu Cyclophilinen zeigen hFKBP12 und andere PPIasen der FKBP-Familie für die Isomerisierung der Peptidylprolylbindung in Tetrapeptidsubstraten eine ausgeprägte Substratspezifität, abhängig von der Aminosäure Xaa vor dem Prolin (Harrison & Stein, 1990; Stein, 1993b; Jakob *et al.*, 2009; Zoldák *et al.*, 2009a). Hydrophobe Reste an dieser Position (z. B. Leu oder Phe) werden gegenüber negativ geladenen Aminosäuren (wie Asp oder Glu) deutlich bevorzugt. Dies resultiert in einer 500fach höheren katalytischen Effizienz von hFKBP12 gegenüber dem Motiv Leu-Pro im Vergleich zu Glu-Pro (Harrison & Stein, 1990). Für die prolinlimitierte Faltung von Proteinsubstraten zeigt hFKBP12 nur eine sehr geringe Aktivität und eine ebenfalls sehr hohe Substratspezifität. Prolylisomerasen wie SlyD oder Triggerfaktor hingegen, die eine zusätzliche Chaperondomäne besitzen, sind in der Lage die prolinlimitierte Proteinfaltung sehr viel effizienter zu katalysieren als hFKBP12 (Jakob *et al.*, 2009).

Aufgrund ihrer Größe wurden die Prolylisomerasen der dritten Gruppe als Parvuline bezeichnet (lat. *parvulus* = klein). Die Isomeraseaktivität dieser Enzyme kann nicht wie die der Cyclophiline und FKBP's durch Immunsuppressiva inhibiert werden (Rahfeld *et al.*, 1994b). In ihrer Faltungstopologie ähneln die Parvuline den FKBP-Proteinen. Wie schon am Beispiel von SurA gezeigt, kommen Parvulindomänen in vielen Proteinen vor (Eisenstark *et al.*, 1992; Hani *et al.*, 1995). Der bekannteste Vertreter dieser Familie ist Pin1 (Lu *et al.*, 1996). Über seine zusätzliche WW-Domäne wechselwirkt Pin1 mit phosphorylierten Substraten und katalysiert spezifisch die Isomerisierung von Phosphoserin- und

Phosphothreonin-Prolylbindungen (Lu *et al.*, 1999b). Pin1 ist an der Regulation des Zellzyklus sowie an vielen anderen Prozessen beteiligt (Yaffe *et al.*, 1997; Hunter, 1998; Wulf *et al.*, 2005). Parvuline zeigen große Unterschiede hinsichtlich ihrer Prolylisomeraseaktivität gegenüber Tetrapeptidsubstraten. So besitzt beispielsweise humanes Parvulin 14 (Par14) eine sehr geringe Effizienz hinsichtlich der Prolylisomerisierung in Peptiden, während die Effizienz von Parvulin 10 aus *E. coli* (Par10) sehr viel höher ist. Die Substratspezifität der Parvuline ist vergleichbar mit der von FKBP-Proteinen, allerdings weniger stark ausgeprägt (Rahfeld *et al.*, 1994a; Zoldák *et al.*, 2009a). Parvuline zeigen zudem ebenfalls katalytische Aktivität hinsichtlich der prolinlimitierten Proteinfaltung, die jedoch innerhalb der Familie stark variiert (Behrens *et al.*, 2001; Schmidpeter *et al.*, 2011).

1.5.3 Verbesserung der Faltungshelferfunktion von hFKBP12 durch Insertion der verwandten IF-Domäne von SlyD

Beim Vergleich der Faltungsaktivität der verschiedenen Familien von Prolylisomerasen fällt auf, dass diese besonders innerhalb der FKBP-Familie stark variiert. Besitzen die FKBP-Proteine zusätzliche Chaperondomänen, wie es z. B. bei SlyD oder Triggerfaktor der Fall ist, so sind sie deutlich effizientere Faltungsenzyme für die prolinlimitierte Proteinfaltung als beispielsweise hFKBP12. Am Beispiel des Faltungsenzyms SlyD wurde der Einfluss der Chaperondomäne auf die Aktivität von SlyD bereits eingehend untersucht (Knappe *et al.*, 2007; Löw *et al.*, 2010).

E. coli-Zellen, die eine Mutation im SlyD-Gen tragen, sind resistent gegenüber der Lyse durch den Bakteriophagen Φ X174 (Roof *et al.*, 1994; Roof *et al.*, 1997; Bernhardt *et al.*, 2002). Somit spiegelt die Bezeichnung „sensitivity to lysis D“ (SlyD) die Funktion von SlyD wider. Zudem wurde SlyD wiederholt als Verunreinigung von rekombinanten Proteinen gefunden, die mit Hilfe von Nickel-Affinitätschromatographie isoliert worden waren, was in der Bezeichnung als „wonderous histidine-rich protein“ resultierte (Wülfing *et al.*, 1994).

SlyD ist aus zwei separierten Domänen aufgebaut, der FKBP-Domäne, die für die Prolylisomeraseaktivität verantwortlich ist, und einer zusätzlichen Domäne, die in die FKBP-Domäne inseriert ist. In hFKBP12 sind die β -Faltblattstränge 5 und 6 durch einen unstrukturierten Bereich aus 20 AS verbunden, der *flap* genannt wird (Abbildung 1-4). Bei SlyD ist die zusätzliche Domäne innerhalb dieses *flap*-Bereiches lokalisiert und wird daher als *insertion in flap* (IF-Domäne) bezeichnet (Weininger *et al.*, 2009). Hinsichtlich der Aktivitäten für die Prolylisomerisierung in Tetrapeptiden ist SlyD vergleichbar mit hFKBP12 (Jakob *et al.*, 2009). SlyD hat jedoch eine 100fach höhere Effizienz für die prolinlimitierte Proteinfaltung als hFKBP12 und ist somit ein exzellentes Faltungshelferenzym (Scholz *et al.*, 2006). Die hervorragenden Chaperoneigenschaften von SlyD finden auch in der Biotechnologie ihre Anwendung (Scholz *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2008). SlyD dient beispielsweise als Fusionspartner für die gp41-Untereinheit des Virusoberflächenproteins von HIV-1. Durch die Fusion mit SlyD wird die Löslichkeit von gp41 erhöht und somit seine

rekombinante Herstellung erleichtert, die für die HIV-Diagnostik notwendig ist (Scholz *et al.*, 2005).

Um die Frage zu beantworten, ob die hohe Faltungsaktivität von SlyD durch die Anwesenheit der IF-Domäne bedingt ist, wurde durch Knappe *et al.* (2007) eine Variante von SlyD erstellt, bei der die IF-Domäne durch den *flap* von hFKBP12 ersetzt ist (SlyD Δ IF). Desweiteren wurde ein chimäres Enzym konstruiert, bei dem die IF-Domäne von SlyD anstelle des *flap* von hFKBP12 inseriert wurde (FKBP12-IF, Abb 1-4). Als Verknüpfungspunkte für die Insertion der SlyD-IF-Domäne anstelle des *flap* in hFKBP12, wurden die in vielen FKBP-Proteinen vorkommenden konservierten Tripeptidmotive Ala-Tyr-Gly und Leu-Xaa-Phe verwendet (Maruyama *et al.*, 2004).

Die Chimäre hFKBP12-IF weist eine 200fach höhere Faltungshelferaktivität auf als das ursprüngliche Protein hFKBP12. Nach der Deletion der IF-Domäne blieb die Prolylisomeraseaktivität von SlyD Δ IF gegenüber kurzen prolinhaltigen Peptiden erhalten, die Aktivität als Faltungshelfer ging jedoch durch das Fehlen der IF-Domäne verloren. Diese Arbeit zeigte, dass die IF-Domäne als Chaperondomäne wirkt, und somit die Ursache der hohen Faltungshelferaktivität von SlyD in der prolinlimitierten Proteinfaltung ist (Knappe *et al.*, 2007). Die beiden PPIasen, hFKBP12 und SlyD, gehören trotz der sehr geringen Sequenzidentität von 14 % beide zu der Familie der FKBP's (Knappe *et al.*, 2007). Bei dem Transfer der IF-Domäne von SlyD auf hFKBP12 handelt es sich daher um eine Insertion einer verwandten Chaperondomäne.

1.5 Problemstellung der Arbeit

SlyD aus *E. coli* und auch verschiedene SlyD-Proteine aus homologen Organismen zeigen eine hohe Prolylisomerase- und Faltungsaktivität (Scholz *et al.*, 2006). Die im Vergleich zu hFKBP12 sehr viel höhere Faltungsaktivität konnte auf das Vorhandensein einer zusätzlichen Chaperondomäne, der IF-Domäne, zurückgeführt werden. Die Prolylisomerase SlpA (*SlyD like protein A*) zeigt einen ähnlich modularen Aufbau wie SlyD, und besitzt ebenfalls eine in die FKBP-Domäne inserierte IF-Domäne. Im Vergleich zu SlyD und hFKBP12 weist SlpA jedoch nur eine sehr geringe Prolylisomeraseaktivität auf. Auch seine zelluläre Funktion von SlpA ist bisher unbekannt.

Um die Ursache der niedrigen Aktivität von SlpA zu finden, sollte die Struktur dieses Enzyms in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Kovermann (Fachgruppe Biophysik, Halle) mittels NMR-Spektroskopie gelöst werden. Zudem sollten weitere SlpA-Proteine aus homologen Organismen hinsichtlich ihrer Prolylisomerase-, Faltungs- und Chaperonaktivität untersucht werden. Mögliche Kandidaten, die im Vergleich zu *E. coli* SlpA erhöhte Aktivität aufweisen, könnten durch einen Sequenzvergleich Aufschluss über für die Katalyse essentielle Reste geben.

Für die Isomerase SlyD zeigte sich, dass eine hohe Affinität zu entfalteten Proteinsubstraten und eine hohe Bindungsdynamik die Ursache für die hohe Faltungsaktivität sind. Die Funktion der IF-Domäne von SlpA sollte durch Bindungsexperimente analysiert werden, um

zu überprüfen, ob die niedrige Faltungsaktivität von SlpA möglicherweise auf eine geringere Affinität der IF-Domäne gegenüber entfaltenen Proteinen zurückzuführen ist. Desweiteren kann die Konstruktion eines chimären Enzyms aus SlpA-IF-Domäne und SlyD-FKBP-Domäne möglicherweise weitere Hinweise geben, ob die niedrige Faltungsaktivität in einer Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften der IF-Domäne oder in der Prolylisomerase-Domäne begründet liegt.

Da über das SlpA-Protein selbst nur wenige Informationen bekannt sind, sollten das Volllängenprotein und die jeweiligen isolierten Domänen hinsichtlich ihrer Stabilität und Faltung untersucht werden. Dies sollte zeigen, inwieweit sich die beiden Domänen gegenseitig in ihrer Stabilität und Faltung beeinflussen. Genauere Erkenntnisse zur Faltung und Funktion der Prolylisomerase SlpA, und ein Vergleich mit SlyD können helfen, die Funktionsprinzipien von Faltungshelferproteinen besser zu verstehen.

Durch Konstruktion des chimären Proteins hFKBP12-IF konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit einer Chaperondomäne, die ursprünglich aus dem verwandten Enzym SlyD stammt, die Faltungshelferfunktion von hFKBP12 deutlich steigern kann. Für den Fall, dass es sich hierbei um ein allgemeines Prinzip handelt, wonach die Anwesenheit einer Chaperondomäne, unabhängig von ihrer Herkunft, die Faltungsaktivität steigert, so sollte dies auch mit anderen Proteinbindungsmodulen möglich sein. Um dies zu untersuchen, sollten chimäre Faltungsenzyme aus der Prolylisomerase hFKBP12 und Chaperondomänen aus nicht-homologen Enzymen konstruiert werden. Bei diesen Chaperondomänen handelt es sich um die apikale Domäne von GroEL aus *E. coli*, die b'-Domäne von PDI aus *S. cerevisiae* und die Chaperondomäne von SurA aus *E. coli*. Die Fusionsproteine sollten zunächst hinsichtlich ihrer Stabilität analysiert werden, um so den Einfluss der Insertion der Gastdomänen in hFKBP12 zu untersuchen. Dabei kann die Stabilität und die Prolylisomeraseaktivität von hFKBP12 als sensibles Kriterium genutzt werden, um den Einfluss der insertierten Chaperondomäne auf die FKBP-Domäne zu untersuchen. Es sollte analysiert werden, ob die Anwesenheit einer nicht-verwandten hydrophoben Bindungsdomäne in einer erhöhten Faltungsaktivität resultiert. Für natürlich vorkommende PPIasen der FKBP-Familie, die eine zusätzliche Chaperondomäne besitzen, zeigte sich, dass die Anwesenheit der Chaperondomäne nicht nur die Faltungsaktivität erhöht, sondern auch die hohe Substratspezifität der FKBP-Domäne herabsetzt (Jakob *et al.*, 2009). Daher wurde die Substratspezifität der erstellten chimären Varianten hinsichtlich ihrer Aktivität für die Prolylisomerisierung in Peptiden und für die prolinlimitierte Faltung untersucht und mit der von bekannten Isomerasen wie SlyD und hFKBP12 verglichen. Um die Ursache der durch die Insertion der Chaperondomänen generierten Faltungsaktivität besser zu verstehen, sollte die Bindung der Chimären an eine entfaltete Form von RNaseT1 mit Hilfe von Förster-Resonanz-Energie-Transfer analysiert werden. Durch die Untersuchung der Funktionsprinzipien dieser artifiziellen Enzyme werden Rückschlüsse auf die Funktion von natürlich vorkommenden Faltungsenzymen ermöglicht, was helfen könnte, das allgemeine Prinzip ihres Wirkungsmechanismus besser zu verstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

<i>E. coli</i> XL1 Blue:	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Δ <i>slyD</i> :	<i>E. coli</i> B, F' <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal λ</i> (DE3), Δ <i>slyD</i>
<i>E. coli</i> DH5α:	DH5α F' φ80d <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 λ</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>
SBK44167:	<i>E. coli</i> DH5α mit pASK75 (Klonierungsvektor, Behrens <i>et al.</i> , 2001)
SBK44503:	<i>E. coli surA</i> (CAG24029; Behrens <i>et al.</i> , 2001) mit pASKSurA
SBK44452:	<i>E. coli ΔsurA Δskp</i> Mutante (CAG37057; Matern <i>et al.</i> , 2010)

Der *E. coli*-Stamm XL1 Blue wurde zur Produktion von Plasmid-DNA verwendet, der *E. coli*-Stamm DH5α wurde zur Expression von RNaseT1 S54G/P55N verwendet und der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) Δ*SlyD* zur Expression aller weiteren Proteinvarianten. Das Plasmid pA2T1 wurde für die Expression von RNaseT1 S54G/P55N verwendet. Der Vektor besitzt eine *OmpA*-Signalsequenz für den Transport ins Periplasma die N-terminal an das Gen von RNaseT1 fusioniert ist. Als Vektoren für die Klonierung und Expression der Proteinvarianten wurden die Plasmide pET11a und pET24a (Amp^R bzw. Km^R, NOVAGEN, Madison, USA) verwendet. In allen verwendeten Plasmiden stehen die klonierten Gene unter Kontrolle eines T7-Promotors. Für die *in vivo*-Experimente mit der *ΔsurA Δskp* Doppeldeletionsmutante wurden die mit SBK bezeichneten Stämme, die von Susanne Behrens-Kneipp zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Um die Proteinvarianten (PPIase1+IF und PPIase2+IF) in die Zellen mit der *ΔsurA Δskp* Doppeldeletion einzubringen, wurde das Plasmid pASK75 verwendet (Amp^R). Dabei werden die entsprechenden Gene mit einer N-terminalen *OmpA*-Siganlsequenz in den Vektor kloniert. Das Plasmid pASKSurA wurde von Susanne Behrens-Kneipp zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Nährmedien

dYT-Medium:	16 g/l Pepton aus Casein; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
Minimalmedium:	M9-Minimalmedium mit ¹⁵ N-NH ₄ Cl (und ¹³ C-Glukose)
Nährböden:	dYT-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar
RNase-Testagar:	dYT-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar, 5 % Toluidinblau

Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren (120 °C, 20 min, 2 bar) sterilisiert. Antibiotika zur Selektion auf Resistenzen wurden nach dem Autoklavieren als sterilfiltrierte Stammlösungen zu den Nährmedien gegeben (Amp: 300 µg/ml, Km: 50 µg/ml).

2.1.3 Enzyme, Peptide und Proteine

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (6 U/μl)	Roman Jakob (Bayreuth)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/μl)	MBI Fermentas (Vilnius, LT)
T4-DNA-Ligase (1 Weiss U/μl)	
T4-Polynukleotidkinase (10 U/μl)	
BenchMark™ Proteinstandard	
Restriktionsenzyme: <i>Bam</i> HI, <i>Nde</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Bsa</i> I, <i>Xho</i> I (20 U/μl)	
bovines Serumalbumin (100x BSA, 100 mg/ml)	NEB (Frankfurt a. Main)
Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNa	Dr. Tobias Aumüller (MPI, Halle)
Xaa160-Pro161-N2 (Xaa-Pro-N2)	Roman Jakob (Bayreuth)

2.1.4 Oligodesoxyribonukleotide

Die zur Klonierung bzw. Mutagenese der jeweiligen Proteinvarianten verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma INVITROGEN (Karlsruhe, D) bezogen und sind im Anhang aufgeführt.

DNA-Längenstandards:

λ-DNA/ <i>Eco</i> 130 I: 421-19329 bp	MBI FERMENTAS (Vilnius; LT)
bp-Leiter: 100-1500 bp	S. Hoffmann-Thoms (Bayreuth)

2.1.5 Chemikalien

Ammoniumhydrogencarbonat, Imidazol	Fluka (Neu-Ulm)
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG), Harnstoff	Gerbu (Gaiberg)
5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure (1,5-IAEDANS, > 90%)	Invitrogen (Karlsruhe)
Guanidiniumchlorid (ultra pure)	MP (Biomedicals, Irvine, USA)
Adenosin-5'-Triphosphat, Ampicillin, Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamidlösung (37,5:1 "Rotiphorese 30"), Desoxyribonukleotide, EDTA, Ethidiumbromid, Glutathion ox. (GSSG), Glutathion red. (GSH), N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED), N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid (TCEP)	Roth (Karlsruhe)
Agarose, APS, SDS	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brillinat Blue G-250, Bromphenolblau, Silica (S-5631), Lithium-Chlorid, Natriumiodacetat, Trifluorethanol	Sigma Aldrich (Deisenhofen)

Alle weiteren Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. von der Firma Grüssing (Filsum, Germany) 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 mindestens 30 min entgast.

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Ni-NTA-Superflow-Agarose-Säule (5 ml)	Qiagen (Hilden)
NAP-5 und -10 Säulen (Sephadex G-25 DNA-grade), Gelfiltrationssäule HiLoad Superdex 75 (16/60 und 26/60 prep grade), Fractogel EMI TMAE-650 Anionenaustauschersäule	GE Healthcare (Freiburg, D)
Konzentratoren Amicon Ultra-15 (3 kDa Ausschluss), Millipore Filter Typ VS 0,025 µm	Millipore (Carrigtwohill, Ireland)
Spectropor Dialyseschläuche (>3,5 kDa)	Spectrum (Los Angeles, USA)
Rotilabor Spritzenfilter (0,45; 0,2 µm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Membranfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)

2.1.7 Geräte

DX.17MV <i>sequential stopped-flow</i> -Fluoreszenzspektrophotometer	Applied Photophysics, (Leatherhead, GB)
Transilluminator 302 nm	Bachhofer (Reutlingen)
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5Bplus	Du Pont (Bad Homburg)
Rotoren GS-3 und SS-34	
Zentrifuge 5415 R, Mastercycler Gradient, Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
FPLC-Anlage, ÄKTA-FPLC (academic edition), Vertikalelektrophoresekammer 2050 MIDGET und Netzgerät 2301 Macro	GE Healthcare (Freiburg)
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil	Hellma (Mühlheim)
Laborfuge 400 R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Z 216 MK	Hermle (Wehingen)
Refraktometer	Krüß (Hamburg)
Bio-Print Darkroom CN-UV/Vis	LTF-Labortechnik (Wasserburg)
Microfluidizer M-110L	Microfluidics (Newton, USA)
Thermocycler PTC 100	MJ Research (Watertown, USA)
Environmental incubator shaker G24, Innova 3000, incubator shaker C24	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Easyject Prima Elektroporationsapparatur	Peqlab (Erlangen)
Laborwaage L610D, Analysenwaage R200D	Sartorius (Göttingen)
Wasseraufbereitung: Seralpur pro 90 CN	Seral (Ransbach)
UV/VIS-Dioden-Array Spectrometer 8452A	Hewlett-Packard (Waldbronn)

Hitachi-Fluoreszenzspektrophotometer F-4010	Hitachi (Tokio, J)
Spektropolarimeter Jasco J-600,	Jasco (Groß-Umstadt)
Peltierelement PTC-348,	
Jasco-Fluoreszenzspektrophotometer FP-6500	
VP-DSC Mikrokolorimeter	MicroCal (Northampton, USA)
UV/Vis-Spektrophotometer: Cary 100 Bio	Varian (Darmstadt)
Membran-Vakuumpumpe	Vakuubrand (Wertheim)
Mikroprozessor pH-Meter: WTW pH 537	WTW (Weilheim)

2.1.8 Computerprogramme

Biocapt	LTF-Labortechnik (Wasserburg)
BioEdit	Hall, T. (Ibis Therapeutics, USA), (Hall, 1999)
Chromas 1.4.5	Technelysium (Helensvale, AUS)
Grafit 3.0 / 5.0	Erithacus (Middlesex, UK), Zitat
Origin 5.0	OriginLab Corporation (USA)
Pymol	DeLanoScientific (San Francisco, USA), (DeLano, 2003)
Scientist 2.01	Micromath (St. Louis, USA)
Swiss-Pdb Viewer Version 3.7	GlaxoSmithKline (München, D), (Guex & Peitsch, 1997)

2.2 Methoden

2.2.1 Gelelektrophoretische Methoden

2.2.1.1 Agarose Gelelektrophorese

TAE-Puffer (1x):	40 mM Tris pH20 °C 8,0; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA
Probenpuffer:	4 M Harnstoff; 10 mM EDTA; 50 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer:	0,5x TAE-Puffer
Färbelösung:	0,5x TAE-Puffer; ca. 2 µg/ml Ethidiumbromid
Entfärbelösung:	0,5x TAE-Puffer

Für die analytische Trennung sowie zur präoperativen Reinigung von DNA-Fragmenten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (Schägger & von Jagow, 1987). Für kleine DNA-Fragmente (< 1 kb) wurden Gele mit 1,6 % (w/v) Agarose, für größere DNA-Fragmente Gele mit 0,6 % (w/v) Agarose in 0,5x TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 1/6 Probenvolumen Probenpuffer gemischt. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte für 30 min in einer horizontalen Elektrophoresekammer in 0,5x TAE-Puffer, bei 125 V (Feldstärke: 6 V/cm Elektrodenabstand). Das Gel wurde 10 min in Ethidiumbromid-Färbelösung gefärbt, kurz in Entfärbelösung entfärbt und anschließend durch Anregung der Fluoreszenz des Ethidiumbromids ($\lambda = 302 \text{ nm}$) die DNA-Banden sichtbar gemacht.

Für präparative Agarose-Gele wurde *low melt* Agarose verwendet. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das gewünschte Fragment aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und wie unter 2.2.3.1 beschrieben gereinigt.

2.2.1.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel:	12,5 % (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:	4,4 % (w/v) Acrylamid (s.o.), 0,75 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,45, 0,07 % (w/v) SDS
Probenpuffer (4x):	200 mM Tris/HCl pH ^{25 °C} 7; 120 mM DTT; 40 mM EDTA; 48 % (v/v) Glycerin; 15 % (w/v) SDS; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
Gelpuffer:	3 M Tris/HCl pH 8,45; 0,3 % (w/v) SDS
Anoden-Puffer:	200 mM Tris/HCl pH ^{25 °C} 8,9
Kathoden-Puffer:	100 mM Tris/HCl pH ^{25 °C} 8,2; 100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS
Färbelösung:	25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blue G
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger & von Jagow ist durch die Verwendung von Tricin als Folgeion eine gute Methode um kleine Proteine, besonders Proteine zwischen fünf und 20 kD, zu trennen (Schägger & von Jagow, 1987). Durch Zugabe von 200 µl 10 % (w/v) APS und 15 µl TEMED bzw. 100 µl 10 % (w/v) APS und 10 µl TEMED wurde die Polymerisation des Trenngels bzw. des Sammelgels gestartet. Die Proben wurden mit ¼ Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung der Proteine 15 min gekocht. Die Elektrophorese wurde in einer MIDGET-Vertikalelektrophoreseapparatur bei 4 °C durchgeführt. Für das Sammelgel wurde eine Stromstärke von 20 mA angelegt, zum Auftrennen der Proteine im Trenngel wurde die Stromstärke auf 45 mA erhöht. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung gefärbt (kurzes Erhitzen, ca. 10 min Inkubation) und schließlich für mehrere Stunden entfärbt.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.2.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

<i>Pfu</i> -Puffer (10x):	200 mM Tris/HCl pH ^{25 °C} 8,8; 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 mM MgSO ₄ ; 100 mM KCl; 1 mg/ml BSA, 1 % (w/v) Triton X-100
---------------------------	---

DNA-Fragmente für die Klonierung in den Expressionsvektor pET11a oder pET24a und für Sequenzierungen wurden mittels PCR amplifiziert. Für diese PCR wurde die *Pfu*-Polymerase verwendet, da diese Polymerase im Gegensatz zur fehleranfälligeren *Taq*-Polymerase eine 3'-Exonuclease-Aktivität besitzt.

Die PCR erfolgte in 50 µl-Ansätzen mit 38 µl ddH₂O, 5 µl *Pfu*-Puffer (10x), 2 µM 10 mM dNTPs, je 2 µl 10 µM *forward* und *backward Primer*, 1 µl Plasmid-DNA und 1 µl *Pfu*-DNA-Polymerase (3 U). Nach dem Erhitzen der Ansätze im Thermocycler auf 95 °C (2 min), wurde

das gewünschte Fragment innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert. Jeder Zyklus bestand aus dem Aufschmelzen der Stränge (95 °C, 30 s), der *Primer*-Anlagerung (50 °C, 30 s) und der DNA-Synthese (72 °C, Dauer abhängig von Fragmentlänge). Unvollständige Amplifikate wurden in einem abschließenden Schritt (72 °C, 10 min) vervollständigt. Für die Klonierung wurden die im Anhang aufgeführten Primer mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen verwendet, für die Sequenzierung die flankierenden Primer T7-Promotor/ T7-Terminator. Die PCR-Produkte wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese (1,6 % (w/v) Agarose, 2.2.1.1) überprüft und wie unter 2.2.3.1 gereinigt.

2.2.2.2 Einführung von Mutationen durch *blunt-end* Mutagenese

T4-PNK-Puffer (10x): 70 mM Tris/HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 50 mM DTT

T4-DNA-Ligase-

Puffer (10x): 400 mM Tris/HCl pH 7,8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 5 mM ATP

Mit Hilfe der *blunt-end* Mutagenese ist es möglich, Mutationen oder ein zusätzliches DNA-Fragment in zyklische DNA-Moleküle einzuführen. Infolge der gegenläufigen *Primer* wird das gesamte Plasmid als lineares Fragment vervielfältigt. Die PCR erfolgte unter den in 2.2.2.1 angegebenen Bedingungen mit 3 U *Pfu*-Polymerase, wobei eine ausreichende Polymerisationszeit (2 min pro kb DNA-Länge) notwendig ist.

Um das lineare Fragment zu zyklisieren, wurden die 5'-Enden phosphoryliert. Dafür wurde zu 24 µl linearer DNA 3 µl 10 mM ATP, 3 µl T4-PNK-Puffer (10x) und 1 µl T4-PNK (10 U/µl) gegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden zu 27 µl entsalzter und phosphorylierter DNA 3 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) gegeben und 2 h bei 22 °C inkubiert. Die Ligase wurde bei 70 °C 15 min inaktiviert. Da die *Template*-DNA, im Gegensatz zu *in vitro* synthetisierter mutierter DNA, methyliert vorliegt, kann sie spezifisch durch Inkubation mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* geschnitten werden. *DpnI* besitzt eine Erkennungssequenz aus vier Basen, welche ein methyliertes Adenin enthält, und ist daher für methylierte und hemimethylierte DNA spezifisch. Um die Matrize zu schneiden wurde 1 µl *DpnI* zugegeben, über Nacht bei 37 °C inkubiert und wie unter 2.2.3.1 gereinigt.

2.2.2.3 Erzeugung von Genfragmenten und Einführung von Mutationen durch *overlap extension* PCR

Pfu-Puffer (10x): 200 mM Tris/HCl pH^{25 °C} 8,8; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM MgSO₄; 100 mM KCl; 1 mg/ml BSA, 1 % (w/v) Triton X-100

Um die verschiedenen Genfragmente für die chimären Proteinvarianten zu fusionieren, wurde eine *overlap extension* PCR durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die einzelnen zu fusionierenden Genfragmente mittels *Primern* amplifiziert, die komplementäre Überhänge besitzen. Im zweiten PCR-Schritt wurden die drei Fragmente als *template*-DNA verwendet und so aufgrund ihrer komplementären Enden unter Verwendung der flankierenden *Primer* vereinigt.

Die PCR erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Die PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese (1,6 % (w/v) Agarose) (2.2.1.1) überprüft und wie in 2.2.3.1 beschrieben gereinigt.

2.2.2.4 Kolonie-PCR

Taq-Puffer (10x): 20 mM Tris/HCl pH^{25 °C} 9,0; 50 mM KCl; 0,1 % (w/v) TritonX-100

Bei der Kolonie-PCR wird DNA aus Bakterienkolonien als Matrize verwendet. Hierdurch wird überprüft, ob die Klone die gewünschte DNA-Sequenz enthalten. Da die PCR nur zur Analyse eingesetzt wird, ist eine 3'-Exonucleaseaktivität nicht notwendig und es kann die robustere *Taq*-DNA-Polymerase verwendet werden.

Als *Primer* für die klonierten DNA-Fragmente wurde das flankierende Oligodesoxyribonukleotid T7-Promotor und der entsprechende gegenläufige genspezifische *Primer* (Anhang) verwendet. Für 16 PCR-Ansätze wurde eine 200 µl PCR-Stammlösung aus 20 µl *Taq*-Puffer (10x), 20 µl 25 mM MgCl₂, je 8 µl 10 µM *Primern*, 8 µl 10 mM dNTPs, 4 µl *Taq*-DNA-Polymerase (6 U/µl) und 132 µl ddH₂O hergestellt. Jeder Ansatz (10 µl) wurde mit einer einzelnen Kolonie inokuliert. Mit dem restlichen Zellmaterial wurde zum Anlegen einer Übernachtskultur (ÜNK) 50 µl dYT-Medium angeimpft. Das verwendete PCR-Programm ist unter 2.2.2.1 beschrieben, wobei die Dauer der Polymerisation abhängig ist von der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Der Erfolg der Kolonie-PCR wurde über Agarose-Gelelektrophorese (1,6 % (w/v) Agarose, 2.2.1.1) überprüft.

2.2.3 Isolierung und Reinigung von DNA

2.2.3.1 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

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

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

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsschritt oder nach einer PCR wurde die DNA aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Agarose wurde mit 2 Volumina 6 M NaI-Lösung versetzt und bei 55 °C unter Schütteln gelöst. Nach Zugabe eines geeigneten Volumens Silica-Suspension (10 µl enthalten 1 mg Silica, 1 mg bindet ca. 3 µg DNA) wurde die DNA 5 min auf Eis inkubiert. Das Silica wurde durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und dreimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Das Pellet wurde vollständig vom Puffer befreit, in 30 µl ddH₂O aufgenommen und die DNA bei 45 °C für 5 min unter Schütteln eluiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Entsalzung der DNA und Abtrennung von kürzeren Fragmenten (<100 bp) wurde die DNA ebenfalls wie oben beschrieben gereinigt, jedoch ohne sie im Voraus durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufzutrennen.

2.2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation doppelsträngiger Plasmid-DNA diente zur Isolierung der Expressionsvektoren pET11a und pET24a aus *E. coli* XL1 Blue-Zellen. Für die Isolierung der doppelsträngigen DNA wurden Kulturen der jeweiligen *E. coli* XL1 Blue-Zellen bei 37 °C über Nacht inkubiert. Aus 1,5 ml dieser Kulturen wurde mit Hilfe des *Pharmacia-FlexiPrep-Kit* (GE Healthcare, Freiburg, D) gemäß den Herstellerangaben die DNA präpariert. Die Zellen werden hierbei im alkalischen Milieu (Sambrook *et al.*, 1989) aufgeschlossen, die DNA an eine Anionenaustauschermatrix gebunden und mit 50 µl ddH₂O eluiert.

2.2.4 Klonierung verschiedener Proteinvarianten

Fast-Digest-Puffer (10x) (Fermentas)

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische, meist palindromische DNA-Sequenzen und schneiden an dieser Stelle die DNA; eine Eigenschaft, die zur Generierung rekombinanter Vektoren ausgenutzt werden kann. Durch die vorangegangene PCR (2.2.2) werden mit Hilfe der verwendeten Primer die nötigen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme angefügt. Für die Klonierung der Proteinvarianten in den pET11a- bzw. pET24a-Vektor wurden die Restriktionsenzyme *NdeI*, *BamHI*, *XhoI* und *BsaI* verwendet.

2.2.4.1 Restriktion des Vektors und der Genfragmente

Um die Gene der Protein-Varianten in den Expressionsvektor pET11a bzw. pET24a zu klonieren, wurde der Vektor mit *NdeI* und *BamHI* bzw. *NdeI* und *XhoI* geschnitten. Für die Restriktion wurden 26 µl ungeschnittener pET-Vektor mit 3 µl 10x Fast-Digest-Puffer und jeweils 1,5 µl der Restriktionsenzyme 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der geschnittene Vektor über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (0,6 % (w/v) *low melt* Agarose, 2.2.1.1).

Um die Genfragmente in den geschnittenen Vektor zu klonieren, wurde das Fragment ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Für diesen Zweck wurden 27 µl DNA-Fragment mit 3 µl 10x Fast-Digest-Puffer und jeweils 1,5 µl der Restriktionsenzyme 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das geschnittene DNA-Fragment gereinigt (2.2.1.1).

2.2.4.2 Ligation

T4-DNA-Ligase

Puffer (10x): 400 mM Tris/HCl pH 7,8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 5 mM ATP

Die T4-DNA-Ligase wurde verwendet um die gewünschten DNA-Fragmente in den geschnittenen Vektor zu ligieren. Die T4-DNA-Ligase knüpft Phosphodiesterbindungen zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe.

Für die Ligation wurde 3 µl geschnittener Vektor, 18 µl geschnittenes Fragment, 3 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl 10 mM ATP und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 Weiss U) 1 h bei 22 °C inkubiert. Elektrokompente *E. coli* XL1 Blue-Zellen wurden mit 8 µl des

Ligationsproduktes transformiert (2.2.5.2). Der Erfolg der Klonierung wurde durch Kolonie-PCR überprüft (2.2.2.4). Von einem positiven Klon wurde zum Anlegen einer Glycerindauerkultur (600 µl ÜNK, 300 µl 87 % (v/v) Glycerin) eine ÜNK angelegt.

2.2.5 Herstellung und Transformation von *E. coli*-Zellen

2.2.5.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Für die Präparation der Zellen wurden 500 ml dYT-Medium mit 2 ml einer ÜNK von *E. coli* XL1 Blue- oder *E. coli* BL23(DE3) $\Delta SlyD$ -Zellen angeimpft und im Schüttler bei 30 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend pelletiert (6 000 rpm, 10 min, 4 °C; GS-3). Das Zellpellet wurde auf Eis mit 500 ml ddH₂O gewaschen und erneut pelletiert (s.o.). Der Waschschritt wurde mit 250 ml 10 % (v/v) Glycerin wiederholt. Danach wurde das Pellet in 10 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und die Zellen nochmals zentrifugiert (6 000 rpm; 10 min; 4 °C; SS34). Abschließend wurden die Zellen in 1,5 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert, auf 40 µl-Aliquots verteilt und bei -80 °C gelagert. Während der gesamten Präparation war darauf zu achten, dass die Zellen ständig auf Eis gelagert wurden und die verwendeten Lösungen ausreichend gekühlt waren.

2.2.5.3 Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurde die zu transformierende DNA in einer 10-minütigen Mikrodialyse gegen ddH₂O entsalzt. Ein Aliquot der *E. coli* XL1 Blue- oder *E. coli* BL23(DE3) $\Delta SlyD$ -Zellen wurde auf Eis aufgetaut, die DNA zugegeben und in eine gekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte durch einen Spannungspuls von 2500 V. Die transformierten Zellen wurden sofort in 700 µl dYT-Medium aufgenommen, kurz abzentrifugiert (13 000 rpm, 30 s, Laborfuge), ca. 500 µl des Überstandes abgenommen und das Pellet im übrigen Medium resuspendiert. Zur Selektion der rekombinanten Zellen wurde die Zellsuspension auf einer dYT-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Amp: 300 µg/ml, Km: 50 µg/ml) ausplattiert. Infolgedessen konnten nur transformierte Zellen, mit der durch den jeweiligen pET-Vektor erworbenen Antibiotikum-Resistenz, wachsen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.6 Experimente zur Komplementation von *E. coli* $\Delta surA$ Δskp Doppeldeletionsmutanten

Bei der von Susanne Behrens-Kneipp erstellten *E. coli* $\Delta surA$ Δskp Doppeldeletionsmutante wurde das chromosomale *SurA*-Gen unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors ($P_{Llac-O1}$) gestellt (Lutz & Bujard, 1997; Matern *et al.*, 2010). Daher muß diese Mutante in Anwesenheit von IPTG gezogen werden, da die Doppeldeletion von *SurA* und *Skp* für *E. coli* Zellen letal ist. Durch Einführen des Plasmids pASKSurA, bei dem das *SurA*-Gen unter Kontrolle eines Tet-induzierbaren Promotors steht, kann die $\Delta surA$ Δskp

Doppeldeletionsmutante in Anwesenheit von Tetracyclin komplementiert werden. Um zu überprüfen, ob dies auch durch die Varianten PPIase1+IF und PPIase2+IF möglich ist, wurden die entsprechenden Plasmide pASKPPIase1+IF und pASKPPIase2+IF erstellt. Die entsprechenden Plasmide wurden in die *ΔsurA Δskp* Doppeldeletionsmutante transformiert. Zur Kontrolle wurden ebenfalls der leere Vektor pASK75 und pASKSurA in die Mutante transformiert. Die Komplementationsexperimente wurden wie in Matern *et al.* (2010) beschrieben durchgeführt. Die mit den jeweiligen Plasmiden transformierten Doppeldeletionsmutanten wurden über Nacht bei 37 °C in Anwesenheit von IPTG kultiviert. Die Übernachtskulturen wurden auf die gleiche OD₆₀₀ von 1 verdünnt. Anschließend wurden 10fache Verdünnungen mit IPTG-freiem dYT-Medium hergestellt. Jeweils 10 µl der 10⁰, 10⁻², 10⁻⁴ und 10⁻⁶fachen Verdünnungen wurden auf dYT-Agarplatten (100 µg/ml Amp, 50 µg/ml Km, 10 µg/ml Tet) ± 1 mM IPTG aufgetragen und bei 37 °C für 16 bis 25 h inkubiert.

2.2.7 Fermentation und Reinigung der Protein-Varianten

2.2.7.1 Test auf Überexpression eines Proteins

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

Um die Überexpression der Protein-Varianten zu überprüfen, wurden 5 ml dYT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (300 µg/ml Amp oder 50 µg/ml Km) und *E. coli* BL21(DE3) *ΔSlyD*-Zellen, die das gewünschte Konstrukt enthielten, angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 inkubiert. Als nicht induzierte Referenz wurde ein Volumen entsprechend einer OD₆₀₀ von eins entnommen und die Zellen pelletiert. Um die Überexpression der Protein-Varianten zu induzieren, wurde der Rest der Kultur mit 1 mM IPTG versetzt. Nach vierstündiger Inkubation wurde erneut ein Volumen mit einer OD₆₀₀ von eins entnommen und abzentrifugiert. Die Proben wurden in 20 µl 1x Roti-Load-Probenpuffer und 20 µl ddH₂O gelöst. Mit Hilfe einer SDS-PAGE (2.2.1.2) wurde durch Vergleich der Bandenintensität der nicht induzierten Referenz und der induzierten Probe die Überexpression überprüft.

2.2.7.2 Fermentation der Proteinvarianten

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

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

Das benötigte Volumen an autoklaviertem Kulturmedium (dYT) wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (Amp: 300 µg/ml, Km: 50 µg/ml). Um Verunreinigungen durch *E. coli* SlyD zu vermeiden, wurden alle PPIasen in *E. coli* BL21(DE3)*ΔSlyD*-Zellen exprimiert. 500 ml Kulturmedium wurde mit 2 ml ÜNK der entsprechenden *E. coli* BL21(DE3)*ΔSlyD*- oder BL21 DH5α-Zellen (Expression von RNaseT1) angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 inkubiert. Zur Expression des Proteins wurde in den Zellen durch Zugabe von 1 mM IPTG die

Induktion der T7-RNA-Polymerase ausgelöst. Auf diese Weise konnte zum einen die Expression der Proteine vor Induktion weitgehend unterdrückt und zum anderen ein sehr hohes Expressionsniveau erreicht werden (Studier *et al.*, 1990). Zur Produktion des Proteins wurde weitere 4 h bei 37 °C fermentiert. (S54G/P55N)-RNaseT1 wurde über Nacht bei 30 °C fermentiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (7 000 rpm, 10 min, 4 °C, GS-3), das Pellet in 20 ml Lyse-Puffer pro Liter eingesetztem Kulturmedium aufgenommen und bis zum Aufschluss bei -80 °C gelagert.

2.2.7.3 Reinigung mittels Affinitäts- und Gelpermeationschromatographie

Die verschiedenen SlpA-Varianten und die GroEL-Chimären 1 bis 3 wurden cytoplasmatisch in *E. coli* B121 Δ *SlyD*-Zellen exprimiert. Die Varianten wurden mit einem C-terminalen His-tag kloniert. Somit ist es möglich sie mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus dem Überstand nach dem Zellaufschluss zu gewinnen. Durch anschließende Gelpermeationschromatographie konnten die Proteine in reiner Form erhalten werden.

2.2.7.3.1 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde die aufgetaute Zellsuspension mit 100 mg/ml Lysozym. Die Zellsuspension wurde im Microfluidizer M-110L aufgeschlossen. Zellfragmente und *inclusion bodies* wurden durch Zentrifugation pelletiert (16 000 rpm, 20 min, 4 °C, SS-34) und der Überstand filtriert (Rotilabor Spritzenfilter, 0,45 µm)

2.2.7.3.2 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Puffer A: 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,8, 10 mM Imidazol

Puffer B: 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,8, 500 mM Imidazol

Die Proteinlösung wurde mit 6 mM MgCl₂ versetzt, um freies EDTA zu binden. Die jeweiligen Proteine wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 4 ml/min auf die Ni-NTA-Säule (5 ml Säulenvolumen), die zuvor mit Puffer A äquilibriert worden war, aufgetragen. Schwach bindende Proteine wurden durch Waschen mit 100 ml Puffer A entfernt. Die Elution erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM (1:1 (v/v) Puffer A:Puffer B). Die ersten 2,5 ml, das Totvolumen der Säule, wurden verworfen und anschließend 30 ml des Eluats mit dem gewünschten Protein gesammelt. Nach der Elution wurde die Säule mit 15 ml Puffer B und abschließend mit ddH₂O gespült.

2.2.7.3.3 Gelpermeationschromatographie

GPC-Puffer: 100 mM Kaliumphosphat pH^{RT} 7,5

Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde konzentriert und mittels einer HighLoad Superdex 75 prep-grade (16/60 prep grade) Gelpermeationschromatographiesäule weiter gereinigt. Die Säule wurde zunächst in GPC-Puffer äquilibriert, 5 ml Proteinlösung mit einer Flussrate von 1,7 ml/min aufgetragen und schließlich das Protein bei einer Flussrate von

1,7 ml/min mit GPC-Puffer eluiert. Nach 15 min wurde das Eluat 1 h in 1,7 ml Fraktionen gesammelt. Die Detektion des Proteins erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm. Die vereinigten Fraktionen aus der Gelpermeationschromatographie wurden mit Hilfe von Konzentratoren (Amicon Ultra) mit einem Ausschlussgewicht von 3 kDa konzentriert.

2.2.7.4 Reinigung mittels Anionenaustausch- und Gelpermeationschromatographie

Auftragspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH^{RT} 8,0
Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl, pH^{RT} 8,0
GPC-Puffer: 100 mM Kaliumphosphat pH^{RT} 7,5

Da bei den Varianten 4 bis 7 der GroEL-Chimäre der His-tag entfernt worden war, wurden diese Proteine nativ mittels Anionenaustauschchromatographie und anschließender Gelpermeationschromatographie gereinigt. Der Zellaufschluss erfolgte wie unter 2.2.6.3.1 beschrieben. Um vorhandene DNA zu fällen wurden 320 µl Polyethylenimin (50 % (w/v) in ddH₂O) zugegeben, 30 min unter Rühren inkubiert und anschließend zentrifugiert (16 000 rpm; 30 min; 4 °C; SS-34). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit Auftragspuffer zweifach verdünnt und anschließend mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/min auf eine mit Auftragspuffer äquilibrierte Fractogel EMI TMAE-650 Anionenaustauschersäule aufgetragen. Nach 70 min Waschen mit Auftragspuffer und 0,05 M NaCl wurde durch einen linearen NaCl-Gradienten von 0-0,6 M eluiert, wobei das Eluat in 5 ml Fraktionen (Flussrate: 5 ml/min) gesammelt wurde. Noch gebundene Proteine wurden anschließend mit 100 % Elutionspuffer von der Säule gewaschen. Die Detektion des Proteins erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm. Die proteinhaltigen Fraktionen, in denen das entsprechende Protein enthalten war, wurden vereinigt, konzentriert und wie unter 2.2.6.3.3 beschrieben einer Gelpermeationschromatographie unterzogen.

2.2.7.5 Reinigung mit Hilfe der Sumo-Fusionstechnologie

hFKBP12, die PDI- und SurA-Chimären, die Parvulin-Domänen aus SurA, die Parvulin+IF-Chimären und RNaseT1_{Cys} wurden cytoplasmatisch als Sumo-Fusionsproteine hergestellt. Der Zellaufschluss erfolgte wie unter 2.2.6.3.1 beschrieben. Durch Fusion an das SUMO-Protein, das N-terminal einen His-tag besitzt, können die Proteine zunächst über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Anschließend wird durch Proteolyse durch die SUMO-Proteasen Senp2 oder Ulp1 ein tag-freies Protein erhalten.

2.2.7.5.1 Affinitätschromatographie zur Reinigung der SUMO-Fusionsproteine

Puffer A: 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,8, 10 mM Imidazol
Puffer B: 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,8, 500 mM Imidazol

Die Proteinlösung wurde mit 6 mM MgCl₂ versetzt, um freies EDTA zu komplexieren. Die jeweiligen Proteine wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 4 ml/min auf die Ni-NTA-Säule, die zuvor mit Puffer A äquilibriert worden war, aufgetragen. Schwach bindende

Proteine wurden durch Waschen mit 100 ml Puffer A entfernt. Die Elution erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM (1:1 (v/v) Puffer A:Puffer B). Die ersten 2,5 ml, das Totvolumen der Säule, wurden verworfen und anschließend 30 ml des Eluats mit dem gewünschten Fusionsprotein gesammelt. Anhand der Absorption bei 280 nm wurde die Konzentration des Fusionsproteins bestimmt.

2.2.7.5.2 Affinitätschromatographie zur Reinigung der SUMO-Fusionsproteine unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender oxidativer Rückfaltung

Puffer A: 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,8, 10 mM Imidazol
 Puffer B: 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,8, 500 mM Imidazol
 Puffer C: 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,8, 10 mM Imidazol, 1 mM TCEP
 Puffer D: 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,8, 10 mM Imidazol, 5 mM GSH/ 1 mM GSSG

Für die disulfidverbrückten Chimären wurde die erste Affinitätschromatographie unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender oxidativer Rückfaltung auf der Säule durchgeführt. Die Proteinlösung wurde mit 6 mM MgCl₂ versetzt und mit einer Flussgeschwindigkeit von 4 ml/min auf die Ni-NTA-Säule, die zuvor mit Puffer C äquilibriert worden war, aufgetragen. Durch Waschen mit Puffer C wurden schwach bindende Proteine entfernt und das an die Säule gebundene Fusionsprotein reduziert. Durch Waschen mit 10 Säulenvolumen Puffer D wurde die Bildung der korrekten Disulfidbrücken initiiert. Die Elution erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM (1:1 (v/v) Puffer A:Puffer B). Die ersten 2,5 ml wurden verworfen und anschließend 30 ml des Eluats mit dem gewünschten Fusionsprotein gesammelt. Anhand der Absorption bei 280 nm wurde die Konzentration des Fusionsproteins bestimmt.

2.2.7.5.3 Proteolyse des SUMO-Fusionsproteins und erneute Affinitätschromatographie

Das Fusionsprotein wurde in einem Dialyseschlauch (3,5 kDa Ausschluss) zusammen mit einer geeigneten Menge an SUMO-Protease Senp2 oder Ulp1 (1 g Protease spaltet 150 g Substrat) bei 4 °C gegen 2 l Puffer A ohne Imidazol über Nacht dialysiert. Während der Dialyse wurde das Imidazol entfernt und das gewünschte Protein durch die Protease hydrolytisch von dem SUMO-Protein abgespalten. Senp2 und Ulp1 besitzen wie das SUMO-Protein einen His₆-tag und können somit über eine erneute Ni-NTA-Affinitätschromatographie von dem gewünschten Protein abgetrennt werden. Die Affinitätschromatographie erfolgte wie unter 2.2.6.5.1 beschrieben. Allerdings wurde bei diesem Reinigungsschritt der Durchbruch gesammelt, der das gewünschte tag-freie Protein beinhaltete. Anschließend wurden mit 10 Säulenvolumina Puffer B Senp2 und das SUMO-Protein von der Säule eluiert. Zur weiteren Reinigung wurde wie unter 2.2.6.3.3 beschrieben, eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt.

2.2.7.6 Reinigung mittels Periplasmaaufschluss und Anionenaustauschchromatographie

(S54G/P55N) RNase T1 wurde in *E. coli* DH5 α -Zellen exprimiert, die das Plasmid pA2T1 mit dem RNase T1-Gen enthalten (Myers, 1988). Das Gen schließt dabei an die *OmpA*-Signalsequenz an. Das Signalpeptid OmpA vermittelt den Export der überexprimierten RNase T1 ins Periplasma, wo das native, disulfidverbrückte Protein gebildet wird. Nach der Fermentation wird RNase T1 durch osmotischen Schock aus dem Periplasma gewonnen.

2.2.7.6.1 Periplasmaaufschluss

PE-Puffer: 20 mM Piperazin; 5 mM EDTA; pH 6,0
PES-Puffer: 20 mM Piperazin; 5 mM EDTA; 75 g (30 %) Saccharose pH 6,0

Die abzentrifugierten Zellen wurden in 250 ml PES-Puffer aufgenommen und eine Stunde auf Eis inkubiert, damit die Zellen eine hohe Konzentration an Saccharose aufnehmen. Durch schnelle Verdünnung mit dem sechsfachen Volumen an eiskaltem PE-Puffer wurden die Zellen einem osmotischen Schock ausgesetzt. Dies führt zum Aufplatzen des Periplasmas und zur Freisetzung sezernierter Proteine. Um möglichst alle Zellen aufzuschließen wurde eine Stunde lang auf Eis unter starkem Rühren inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz zentrifugiert (7000 rpm, 30 min, 4 °C, GS3) und mit dem Überstand weitergearbeitet.

2.2.7.6.2 Anionenaustauscherchromatographie

PE-Puffer A: 20 mM Piperazin; 5 mM EDTA; pH 6,0
PE-Puffer B: 20 mM Piperazin; 5 mM EDTA; 1 M NaCl
GPC-Puffer: 50 mM Ammoniumacetat; pH 5,0

Das gesamte Volumen des Periplasmaaufschlusses wurde auf eine Fractogel EMI TMAE-650 Anionenaustauschersäule bei einer Flussrate von 2,5 ml/min aufgetragen, die zuvor mit PE-Puffer B gewaschen und anschließend mit PE-Puffer A äquilibriert wurde. Bei konstanter Flussrate von 5 ml/min wurde 15 min lang mit PE-Puffer (10 % B) gewaschen, um einen Großteil der unerwünschten Proteine zu eluieren. Danach wurde über 60 min ein Salzgradient von 0-0,5 M NaCl angelegt. Bei diesem Schritt wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt. Abschließend wurde 20 min lang mit PE-Puffer B gewaschen. Von jeder zweiten Fraktion wurden je 5 μ l auf eine RNase-Testagarplatte aufgetragen, um die Fraktionen auf RNase-Aktivität zu überprüfen. Die Fraktionen, die ein positives Testergebnis zeigten, wurden vereinigt und konzentriert. Die vereinigten, RNase-positiven Fraktionen wurden wie unter 2.2.6.3.3 beschrieben einer Gelpermeationschromatographie unterzogen. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden erneut hinsichtlich ihrer RNase-Aktivität mittels RNase-Testagarplatten untersucht. RNase-positive Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert.

2.2.8 Modifikation von Proteinen

Entfaltungspuffer: 100 M Tris/HCl pH^{RT} 8,7; 2 mM EDTA, 7 M GdmCl
 Elutionspuffer: 100 M Tris/HCl pH^{15 °C} 8,0; 1 mM EDTA

2.2.8.1 Reduktion und Carboxymethylierung von RNaseT1

Um (S54G/P55N)-RNaseT1 zu entfalten, wurden die Disulfidbrücken durch Modifikation der Cysteinreste entfernt. Für die Carboxymethylierung von RNaseT1 wurde das Protein zunächst in Entfaltungspuffer vollständig entfaltet und zur Reduktion der Disulfidbrücken mit einem zehnfachen Überschuss an TCEP 90 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde Natriumiodacetat in Elutionspuffer in zehnfachem Überschuss zu TCEP zugegeben und der Ansatz 5 min im Dunkeln inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde durch zweimaliges Passieren einer NAPTM 10-Säule entfernt. Die Konzentration an reduzierter und carboxymethylierter RNaseT1 (RCM-T1) wurde durch Absorptionsmessung bestimmt. Die Stammlösung wurde in Proben zu 100 µl und 10 µM aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.8.2 Markierung der RNaseT1_{Cys} mit IAEDANS

Die entfaltete Form von RNaseT1 mit den Mutationen C2S, C6S, C10N, P39A, S54G, P55N und W59F (RNaseT1_{Cys}) wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff IAEDANS (5-(((2-Iodacetyl)amino)ethyl)amino)-naphthalin-1-sulfonsäure) markiert. Die kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit RNaseT1_{Cys} erfolgt über eine S_N2-Reaktion, wobei das Iodatom des Iodacetamidderivats als Abgangsgruppe dient und nukleophil durch das Thiolat des C-terminalen Cys103 von RNaseT1_{Cys} ersetzt wird.

Für die Markierung wurden 500 µM RNaseT1_{Cys} in 450 µl Elutionspuffer gelöst, 2 mM TCEP zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 mg (20facher Überschuss) an IAEDANS zugegeben und 3 Tage bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Überschüssiger Fluoreszenzfarbstoff wurde durch zweimaliges Passieren einer NAPTM 5- bzw. NAPTM 10-Säule entfernt und das Eluat eingengt. Die Konzentration an RNaseT1_{Cys}-AEDANS und die Markierungseffizienz wurden über Absorption bei 280 und 336 nm bestimmt.

2.2.9 Spektroskopische Charakterisierung

2.2.9.1 Probenvorbereitung und Konzentrationsbestimmung

Das Protein wurde durch Gelpermeationschromatographie über eine NAPTM 10-Säule in den Messpuffer überführt und eventuell vorhandenes Aggregat durch Zentrifugation (13 000 rpm, 4 °C, ca. 30 min) abgetrennt. Absorptionsspektren wurden von 240 nm bis 350 nm bzw. im Fall von RNaseT1_{Cys}-AEDANS von 240 nm bis 450 nm an einem Cary 100 Bio UV-VIS-Spektrophotometer aufgenommen. Als Referenz wurde der entsprechende Messpuffer eingesetzt. Die Absorptionsspektren wurden mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 100 nm/min bei einer Bandbreite von 2 nm und einer Auflösung von 0,5 nm in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Die Konzentration der Proteinlösung wurde durch

Absorptionsmessung bei 280 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. Für RNaseT1_{Cys}-AEDANS konnte der Grad der Markierung aus den relativen Konzentrationen an AEDANS (berechnet aus der Absorption bei 336 nm) und an RNaseT1_{Cys} (berechnet aus der Absorption bei 280 nm) bestimmt werden. Allerdings muss hierbei die geringe Absorption des Farbstoffs bei 280 nm berücksichtigt werden. Folgende Extinktionskoeffizienten wurden für die verschiedenen Protein-Varianten mit Hilfe des Programmes ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) bestimmt.

SlpA	$\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
SlpA L48W	$\epsilon_{280} = 6990 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
SlpA Δ IF	$\epsilon_{257} = 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
SlpA Δ IF L48W	$\epsilon_{280} = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
IF (IF-Domäne von SlpA)	$\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
IF Y81W	$\epsilon_{280} = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SlpA	$\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
<i>Enterobacter sakazakii</i> SlpA	$\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
<i>Yersinia pestis</i> SlpA	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
<i>Vibrio cholerae</i> SlpA	$\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
<i>Shewanella frigidimarina</i> SlpA	$\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
<i>Idiomarina baltica</i> SlpA	$\epsilon_{280} = 4470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
hFKBP12	$\epsilon_{280} = 9970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
apikale Domäne	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
b'-Domäne	$\epsilon_{280} = 8940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
SurA Chaperondomäne	$\epsilon_{280} = 12950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
GroEL-Chimäre	$\epsilon_{280} = 14440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
GroEL-Chimäre SS	$\epsilon_{280} = 14565 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
GroEL-Chimäre E209W	$\epsilon_{280} = 19940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
PDI-Chimäre	$\epsilon_{280} = 20400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
PDI-Chimäre SS	$\epsilon_{280} = 20525 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
PDI-Chimäre SS E306W	$\epsilon_{280} = 26025 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
SurA-Chimäre	$\epsilon_{280} = 24410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
SurA-Chimäre SS	$\epsilon_{280} = 24535 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
AEDANS	$\epsilon_{336} = 5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
AEDANS	$\epsilon_{280} = 880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
RNaseT1 _{Cys}	$\epsilon_{280} = 13410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
RNaseT1	$\epsilon_{280} = 21060 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.2.9.2 Circulardichroismusspektren

Messpuffer Fern-UV: 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5

Messpuffer Nah-UV: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5

CD-Spektren wurden an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter mit temperierbaren Küvetten bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Die Schrittweite während der Messung betrug 0,2 nm, Messgeschwindigkeit 50 nm min⁻¹, Bandbreite 1 nm und die Dämpfung 2 s. Die Spektren wurden zehnmal gemessen und gemittelt.

Fern-UV-CD-Spektren wurden von 180 bis 260 nm gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 10 μ M, die Schichtdicke 0,1 cm. Nach Korrektur um das Pufferspektrum wurden die Spektren auf die molare Elliptizität $[\Theta]_{\text{MRW}}$ pro Aminosäure normiert (Gleichung 2-1).

Nah-UV-CD-Spektren wurden von 240 bis 320 nm mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde entsprechend einer Absorption bei 280 nm von 1 gewählt und nach der Messung genau bestimmt. Nach Korrektur der Spektren um das jeweilige Pufferspektrum wurden die Nah-UV-CD-Spektren auf die molare Elliptizität $[\Theta]$ normiert (Gleichung 2-1, ohne Normierung auf Anzahl der Aminosäuren).

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}} \cdot 10} \quad \text{Gl. 2-1}$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$: molare Elliptizität pro Aminosäure in Grad $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$; Θ : gemessene Elliptizität in mGrad; c : Proteinkonzentration in M; d : Schichtdicke in cm; N_{AS} : Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

2.2.9.3 Fluoreszenzspektren

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5

Denaturierungspuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5; 8 M GdmCl oder 10 M Harnstoff

Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer in temperierbaren 1 cm Fluoreszenzrührküvetten bei 15 °C durchgeführt. Die Proteinkonzentration war abhängig vom jeweiligen Protein und betrug 1 bis 4 μM . Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260, 280 oder 295 nm mit einer Bandbreite von 3 nm. Die Emission wurde mit einer Bandbreite von 5 nm und einer Messgeschwindigkeit von 120 nm min^{-1} (Dämpfung 0,5 s) von 265, 285 oder 300 nm bis 450 nm gemessen. Für die Spektren der Komplexbildung aus verschiedenen Enzymen und RNaseT1_{Cys}-AEDANS wurden die Emissionsspektren zwischen 300 und 550 nm nach Anregung bei 295 nm gemessen. Die Spektren wurden jeweils um die Pufferfluoreszenz korrigiert.

2.2.10 Bestimmung der konformationellen Stabilität

2.2.10.1 Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5

Die thermische Denaturierung der Proteinvarianten wurde anhand des CD-Signals im Wellenlängenbereich von 210 bis 230 nm an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter mit PTC-348 WI Peltier-Element verfolgt. Die Messung erfolgte mit einer Proteinkonzentration von 1 μM (Messungen bei 210 nm) oder 4 μM , in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Heizrate betrug 60 K pro Stunde, wobei alle 0,2 K ein Messwert aufgenommen wurde, die Dämpfung betrug 8 s, die Bandbreite 1,0 nm.

Gemäß der Annahme eines Zweizustandsmodells steht der native Zustand eines Proteins ohne Intermediate mit dem denaturierten Zustand in einem Gleichgewicht (Gleichung 2-2). Die Gleichgewichtskonstante K_U der Entfaltung kann aus einer physikalischen Eigenschaft y_{obs} bestimmt werden (Gleichung 2-3). Die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_D kann mit Hilfe von Gleichung 2-4 bestimmt werden.



$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{(y_N - y_{\text{obs}})}{(y_{\text{obs}} - y_U)} \quad \text{Gl. 2-3}$$

$$\Delta G_D = -RT \ln K_U \quad \text{Gl. 2-4}$$

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 J 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 2-5). Gleichung 2-6 gibt die lineare Änderung der Messgröße des nativen und des entfalteten Proteins an.

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_D(T_M) \cdot \frac{T_M - T}{T_M} - \Delta C_p \cdot \left[T_M - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_M}\right) \right] \quad \text{Gl. 2-5}$$

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_N, m_U \cdot T \quad \text{Gl. 2-6}$$

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

Die Kombination der Gleichungen 2-3 bis 2-6 liefert Gleichung 2-7. Der Mittelpunkt des thermischen Übergangs T_M und die van't Hoff-Enthalpie ΔH_D wurden anhand Gleichung 2-7 (Privalov, 1993) durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 5.0 berechnet.

$$y(T) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot T + (y_U^0 + m_U \cdot T) \cdot \exp\left\{-\frac{\Delta H_D(T_M)}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_M}\right) - \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \left[1 - \frac{T_M}{T} + \ln\left(\frac{T_M}{T}\right)\right]\right\}}{1 + \exp\left\{-\frac{\Delta H_D(T_M)}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_M}\right) - \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \left[1 - \frac{T_M}{T} + \ln\left(\frac{T_M}{T}\right)\right]\right\}} \quad \text{Gl. 2-7}$$

$y(T)$: Messgröße, hier gemessene Elliptizität (in Grad); y_N, y_U : physikalische Eigenschaft des nativen (N) bzw. denaturierten (U) Proteins; y_N^0, y_U^0 : Werte für y_N und y_U auf $T = 0$ K extrapoliert, m_N, m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; T_M : Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs (in K); ΔH_D : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei T_M (in J mol⁻¹); ΔC_p : Änderung der molaren Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck (in J mol⁻¹ K⁻¹); T : Temperatur (in K); R : allgemeine Gaskonstante

Aus den ermittelten Werten für den Übergangsmittelpunkt T_M und die van't Hoff-Enthalpie ΔH_D kann die konformationelle Stabilität des Proteins berechnet werden (Gleichung 2-8).

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_D(T) \cdot \left(1 - \frac{T}{T_M}\right) - \Delta C_p \left[T_M - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_M}\right) \right] \quad \text{Gl. 2-8}$$

Für die Auswertung der thermischen Übergänge von SlpA und den SlpA-Homologen wurde die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p auf $8000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, für die thermischen Übergänge der IF-Domäne und von SlpA Δ IF auf $3000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ bzw auf $6000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ festgesetzt (Myers *et al.*, 1995).

Bei der Auswertung thermischer Übergänge gemäß einem Dreizustandsmodell (Beasty *et al.*, 1986) müssen die beiden Gleichgewichtskonstanten der Entfaltung K_1 und K_2 berücksichtigt werden (Gleichung 2-10).



$$K_1 = \frac{[I]}{[N]} ; K_2 = \frac{[U]}{[I]} \quad \text{Gl. 2-10}$$

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 2-11). Aus den Gleichungen 2-10 und 2-11 ergibt sich dann Gleichung 2-12 für die Berechnung des Anteils an denaturiertem Protein U.

$$[P] = [N] + [I] + [U] \quad \text{Gl. 2-11}$$

$$[U] = \frac{K_1 \cdot K_2 \cdot [P]}{K_1 \cdot K_2 + K_1 + 1} \quad \text{Gl. 2-12}$$

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 2-13), wobei z die optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem denaturierten Zustand angibt.

$$y_{\text{app}} = [X_U] + z \cdot [X_I]; \quad [X_U] = \frac{[U]}{[P]}; \quad [X_I] = \frac{[U]}{K_2 \cdot [P]} \quad \text{Gl. 2-13}$$

Aus der Kombination der Gleichungen 2-10 bis 2-13 erhält man Gleichung 2-14, welche die Entfaltung anhand der Messgröße $y(T)$ in Abhängigkeit von der Temperatur beschreibt. Die Berechnung der Schmelztemperaturen für die beiden Domänen sowie der van't Hoff-Enthalpien erfolgte gemäß Gleichung 2-14. Die Auswertung wurde durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 5.0 durchgeführt.

$$y(T) = y_N^0 + m_N T + \frac{1}{1 + K_2 + \frac{1}{K_1}} \cdot (K_2 + z) \cdot [y_N^0 + m_U T - (y_N^0 + m_N T)] \quad \text{Gl. 2-14}$$

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

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

$y(T)$: Messgröße, gemessene Elliptizität in Grad; y_N, y_U : Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins; y_N^0, y_U^0 : Werte für y_N und y_U auf $T = 0$ K extrapoliert; m_N, m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; $T_{M,1}, T_{M,2}$: Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs der 1. Domäne ($T_{M,1}$) bzw. des Übergangs der 2. Domäne ($T_{M,2}$) (in K); $\Delta H_{D,1}, \Delta H_{D,2}$: van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei $T_{M,1}$ bzw. $T_{M,2}$ (in $J \text{ mol}^{-1}$); $\Delta C_{p,1}, \Delta C_{p,2}$: Differenz der molaren Wärmekapazitäten des denaturierten und nativen Proteins der bei niedriger T entfaltenden ($\Delta C_{p,1}$) bzw. der bei hoher T entfaltenden Domäne ($\Delta C_{p,2}$) (in $J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); z : optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem entfalteten 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 (Privalov, 1993) kann die konformationelle Stabilität des Proteins mit Hilfe von Gleichung 2-8 berechnet werden. Für die Parvulindomänen von SurA wurde ein ΔC_p von $8000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, für die IF-Domäne ein ΔC_p von $3000 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ angenommen.

2.2.10.2 Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5

Denaturierungspuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5; 8 M GdmCl oder 10 M Harnstoff

Für die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung wurden GdmCl und Harnstoff eingesetzt. Die jeweilige Konzentration an Denaturierungsmittel wird dabei aus der Differenz der Brechungsindices des Puffers in Gegenwart und Abwesenheit von GdmCl bzw. Harnstoff berechnet (Pace, 1986) (Gleichung 2-15 und 2-16).

$$[\text{GdmCl}] = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot (\Delta n)^2 - 91,6 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2-15}$$

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot (\Delta n)^2 + 185,56 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2-16}$$

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

Die Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltungsübergänge wurden sowohl anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals als auch anhand der Änderung des CD-Signals verfolgt. Wurde Fluoreszenz als Messsonde verwendet, wurden die Entfaltungsübergänge an einem Jasco-Fluoreszenzspektrophotometer FP-6500 mit Proteinkonzentrationen von 0,5 bis 4 μM in temperierbaren 1 cm-Fluoreszenzrührküvetten gemessen. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260, 280 nm oder 295 nm mit einer Bandbreite von 3 nm. Die Fluoreszenzemission wurde bei der für die Entfaltung des jeweiligen Proteins spezifischen Wellenlänge mit einer Bandbreite von 5 nm gemessen. Wurde die Entfaltung anhand der Änderung des CD-Signals verfolgt, war das Messgerät ein Jasco J-600 Spektropolarimeter. Die Messung erfolgte mit einer Proteinkonzentration von 4 μM bei 217 nm (PDI Chimäre)

oder bei 222 nm (GroEL-Chimäre) mit einer Schichtdicke von 1 cm, einer Bandbreite von 1 nm und einer Dämpfung von 8 s. Die Auswertung erfolgte gemäß eines Zweizustandsmodells oder im Fall der PDI Chimäre SS gemäß eines Dreizustandsmodells.

Für die Auswertung der experimentellen Daten aus den CD- und Fluoreszenzmessungen nach dem Zweizustandsmodell (Tanford, 1968) wird das lineare Extrapolationsmodell angenommen, welches die lineare Abhängigkeit der Proteinstabilität von der Konzentration an Denaturierungsmittel beschreibt (Gleichung 2-17).

$$\Delta G_D = \Delta G_D^0 + m \cdot [D] \quad \text{Gl. 2-17}$$

ΔG_D : freie Enthalpie der Entfaltung (in J mol⁻¹); ΔG_D^0 : freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in J mol⁻¹); [D]: Denaturierungsmittelkonzentration (in M); m : Kooperativität des Übergangs (in J mol⁻¹ M⁻¹)

Für die spektroskopischen Eigenschaften des nativen (N) und des denaturierten Proteins (U) wird eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration an Denaturierungsmittel angenommen (Gleichung 2-18).

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_{N,U} \cdot [D] \quad \text{Gl. 2-18}$$

y_N, y_U : Signal des gefalteten (N) und entfalteten Proteins (U); y_N^0, y_U^0 : spektroskopische Eigenschaft des nativen bzw. entfalteten Proteins in Abwesenheit des Denaturierungsmittels; m_N, m_U : Steigung der Basislinie des nativen bzw. denaturierten Proteins; [D]: Denaturierungsmittelkonzentration (in M)

Nach Kombination der Gleichungen 2-3, 2-4, 2-17 und 2-18 ergibt sich Gleichung 2-19 (Santoro & Bolen, 1988), welche die Entfaltung anhand der Messgröße y_{obs} in Abhängigkeit von der Konzentration an Denaturierungsmittel beschreibt. Der Angleich an die experimentellen Daten erfolgte durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 5.0.

$$y([D]) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot [D] + (y_U^0 + m_U \cdot [D]) \cdot \exp\left[-\frac{\Delta G_D^0 + m_U \cdot [D]}{RT}\right]}{1 + \exp\left[-\frac{\Delta G_D^0 + m_U \cdot [D]}{RT}\right]} \quad \text{Gl. 2-19}$$

$y([D])$: Messgröße bei Vorliegen einer Mischung von N und U; y_N, y_U : Signal des gefalteten (N) und entfalteten Proteins (U), wobei y^0 jeweils die auf 0 M Denaturierungsmittel extrapolierten Werte angibt; m_N, m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; ΔG_D^0 : freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in J mol⁻¹); [D]: Denaturierungsmittelkonzentration (in M); R: allgemeine Gaskonstante; T: Temperatur (in K)

Entfaltungsübergänge mit einem biphasischen Verlauf wurden gemäß einem Dreizustandsmodell (vgl. Gleichung 2-9) ausgewertet. Für die Entfaltung gelten damit die Gleichungen 2-9 bis 2-14, die zu Gleichung 2-20 kombiniert werden können. Anhand dieser Gleichung können die freien Enthalpien der Entfaltung in Abwesenheit des

Denaturierungsmittels und die Kooperativitätsparameter m für die beiden Übergänge bestimmt werden.

$$y([D]) = y_N^0 + m_N \cdot [D] + \frac{1}{1 + K_2 + \frac{1}{K_1}} \cdot (K_2 + z) \cdot (y_U^0 + m_U \cdot [D]) - (y_N^0 + m_N \cdot [D]) \quad \text{Gl. 2-20}$$

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

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

$y([D])$: Meßgröße, gemessene Fluoreszenz; y_N, y_U : Signal des gefalteten (N) und entfalteten Proteins (U), wobei y^0 jeweils die auf 0 M Denaturierungsmittel extrapolierten Werte angibt; m_N, m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; $\Delta G_{D,1}^0, \Delta G_{D,2}^0$: 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

2.2.11 Experimente zur Kinetik der Proteinfaltung

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5

Denaturierungspuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5; 10 M Harnstoff

Langsame Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken wurden nach manueller Mischung durch den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzänderung an einem Jasco FP-6500-Fluoreszenzspektrophotometer verfolgt. Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 1 μM in temperierbaren Fluoreszenzrührküvetten der Schichtdicke 1 cm bei 15 °C durchgeführt. Die Ent- und Rückfaltung wurden dabei durch 20fache Verdünnung von nativem bzw. denaturiertem Protein (in 8 M Harnstoff) in verschiedene 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. Die Auswertung der Daten erfolgte durch Angleich mono- oder biexponentieller Funktionen (Gleichung 2-21) mit Hilfe des Programms Grafit 5.0.

$$F(t) = F_0 + \sum_{i=0}^n A_i \cdot e^{-k_i \cdot t} \quad k_i = 1/\tau_i \quad \text{Gl. 2-21}$$

$F(t)$: Fluoreszenzsignal zur Zeit t ; F_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 einigen Fällen, muss berücksichtigt werden, dass die Fluoreszenz nicht zeitlich konstant ist, z. B. wenn es bei langsamen Reaktionen zu lichtinduzierter Schädigung kommt. Derartige Veränderungen führen häufig zu linearen Veränderungen des Endwerts und können durch

Erweiterung von Gleichung 2-21 durch einen linearen Summanden ($k_2 \cdot t$) berücksichtigt werden.

Um die mikroskopischen Raten und kinetischen m -Werte zu erhalten, wurde die Abhängigkeit der apparenten Ratenkonstanten von dem Denaturierungsmittel nach einem linearen Zwei-Zustandsmodell analysiert (Kiefhaber, 1995).

$$\lambda = k_{\text{NU}}^0 \cdot e^{m_{\text{NU}}[\text{D}]} + k_{\text{UN}}^0 \cdot e^{m_{\text{UN}}[\text{D}]} \quad \text{Gl. 2-22}$$

λ : apparente Geschwindigkeitskonstante; $k_{\text{NU}}^0, k_{\text{UN}}^0$: extrapolierte Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltung bei 0 M Denaturierungsmittel; $m_{\text{NU}}, m_{\text{UN}}$: kinetische Kooperativitätsparameter der Ent- bzw. Rückfaltung (in M^{-1}); [D]: Konzentration des Denaturierungsmittels

Da am Übergangsmittelpunkt die Ent- und Rückfaltungsraten identisch sind, lässt sich aus den mikroskopischen Raten und den kinetischen m -Werten der Kooperativitätsparameter m und der Übergangsmittelpunkt der Entfaltung mit Hilfe von Gleichung 2-23 und 2-24 berechnen.

$$m = RT \cdot (m_{\text{NU}} - m_{\text{UN}}) \quad \text{Gl. 2-23}$$

$$[\text{D}]_{1/2} = \frac{\ln(k_{\text{NU}} / k_{\text{UN}})}{(m_{\text{UN}} - m_{\text{NU}})} \quad \text{Gl. 2-24}$$

m : Kooperativitätsparameter des Gleichgewichtsüberganges; $k_{\text{NU}}, k_{\text{UN}}$: extrapolierte Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (in s^{-1}); $m_{\text{NU}}, m_{\text{UN}}$: kinetische Kooperativitätsparameter der Ent- bzw. Rückfaltung (in M^{-1}); $[\text{D}]_{1/2}$: Denaturierungsmittelkonzentration am Übergangsmittelpunkt (in M); T : Temperatur (in K); R : allgemeine Gaskonstante (in $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

Schnelle Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken wurden mit einer Proteinkonzentration von 1 μM bei 15 °C an einem Applied Photophysics DX.17MV *sequential stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die Ent- bzw. Rückfaltung wurde durch Verdünnung des nativen bzw. denaturierten Proteins (in 8 M Harnstoff) in Puffer mit unterschiedlichen Harnstoff-Konzentrationen initiiert. Die Kinetiken wurden anhand der Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 330 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Die Bandbreite des Anregungsspalts betrug 10 nm, die Schichtdicke der Beobachtungszelle 2 mm. Streu- und Fluoreszenzlicht unterhalb von 330 nm wurde durch eine 5 mm-Küvette vor dem Photomultiplier absorbiert, die mit einer 10 mM cGMP-Lösung pH 1.5 gefüllt war. Für jede Harnstoffkonzentration wurden zehn Einzelmessungen durchgeführt, gemittelt und nach Gleichung 2-21 analysiert.

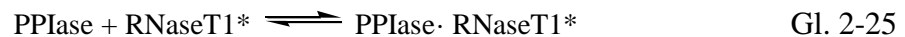
2.2.12 Energietransfer auf RNaseT1_{Cys}-AEDANS und Kinetik der Assoziation

Messpuffer: 100 mM Tris/HCl pH^{15 °C} 8,0; 2 M NaCl

2.2.12.1 Gleichgewichtstitrationen

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D des Komplexes aus RNaseT1_{Cys}-AEDANS und den verschiedenen Proteinvarianten wurden Fluoreszenztitrations an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrophotometer durchgeführt. 1 μ M RNaseT1_{Cys}-AEDANS wurde mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Bindungspartners (0 - 15 μ M) in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 titriert. Die Messungen wurden bei 15 °C und einer Dämpfung von 0,5 s in temperierbaren Fluoreszenzrührküvetten der Schichtdicke 1 cm durchgeführt. Als Sonde diente die Zunahme der Akzeptorfluoreszenz bei 475 nm (Bandbreite 5 nm) nach Anregung bei 295 nm (Bandbreite 3 nm). Für die Fluoreszenztitration mit SlyD D101W und SlpA Y81W diente die Abnahme der Donorfluoreszenz bei 328 nm (Bandbreite 5 nm) nach Anregung bei 295 nm (Bandbreite 3 nm) als Sonde.

Bei der Bindung der verschiedenen Proteinvarianten an RNaseT1_{Cys}-AEDANS (T1*) gilt folgendes Gleichgewichtsschema:



Die Dissoziationskonstante K_D berechnet sich dann nach Gleichung 2-26:

$$K_D = \frac{[\text{PPIase}] \cdot [\text{T1}^*]}{[\text{PPIase} \cdot \text{T1}^*]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad \text{Gl. 2-26}$$

K_D : Dissoziationskonstante (in M); k_{on} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (in $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$); k_{off} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (in s^{-1}); [PPIase]: Konzentration an freier PPIase (in M); [T1*]: Konzentration an freier RNaseT1_{Cys}-AEDANS (in M); [PPIase·T1*]: Konzentration an PPIase-RNaseT1_{Cys}-AEDANS-Komplex (in M)

Unter Berücksichtigung der Massenerhaltung, d.h. $[\text{PPIase}] = [\text{PPIase}]_0 - [\text{PPIase} \cdot \text{T1}^*]$ und $[\text{T1}^*] = [\text{T1}^*]_0 - [\text{PPIase} \cdot \text{T1}^*]$ (wobei $[\text{PPIase}]_0$ und $[\text{T1}^*]_0$ die Gesamtkonzentration an PPIase bzw. RNaseT1_{Cys}-AEDANS bezeichnen) ergibt sich aus Gleichung 2-26 die Konzentration des PPIase-RNaseT1_{Cys}-AEDANS-Komplexes.

$$[\text{PPIase} \cdot \text{T1}^*] = \frac{[\text{PPIase}]_0 + [\text{T1}^*]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([\text{PPIase}]_0 + [\text{T1}^*]_0 + K_D)^2}{4} - [\text{PPIase}]_0 [\text{T1}^*]_0} \quad \text{Gl. 2-27}$$

Für die Fluoreszenz von RNaseT1_{Cys}-AEDANS gilt:

$$F = F_0 + \Delta F \cdot \frac{[\text{PPIase} \cdot \text{T1}^*]}{[\text{T1}^*]_0} \quad \text{Gl. 2-28}$$

F: gemessene Fluoreszenz; F_0 : Fluoreszenz des freien RNaseT1_{Cys}-AEDANS; ΔF : maximale Fluoreszenzänderung bei vollständiger Bindung

Durch Kombination von Gleichungen 2-27 und 2-28 ergibt sich Gleichung 2-29, die an die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration angepasst werden kann, um Werte für die Dissoziationskonstante K_D zu erhalten.

$$F = F_0 + \frac{\Delta F}{[T1^*]_0} \left(\frac{[PPIase]_0 + [T1^*]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([PPIase]_0 + [T1^*]_0 + K_D)^2}{4} - [PPIase]_0 [T1^*]_0} \right) \quad \text{Gl. 2-29}$$

2.2.12.2 Kinetik der Assoziation mit RNaseT1_{Cys}-AEDANS

Die Kinetik der Komplexbildung wurde mit einem Applied Photophysics DX.17MV *sequential stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer ebenfalls mittels FRET verfolgt. Dafür wurde 0,5 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS mit den jeweiligen Bindungspartnern 1:1 gemischt und die Änderung der integralen Fluoreszenz des Akzeptors oberhalb von 450 nm (Filter: *p*-Nitroanilin) nach Anregung des Donors bei 280 nm verfolgt. Die Bandbreite des Anregungspalts betrug jeweils 10 nm, die Schichtdicke der Beobachtungszelle 2 mm. Streulicht und Fluoreszenzlicht unterhalb von 450 nm wurden durch eine 5 mm-Küvette, gefüllt mit 10 mM *p*-Nitroanilin (in 100 % Ethanol), vor dem Photomultiplier absorbiert. Es wurden zehn einzelne Kinetiken gemessen, gemittelt und durch Angleich einer monoexponentiellen Funktion ausgewertet (Gleichung 2-21) wodurch die Amplituden und Raten der Reaktion bestimmt wurden. Der Amplitudenverlauf in Abhängigkeit der Titrandkonzentration kann entsprechend einer Gleichgewichtstitration analysiert werden um die Dissoziationskonstante K_D der beiden Reaktionspartner zu bestimmen (2.2.12.1, Gleichung 2-29).

2.2.13 Katalyse der prolinlimitierten Proteinfaltung

2.2.13.1 Messung der katalysierten Rückfaltung von RCM-T1 durch Prolylisomerasen

Messpuffer: 100 mM Tris/HCl pH^{15 °C} 8,0; 2 M NaCl

Zur Untersuchung der Prolylisomeraseaktivität der PPIase-Varianten bei der Katalyse einer prolinlimitierten Proteinfaltungsreaktion wurde die reduzierte und carboxymethylierte Form der (S54G/P55N) Ribonuclease T1 (RCM-T1) als Substrat verwendet (Schönbrunner *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1996). RCM-T1 liegt in Puffer entfaltet vor. Die Rückfaltung in eine nativ-ähnliche Struktur kann durch Erhöhung der Ionenstärke (≥ 2 M NaCl) induziert werden (Pace & Grimsley, 1988). Im nativen Zustand besitzt RCM-T1 eine *cis*-Peptidbindung zwischen Tyr38 und Pro39, deren *trans/cis*-Isomerisierung während der Rückfaltung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Kiefhaber *et al.*, 1990a; Mayr *et al.*, 1996). Im entfalteten Protein liegen lediglich 15 % der Moleküle in der U^{39c}-Konformation vor, besitzen also die zur Faltung notwendige *cis*-Konformation an Pro39. Dieser Anteil faltet innerhalb weniger Sekunden und damit in der Totzeit der manuellen Mischung. Die Faltung

der verbleibenden 85 % ist durch die *trans/cis*-Isomerisierung an Pro39 limitiert und zeigt einen langsamen monoexponentiellen Verlauf.

Die Rückfaltung von RCM-T1 wurde in temperierbaren, verspiegelten 1 cm-Halbmikro-Fluoreszenzrührküvetten an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer bei 15 °C gemessen. Die Messung wurde durch Zugabe von 0,1 µM RCM-T1 gestartet. Da RNaseT1 mit Trp59 ein starkes Fluorophor besitzt, kann die Rückfaltung nach Anregung bei 268 nm (Bandbreite 3 nm) gut über die Fluoreszenzzunahme bei 320 nm (Bandbreite 5 nm) in Ab- oder Anwesenheit variierender Prolylisomerasekonzentrationen verfolgt werden. Die Rückfaltungskinetiken wurden nach Gleichung 2-30 mit dem Programm Grafit 5.0 ausgewertet.

$$[F^*](t) = A \cdot \left(1 - e^{-k_{app}t}\right) + [F^{39t}]_0 \quad \text{Gl. 2-30}$$

$[F^*]$: Konzentration von RCM-T1 in nativ-ähnlicher Struktur (M); t: Zeit (s); A: Amplitude (Differenz der Fluoreszenz von $[F^*]$ und $[F^{39t}]_0$); $[F^{39t}]_0$: Konzentration von ungefalteter RCM-T1 mit Prolin 39 in *trans*-Konformation zum Zeitpunkt $t = 0$ s (M); k_{app} : apparente Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (s^{-1})

Die apparente Geschwindigkeitskonstante k_{app} in Gegenwart einer Prolylisomerase besteht aus den Beiträgen der enzymkatalysierten (k_{kat}) und der unkatalysierten (k_0) Reaktion (Gl. 2-31).

$$k_{app} = k_{kat} + k_0 \quad \text{Gl. 2-31}$$

Zur Beschreibung der katalytischen Effizienz eines Enzyms wird die Spezifitätskonstante k_{kat}/K_M verwendet. Für eine enzymkatalysierte Reaktion gilt Gleichung 2-32.

$$v = k_0 \cdot [S]_0 + k_{kat} \cdot [E]_0 \cdot \frac{[S]_0}{[S]_0 + K_M} \quad \text{Gl. 2-32}$$

Sofern die Substratkonzentration weit unter der Michaelis-Konstanten K_M liegt, kann k_{kat}/K_M aus der apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_{app} und der eingesetzten Prolylisomerasekonzentration bestimmt werden, wenn die Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Rückfaltungsreaktion bekannt ist. Für Substratkonzentrationen weit unterhalb der Michaelis-Konstanten K_M vereinfacht sich Gleichung 2-32 zu Gleichung 2-33.

$$v = k_0 \cdot [S]_0 + k_{kat} \cdot [E]_0 \cdot \frac{[S]_0}{K_M} \quad \text{Gl. 2-33}$$

$$v = k_{app} \cdot [S]_0 \quad \text{Gl. 2-34}$$

Mit Hilfe von Gleichung 2-33 und 2-34 ergibt sich für die apparente Geschwindigkeitskonstante k_{app} Gleichung 2-35:

$$k_{\text{app}} = k_0 + \frac{k_{\text{kat}}}{K_M} \cdot [E]_0 \quad \text{Gl. 2-35}$$

Die Spezifitätskonstante k_{kat}/K_M wird durch Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten Reaktion gegen die Prolylisomerasekonzentration nach linearer Regression (Grafit 5.0) erhalten.

2.2.13.2 Messung der katalysierten Rückfaltung von N2 durch Prolylisomerasen

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,0

Die globuläre N2-Domäne des Gen-3-Proteins des fd-Phagen stellt ein weiteres Substratprotein zur Untersuchung der prolinlimitierten Proteinfaltung dar. Im nativen Zustand besitzt N2 ein *cis/trans*-Gleichgewicht an Pro161, das entscheidend für Stabilität und Faltung des Proteins ist (Jakob & Schmid, 2008). Bei der Rückfaltung von N2 ist die *trans/cis*-Isomerisierung dieser Prolylbindung vor dem Pro161 für 90 % aller Moleküle der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Um die Substratspezifität von Prolylisomerasen hinsichtlich Proteinsubstraten untersuchen zu können, wurde eine Bibliothek von N2-Varianten mit allen natürlichen Aminosäuren vor Pro161 (Xaa-Pro-N2-Varianten) erstellt (Jakob & Schmid, 2009; Jakob *et al.*, 2009). Aus dieser Bibliothek wurden verschiedene N2-Varianten untersucht, die an der P1-Position (Xaa), Aminosäuren mit unterschiedlichem chemischem Charakter besitzen (Phe, Leu, Asp, Lys, Ala). Die N2-Domäne besitzt mit Trp181 ein starkes Fluorophor, somit kann die Rückfaltung nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 3 nm) über den Anstieg der Fluoreszenz bei 340 nm (Bandbreite 5 nm) beobachtet werden. Der Verlauf der Rückfaltung wurde in temperierbaren 1 cm-Fluoreszenzrührküvetten an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer, mit einer Dämpfung von 0.5 s bei 15 °C gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe der entsprechenden N2-Variante (Endkonzentration 0,33 µM) in Abwesenheit oder Anwesenheit variierender Prolylisomerasekonzentrationen gestartet. Die Isomerisierungsreaktion lässt sich als Reaktion pseudo-erster Ordnung und demzufolge wie in 2.2.13.1 beschrieben analysieren.

2.2.13.3 Michaelis-Menten-Kinetik der katalysierten Faltung von RCM-T1

Messpuffer: 100 mM Tris/HCl pH^{15 °C} 8,0; 2 M NaCl

Zur Untersuchung der Enzymkinetik der katalysierten Faltung, wurden Faltungskinetiken in Gegenwart einer konstanten Prolylisomerasekonzentration gemessen. In diesen Experimenten, ist sowohl die spontane als auch die katalysierte Faltung des Substratproteins zu beobachten. Der Anteil, der unkatalysierten Faltung steigt linear mit steigender Substratkonzentration. Daher wurden die Faltungsexperimente nur bei Substratkonzentrationen unterhalb von 20 µM durchgeführt. Die Geschwindigkeit der katalysierten Faltung, wurde stark vereinfacht aus der Anfangssteigung der Faltungskinetiken bestimmt. Kofron *et al.* entwickelten eine Methode, den Beitrag der spontanen als auch der enzymkatalysierten Isomerisierung in Peptiden zu

bestimmen (Kofron *et al.*, 1991). Diese Methode wurde für die Analyse der katalysierten Faltung von RCM-T1 angepasst (Zarnt *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 1998) und kann somit zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit aus dem Kurvenverlauf der Faltungskinetiken herangezogen werden. Der Faltungsverlauf in Gegenwart einer Prolylisomerase wird durch Gleichung 2-36 beschrieben.

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_0 \cdot [S]_0 - k_{\text{kat}} \cdot [E]_0 \cdot \frac{[S]_0}{[S]_0 + K_M} \quad \text{Gl. 2-36}$$

$d[S]/dt$: Faltungsgeschwindigkeit des entfalteten Substrats; $[S]$: Enzymkonzentration; K_M : Michaeliskonstante; k_{kat} : Umsatzzahl; $-k_0[U]$: Beitrag der spontanen Faltung; $-k_{\text{kat}}[E]_0[S]/([S]+K_M)$: Beitrag der katalysierten Faltung

Mit Hilfe des Programmes Scientist wurden die Faltungskinetiken analysiert. Unter Berücksichtigung, dass nur 85 % der RCM-T1-Moleküle ein nicht-natives *trans*-Pro39 besitzen ($[S] = 0.85 \cdot [\text{RCM-T1}]$) und die Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Faltung $k_0 = 0.0018 \text{ s}^{-1}$ konstant gehalten werden kann, ergaben sich durch Auswertung der experimentellen Daten anhand Gleichung 2-36, die k_{kat} - und K_M -Werte, die für die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit nach Gleichung 2-37 notwendig sind.

$$v_0 = k_{\text{kat}} \cdot [E]_0 \cdot \frac{[S]_0}{[S]_0 + K_M} \quad \text{Gl. 2-37}$$

2.2.14 Katalyse der Prolylisomerisierung in kurzen Peptiden

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5

Anhand des proteasefreien Prolylisomerasetestes kann die Aktivität der Prolylisomerase gegenüber kurzen Peptiden untersucht werden. Dafür wurden Tetrapeptide der Form Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNa mit unterschiedlicher P1-Position (Ala, Leu, Phe, Gly und Lys) verwendet. In wässriger Lösung liegt der Gleichgewichtsanteil des *cis*-Isomers bei etwa 10 %. Dieser Anteil kann durch die Aufnahme des Tetrapeptids in wasserfreiem Trifluorethanol mit 0,55 M LiCl auf 50-70 % erhöht werden. Befindet sich die Prolylbindung zum großen Teil in der *cis*-Form, kommt es aufgrund der räumlichen Nähe des Fluorophors Aminobenzoyl und des Fluoreszenzlöschers *p*-Nitroanilin zu einer starken Löschung der Fluoreszenz. Durch Überführen des Peptids in eine wässrige Lösung wird die *cis/trans*-Isomerisierung initiiert, welche anhand der Fluoreszenzzunahme verfolgt werden kann (Zoldák *et al.*, 2009a).

Der Verlauf der Isomerisierung wurde in temperierbaren 1 cm-Fluoreszenzrührküvetten an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer bei 15 °C gemessen. Je nach Tetrapeptid und Proteinvariante wurden nano- bis mikromolare Konzentrationen der Prolylisomerase vor der Messung 3 min lang in der Küvette temperiert. Zum Start des Versuchs wurden 3 µM Tetrapeptidlösung zugegeben (5 µl einer 750 µM Stammlösung). Die *cis/trans*-Isomerisierung wurde anhand der Zunahme der Fluoreszenz bei 416 nm (Bandbreite 5 nm) nach Anregung

bei 316 nm (Bandbreite 3 nm) verfolgt. Die Isomerisierungsreaktion lässt sich als Reaktion pseudo-erster Ordnung und demzufolge mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion analysieren (Gleichung 2-21).

2.2.15 Untersuchung der Chaperonaktivität von Prolylisomerasen

Messpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH^{15 °C} 8,0

Citratsynthase: 30 μM in 50 mM Tris/HCl, pH^{15 °C} 8,0; 20 mM DTE; 6 M GdmCl

Zur Untersuchung der Chaperonaktivität der Proteinvarianten wurde chemisch denaturierte, zur Aggregation neigende Citratsynthase als Substrat verwendet (Buchner *et al.*, 1998). Die Citratsynthase wurde vor Beginn des Versuchs in 100 mM Tris/HCl, pH^{15 °C} 8,0, 6 M GdmCl, 20 mM DTE mindestens eine Stunde lang entfaltet. Um die Aggregation zu verfolgen wurde die Citratsynthase 200-fach verdünnt (Endbedingungen: 0,15 μM Citratsynthase, 100 mM Tris/HCl, pH^{15 °C} 8,0, 30 mM GdmCl, 0,1 mM DTE) und der zeitliche Verlauf der Streulichtintensität bei 360 nm in An- und Abwesenheit variierender Konzentrationen an Prolylisomerase mit einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer bei 15 °C verfolgt. Die Anregungsbandbreite betrug 1 nm, die Emissionsbandbreite 3 nm und die Dämpfung 0,5 s. Die Auswertung erfolgte qualitativ durch Vergleich der Verläufe der Streulichtintensität.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Die Prolylisomerase SlpA

Die cytoplasmatischen Peptidylprolylisomerasen (PPIasen) SlyD und SlpA aus *E. coli* gehören zur Familie der FK506-Bindungsproteine (FKBP). Im Gegensatz zu der PPIase hFKBP12 haben beide Isomerasen eine zusätzliche Domäne, die in die FKBP-Domäne inseriert ist. Diese Domäne wird als *insertion-in-flap*-Domäne (IF-Domäne) bezeichnet. SlyD und auch hFKBP12 sind hochaktive Prolylisomerasen, die in der Lage sind die *cis/trans*-Prolylisomerisierung in Tetrapeptiden zu katalysieren. Diese Tetrapeptide werden im aktiven Zentrum der FKBP-Domäne gebunden und umgesetzt. Die katalytische Aktivität von SlpA für die Isomerisierung in Tetrapeptiden ist deutlich niedriger als für SlyD und hFKBP12 (Hottenrott *et al.*, 1997). SlyD ist nicht nur eine hochaktive Prolylisomerase sondern auch ein effizienter Faltungshelfer für die prolinlimitierte Rückfaltung von Proteinen. Zum heutigen Zeitpunkt ist bekannt, dass die IF-Domäne für die hohe Aktivität von SlyD als Faltungsenzym essentiell ist. hFKBP12, in dem die IF-Domäne fehlt, zeigt eine sehr geringe Aktivität für die prolinlimitierte Proteinrückfaltung. Obwohl SlpA genau wie SlyD eine Chaperondomäne besitzt, ist dieses Protein ein sehr ineffizienter Faltungskatalysator. Da über SlpA bisher kaum Informationen vorhanden sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Prolylisomerase SlpA hinsichtlich ihrer Stabilität und Funktionalität genauer untersucht. In Zusammenarbeit mit Dr. Michael Kovermann (Fachgruppe Biophysik, Universität Halle) konnte mittels NMR-Spektroskopie die Struktur von SlpA gelöst werden, die möglicherweise Aufschlüsse über die im Vergleich zu SlyD so geringe Aktivität geben kann. Ein Vergleich der Funktionalität von SlpA mit der aktiven Prolylisomerase SlyD soll helfen, die Funktionsprinzipien von Faltungshelferproteinen besser zu verstehen.

3.1.1 Die Ursache der geringen Aktivität von SlpA liegt nicht in der Tertiärstruktur begründet

SlyD und SlpA besitzen 28 % Sequenzidentität und 44 % Sequenzähnlichkeit. Um die Struktur des Gesamtproteins SlpA zu lösen, wurde eine $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ markierte Proteinprobe hergestellt. Die Zuordnung der Proteinrückgratsignale und die Strukturberechnungen wurden von Dr. Michael Kovermann durchgeführt. SlpA ist wie auch SlyD aus zwei Domänen aufgebaut (Abbildung 3-1a). Die FKBP-Domäne ist der SlyD-FKBP-Domäne strukturell sehr ähnlich. Es können nur geringe Unterschiede beobachtet werden. Die Faltblattstränge β_3 und β_4 , die in hFKBP12 und SlyD vorhanden sind, liegen nicht in allen berechneten SlpA-Strukturen vollkommen strukturiert vor. Auch die C-terminale α -Helix fehlt in SlpA. Diese α -Helix fehlt jedoch ebenfalls in hFKBP12. Die IF-Domänen von SlyD und SlpA unterscheiden sich ebenfalls nur geringfügig. Helix α_2 ist in SlpA länger ausgebildet als in SlyD. In einigen der energieärmsten Strukturen von SlpA ist Faltblattstrang β_7 nicht

Phe99 in hFKBP12, innerhalb des LXF/VXF-Motivs, Abbildung 3-1c). Alle drei essentiellen Reste sind innerhalb der FKBP-Domäne von SlpA ähnlich positioniert wie in SlyD (Abbildung 3-1b). Auffällig ist, dass in SlpA innerhalb des AXG-Motives anstelle eines Tyrosinrestes, wie bei SlyD und hFKBP12, ein Phenylalaninrest lokalisiert ist. Die Vermutung, dass die geringere Prolylisomeraseaktivität von SlpA in dem Fehlen der OH-Gruppe an dieser Position begründet liegt, konnte durch Substitutionsexperimente widerlegt werden. Von Dr. C. Scholz (Roche Diagnostics, Penzberg) wurden zahlreiche solcher Substitutionen durchgeführt und ihre Auswirkungen auf die Katalyse untersucht. Dabei wurden an Positionen, von denen bekannt ist, dass sie innerhalb von SlyD und hFKBP12 essentiell sind für Katalyse und Bindung, die entsprechenden in SlyD vorkommenden Aminosäuren in SlpA eingeführt. Insgesamt konnte durch diese Substitutionsexperimente keine Steigerung der Prolylisomeraseaktivität erzielt werden (Dr. C. Scholz, mündliche Informationen). Dies zeigt, dass es zwar relativ einfach ist, die Aktivität von Enzymen durch Substitution von katalytisch essentiellen Resten zu inaktivieren, jedoch ist es bisher in den wenigsten Fällen gelungen, Enzymaktivität zu steigern oder gar neu zu generieren (Weininger *et al.*, 2010). Um die Funktion von SlpA besser zu verstehen, wurden verschiedene SlpA-Homologe hinsichtlich ihrer Stabilität und Aktivität charakterisiert.

3.1.2 Gute Chaperoneigenschaften und geringe Isomeraseaktivität sind hochkonserviert in allen SlpA-Proteinen

Eine Strategie essentielle Reste des aktiven Zentrums zu identifizieren ist es, vermutlich wichtige Seitengruppen durch Aminosäuresubstitutionen zu verändern und die Auswirkung auf die Katalyse zu analysieren. Eine zweite Strategie essentielle katalytische Reste ausfindig zu machen, ist die Untersuchung von homologen Proteinen aus anderen Organismen. Dadurch können homologe Proteine identifiziert werden, die eine höhere Aktivität für die Prolylisomerisierung und eine höhere Faltungsaktivität aufweisen. Anhand eines Sequenzvergleichs können dann mögliche, dafür verantwortliche AS identifiziert werden. Von C. Scholz (Roche Diagnostics, Penzberg) wurden für solch ein Vorgehen, sechs SlpA-Proteine aus verschiedenen Organismen zur Verfügung gestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Proteine thermodynamisch charakterisiert und hinsichtlich ihrer Isomeraseaktivität, Faltungshelferaktivität und Chaperoneigenschaften untersucht. Ziel war es, homologe SlpA-Proteine zu identifizieren, welche höhere Isomeraseaktivität besitzen als *E. coli* SlpA und durch einen Vergleich der Sequenzen, Rückschlüsse auf die Ursache der geringen Isomeraseaktivität von *E. coli* SlpA zu ermöglichen. Der Sequenzvergleich der verschiedenen SlpA-Proteine und von *E. coli* SlyD ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

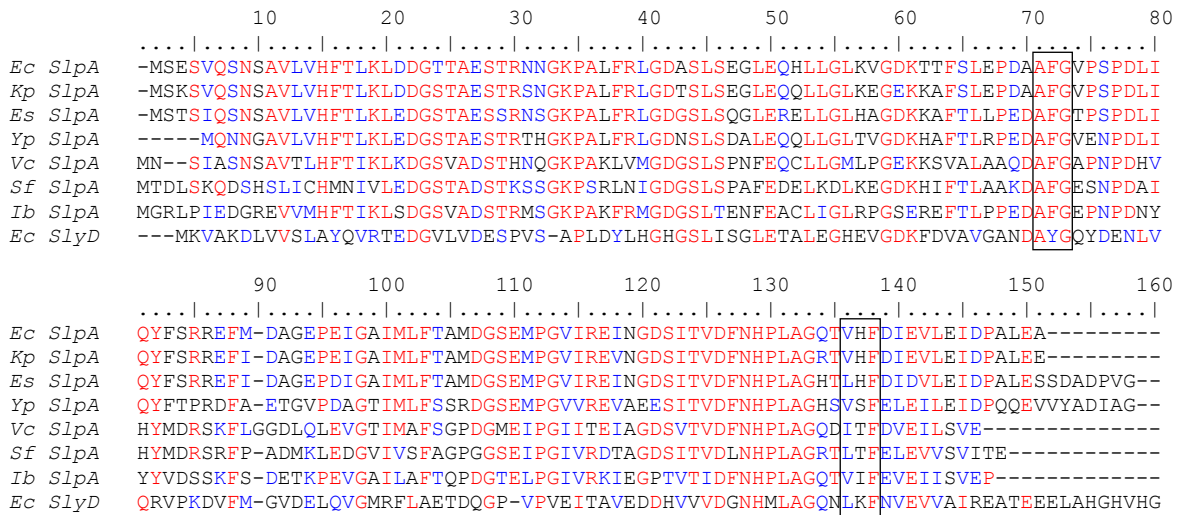


Abbildung 3-2: Sequenzvergleich der homologen SlpA-Proteine und *E. coli* SlyD. Die jeweiligen SlpA-Proteine aus den Organismen *Escherichia coli* (*Ec*), *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*), *Enterobacter sakazakii* (*Es*), *Yersinia pestis* (*Yp*), *Vibrio cholerae* (*Vc*), *Shewanella frigidimarina* (*Sf*) und *Idiomarina baltica* (*Ib*) wurden mit der Sequenz von *E. coli* SlyD (*Ec* SlyD) verglichen. Identische AS sind in rot, ähnliche AS in blau dargestellt. Die konservierten Tripeptid-Motive, die die IF-Domäne flankieren, sind eingerahmt. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programmes BioEdit/Clustal W erstellt (Hall, 1999).

Bei den homologen Proteinen handelt es sich um die SlpA-Proteine aus den mesophilen Organismen *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*), *Enterobacter sakazakii* (*Es*), *Yersinia pestis* (*Yp*), *Vibrio cholerae* (*Vc*), *Shewanella frigidimarina* (*Sf*) und *Idiomarina baltica* (*Ib*). Die SlpA-Proteine besitzen eine Sequenzähnlichkeit zu *E. coli* SlpA von 91 % (*Kp* SlpA) bis 45 % (*Sf* SlpA). Um sicherzugehen, dass alle SlpA-Varianten unter den Bedingungen, bei denen die Aktivitätstests durchgeführt werden (15 °C und 0 M Harnstoff), vollständig gefaltet vorliegen, wurde zunächst die thermodynamische Stabilität der Proteine untersucht. Die thermische und chemisch-induzierte Entfaltung ist in Abbildung 3-3 gezeigt. Die aus der Analyse der Entfaltungsübergänge erhaltenen thermodynamischen Parameter für die Stabilität der homologen SlpA-Proteine sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

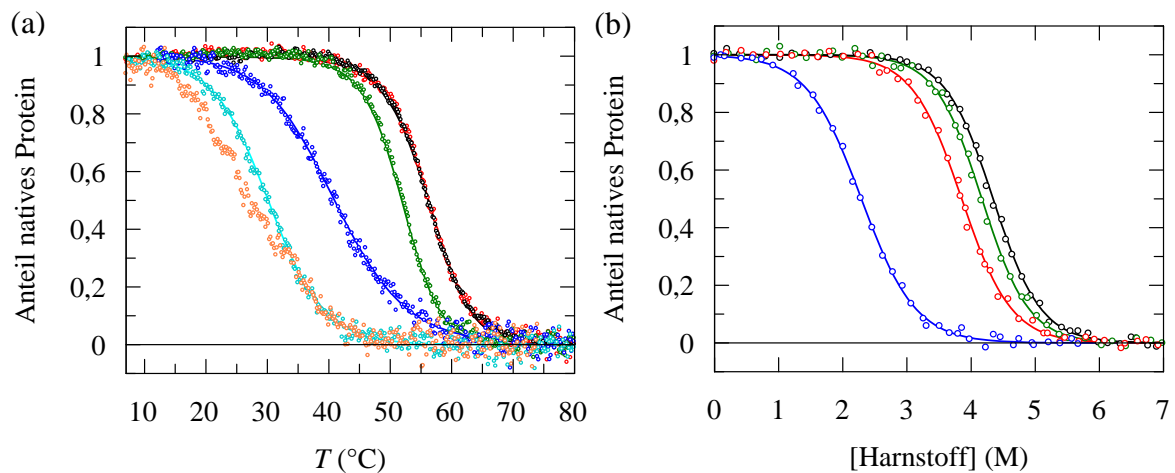


Abbildung 3-3: (a) Thermisch-induzierte und (b) Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge der homologen SlpA-Proteine aus verschiedenen Organismen. Aufgetragen sind die normierten Entfaltungsübergänge von *E. coli* SlpA (schwarz), *Kp* SlpA (rot), *Es* SlpA (grün), *Vc* SlpA (blau), *Yp* SlpA (cyan) und *Sf* SlpA (orange). Die thermisch-induzierte Entfaltung wurde anhand der Änderung des CD-Signals bei 225 nm (*E. coli* SlpA) bzw. 210 nm (alle weiteren Varianten) verfolgt. Die Messungen erfolgten mit 4 μM (*E. coli* SlpA) oder 1 μM Protein (alle weiteren Varianten) mit einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5. Die Harnstoff-induzierte Entfaltung wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 280 nm nach Anregung bei 260 nm (*E. coli* SlpA und *Vc* SlpA) bzw. bei 300 nm nach Anregung bei 280 nm (alle weiteren Varianten) verfolgt. Die Bandbreiten betragen 3 nm für das Anregungs- bzw. 5 nm für das Emissionslicht. Die Messungen wurden mit Proteinkonzentrationen von 4 μM (*E. coli* SlpA) und 2 μM (alle weiteren Varianten) bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5, 1 mM EDTA bei 15 °C durchgeführt. Die Linien entsprechen der Auswertung der Daten gemäß eines Zweizustandsmodells. Im Fall der thermisch-induzierten Entfaltungsübergänge wurde ΔC_p auf 6 $\text{kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ festgesetzt. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

In Abbildung 3-3a ist zu erkennen, dass gegenüber thermisch-induzierter Denaturierung *Kp* SlpA eine vergleichbar hohe Stabilität besitzt wie *E. coli* SlpA. Bei allen weiteren Varianten liegt der Schmelzpunkt deutlich niedriger. Bis auf *Sf* SlpA ist die Entfaltung für alle Proteine zum größten Teil reversibel. Für *Sf* SlpA ist daher die Auswertung gemäß eines Zweizustandsmodells nicht zulässig. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind jedoch zu Vergleichszwecken ebenfalls in Tabelle 3-1 aufgeführt. Die thermische Stabilität von *Ib* SlpA konnte nicht bestimmt werden, da das Protein schon bei einer Temperatur von 10 °C teilweise entfaltet vorliegt (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist, dass die SlpA-Proteine aus *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis* und *Shewanella frigidimarina* mit einer niedrigeren Kooperativität entfalten als *Kp*, *Es* und *Yp* SlpA. Die genauen Ursachen dafür sind unklar. Möglicherweise ist die Struktur dieser Varianten unter nativen Bedingungen nicht so kompakt wie bei *Kp*, *Es* und *Yp* SlpA. Dies könnte möglicherweise mit der Stabilität der jeweiligen IF-Domänen zusammenhängen. Bei der Harnstoff-induzierten Entfaltung befindet sich die Kooperativität m des Überganges von *Vc* SlpA in einem ähnlichen Bereich wie die m -Werte der weiteren Varianten. Da *Yp* und *Sf* SlpA schon bei Temperaturen unterhalb von 15 °C teilweise entfaltet vorliegen, wurde für diese Varianten die Stabilität gegenüber Harnstoff nicht bestimmt. *Es* SlpA besitzt gegenüber thermischer

Denaturierung eine niedrigere Stabilität als *Kp* SlpA, wohingegen die Stabilität von *Es* SlpA gegenüber Harnstoff höher ist als die von *Kp* SlpA. Bei der Harnstoff-induzierten Denaturierung war im Puffer zusätzlich 1 mM EDTA enthalten. EDTA bildet Komplexe mit Kationen wie Ni²⁺ oder Cu²⁺. Es ist bereits bekannt, dass Ni²⁺-Ionen an histidinreiche Sequenzen am C-Terminus von *E. coli* SlyD und *T. thermophilus* SlyD binden und Änderungen in der Konformation verursachen. Eventuell binden Ni²⁺-Ionen oder andere Metallionen, die während der Reinigung von *Kp* SlpA nicht entfernt wurden, an dessen C-terminalen His-tag und stabilisieren dessen Struktur. Bei Anwesenheit von EDTA werden diese komplexiert, was möglicherweise die geringere Stabilität von *Kp* SlpA oder den höheren *m*-Wert von *Vc* SlpA bei der Harnstoff-induzierter Entfaltung erklärt. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für verschiedene homologe SlyD-Varianten beobachtet (Popp, 2011).

Tabelle 3-1: Stabilitätsdaten für die SlpA-Proteine aus verschiedenen Organismen.

SlpA-Variante	Thermisch-induzierte Entfaltung			Harnstoff-induzierte Entfaltung		
	T_M (°C)	ΔH_D (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)	[Hst.] _{1/2} (M)	<i>m</i> (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)
<i>Escherichia coli</i>	55,8	245	13,4	4,34	6,4	30,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	56,3	254	20,9	3,85	6,2	23,9
<i>Enterobacter sakazakii</i>	52,0	276	22,5	4,17	6,6	27,3
<i>Vibrio cholerae</i>	40,9	140	6,5	2,38	6,0	14,1
<i>Yersinia pestis</i>	31,1	168	7,1	-	-	-
<i>Shewanella frigidimarina</i>	27,8	131	4,5	-	-	-

Angegeben sind die Schmelztemperaturen T_M , die van't Hoff Enthalpien der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt ΔH_D , die Übergangsmittelpunkte [Harnstoff]_{1/2} ([Hst]_{1/2}), die Kooperativitätsparameter *m* und die freien Enthalpien der Entfaltung $\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ bei 15 °C. Die thermisch-induzierte Entfaltung wurde anhand des CD-Signals bei 210 nm oder 225 nm, die Harnstoff-induzierte Entfaltung anhand der Fluoreszenzänderung bei 280 nm bzw. 300 nach Anregung bei 260 nm bzw. 280 nm verfolgt. Die Analyse der Daten erfolgte auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells. Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3-3 beschriebenen Bedingungen.

Die Aktivität von Prolylisomerasen wurde bisher meist mit Hilfe eines proteasegekoppelten Tests mit Tetrapeptiden der Form Succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-*para*-Nitroanilin (Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-*pNa*) durchgeführt (Fischer *et al.*, 1984b; Kofron *et al.*, 1991). Grundlage dieses Tests ist es, dass Proteasen wie α -Chymotrypsin die Amidbindung zwischen Phenylalanin und dem Chromophor *pNa* hydrolysieren. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Xaa-Pro-Bindung in der *trans*-Konformation vorliegt. Das *cis/trans*-Gleichgewicht liegt in wässriger Lösung etwa zu 90 % auf der Seite der *trans*-Konformation. Durch Chymotrypsin werden alle Peptide mit *trans*-Prolylbindungen schnell gespalten, wodurch die endständige *para*-Nitroanilin-Gruppe des Peptids frei wird. Dies führt zu einer starken Zunahme der Absorption in der Totzeit der manuellen Mischung. Die Hydrolyse der verbleibenden Peptide wird von der *cis/trans*-Isomerisierung der Prolylbindung limitiert. Diese Reaktion äußert sich in einer langsamen Zunahme der Absorption und kann durch Prolylisomerasen beschleunigt

werden. Die Zeitkonstante τ der unkatalysierten *cis/trans*-Isomerisierung liegt zwischen 60 und 120 s und ist abhängig von der Temperatur und der Aminosäure Xaa vor Prolin. Anhand dieses Peptidtests kann folglich die Aktivität von PPIasen für die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidylprolylbindung bestimmt werden. Nachteil dieses Aktivitätstests ist jedoch, dass er nicht mit proteaseempfindlichen PPIasen durchgeführt werden kann. Daher ist er beispielsweise für SlyD oder die Prolylisomerase SurA nicht anwendbar. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene proteasefreie Aktivitätstests entwickelt (Garcia-Echeverria *et al.*, 1992; Garcia-Echeverria *et al.*, 1993; Janowski *et al.*, 1997), unter anderem von Zoldak *et al.* (2009). Bei diesem Aktivitätstest werden Peptide der allgemeinen Form Aminobenzoyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-*para*-Nitroanilin (Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-*pNa*) verwendet. Die Peptide besitzen N-terminal eine Aminobenzoylgruppe (Abz) die als Fluorophor fungiert und C-terminal eine *pNa*-Gruppe die als Quencher wirkt. In wasserfreiem Trifluorethanol und 0,55 M Lithiumchlorid liegt das Isomerisierungsgleichgewicht der Peptidylprolylbindung zu 50 bis 70 % auf der Seite der *cis*-Konformation. Durch die räumliche Nähe von Fluorophor und Quencher in dieser Konformation wird die Fluoreszenz des Aminobenzoylrestes durch den Quencher *para*-Nitroanilin stark erniedrigt. Durch Überführen des Peptids in wässrige Umgebung kommt es zur *cis/trans*-Isomerisierung, Fluorophor und Quencher entfernen sich voneinander was in einer Zunahme des Fluoreszenzsignals resultiert. PPIasen sind in der Lage, die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidylprolylbindung in den Peptiden zu beschleunigen. Somit ist es möglich, die apparenten Raten der Prolylisomerisierung des Peptids in Abhängigkeit der Isomerasekonzentration zu messen. Nach Auftragung der apparenten Isomerisierungsraten in Abhängigkeit der Prolylisomerasekonzentration und linearer Regression ergibt sich aus dem Anstieg der Geraden die Spezifitätskonstante $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$. Dieser Wert beschreibt die katalytische Effizienz eines Enzyms und ist im Fall der PPIasen ein Maß für ihre Prolylisomeraseaktivität. Auf Grundlage dieses Isomerasetests wurde die Prolylisomeraseaktivität der homologen SlpA-Proteine für das Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*pNa* untersucht (Abbildung 3-4). Es zeigt sich, dass alle SlpA-Proteine eine sehr geringe Isomeraseaktivität besitzen, die sich im Bereich von $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ befindet. Damit ist die Prolylisomeraseaktivität 1000fach niedriger, als die der PPIase SlyD (Knappe *et al.*, 2007) oder anderer Prolylisomerasen der FKBP-Familie. Vermutlich ist die geringe Aktivität in allen SlpA-Proteinen konserviert, denn die niedrige Spezifitätskonstante $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ variiert innerhalb der Varianten nicht stärker als siebenfach.

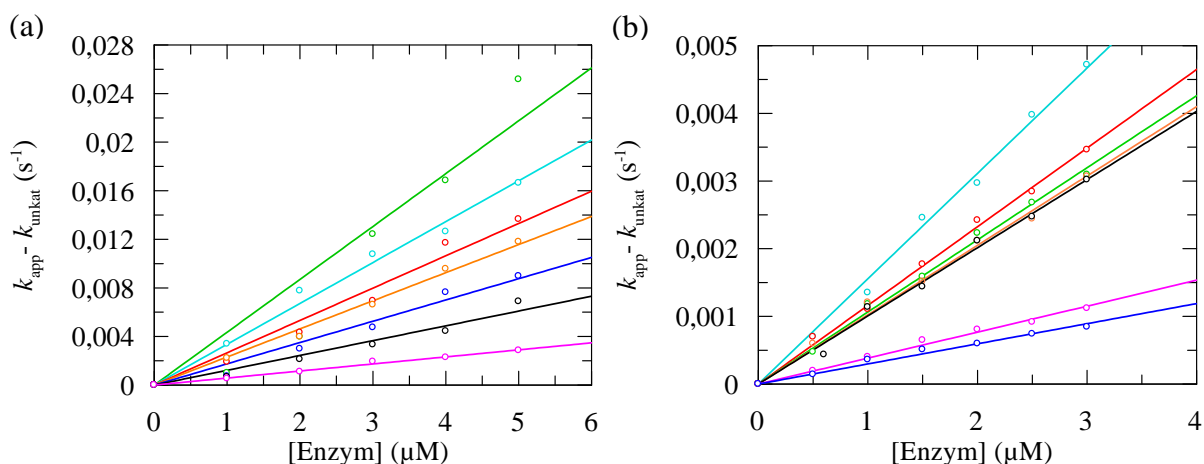


Abbildung 3-4: (a) Katalytische Effizienz der Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung im Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*pNa* und (b) Katalytische Effizienz für die Rückfaltung von RCM-T1 durch *E. coli* SlpA (schwarz), *Kp* SlpA (rot), *Es* SlpA (grün), *Vc* SlpA (blau), *Yp* SlpA (cyan) *Sf* SlpA (orange) und *Ib* SlpA (magenta). Die Messungen der Prolylisomeraseaktivität für die Isomerisierung der Prolylbindung in Peptiden wurden anhand der Fluoreszenzänderung bei 416 nm (Spaltbreite 5 nm) nach Anregung bei 316 nm (Spaltbreite 3 nm), einer Schichtdicke von 1 cm, einer Peptidkonzentration von 3 µM in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5, 1 mM EDTA bei 15 °C durchgeführt. Die Messungen der katalytischen Aktivität der Rückfaltung von 0,1 µM RCM-T1 wurden anhand der Fluoreszenzänderung bei 320 nm (Spaltbreite 5 nm) nach Anregung bei 268 nm (Spaltbreite 3 nm) bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 M NaCl, 1 mM EDTA bei 15 °C durchgeführt. Die Fluoreszenzverläufe wurden mit Gleichung 2-21 bzw. 2-30 analysiert. Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden nach Subtraktion der Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion als Funktion der Konzentration an PPIase aufgetragen (durchgezogene Linien). Die Spezifitätskonstanten (k_{kat}/K_M) wurden nach linearer Regression aus der Geradensteigung berechnet und sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Katalytische Effizienz k_{kat}/K_M der SlpA-Proteine für die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung im Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*pNa* und für die Rückfaltung von RCM-T1.

SlpA-Variante	Spezifitätskonstante k_{kat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	
	Tetrapeptid-isomerisierung	RCM-T1-Rückfaltung
<i>Escherichia coli</i>	1,22	1,01
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,66	1,16
<i>Enterobacter sakazakii</i>	4,35	1,07
<i>Vibrio cholerae</i>	1,75	0,29
<i>Yersinia pestis</i>	3,36	1,56
<i>Shewanella frigidimarina</i>	2,31	1,02
<i>Idiomarina baltica</i>	0,58	0,38

Die k_{kat}/K_M -Werte wurden anhand von Experimenten wie sie in Abbildung 3-4 dargestellt sind bestimmt. Die Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat pH 7,5, 1 mM EDTA (*cis/trans*-Isomerisierung im Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*pNa*) bzw. in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 M NaCl, 1 mM EDTA (RCM-T1-Rückfaltung) in Abhängigkeit der Prolylisomerasekonzentration bei 15 °C durchgeführt.

Da die Tetrapeptide aufgrund ihrer geringen Größe fast ausschließlich im aktiven Zentrum der PPIase binden, ist dieser Aktivitätstest ein Maß für die Prolylisomeraseaktivität der FKBP-Domäne des Enzyms. Viele PPIasen sind jedoch nicht nur in der Lage die Prolylisomerisierung in kurzen Tetrapeptiden zu katalysieren, sondern beschleunigen auch die prolinlimitierte Rückfaltung von Proteinsubstraten (Scholz *et al.*, 2006). Für diese Faltungshelferaktivität der PPIase ist es notwendig, dass die Enzyme eine zusätzliche Chaperondomäne besitzen, die für die Bindung entfalteter Substratproteine verantwortlich ist (Jakob *et al.*, 2009). Um die Faltungshelferaktivität der SlpA-Varianten zu untersuchen, wurde als Substrat ein entfaltetes Protein verwendet, dessen Rückfaltung prolinlimitiert ist. Dabei handelt es sich um das Modellsubstrat Ribonuklease T1 (RNaseT1) aus *Aspergillus oryzae*. RNaseT1 besitzt vier Prolinreste an den Positionen 39, 55, 60 und 73, von denen zwei (Pro39 und Pro55) in der nativen Struktur in *cis*-Konformation vorkommen (Heinemann & Saenger, 1982). Der Faltungsmechanismus von RNaseT1 ist aufgrund der beiden *cis*-Proline und den damit verbundenen Isomerisierungsreaktionen der Peptidylprolylbindungen sehr komplex und wurde detailliert untersucht (Kiefhaber *et al.*, 1990b; Kiefhaber *et al.*, 1990c; Kiefhaber *et al.*, 1992a; Kiefhaber *et al.*, 1992b; Mayr *et al.*, 1996). Durch Substitution der Aminosäuren Ser54 und Pro55 durch Gly bzw. Asn vereinfacht sich der Faltungsmechanismus von RNaseT1, da diese Variante in der gefalteten Form nur noch ein *cis*-Prolin (Pro39) besitzt (Kiefhaber *et al.*, 1990a). RNaseT1 hat zwei Disulfidbrücken (Cys2-Cys10 und Cys6-Cys103), die einen enormen Beitrag zur thermodynamischen Stabilität liefern (Pace *et al.*, 1988). Durch Reduktion und anschließende Carboxymethylierung der Thiofunktionen wird RNaseT1 (RCM-T1) so stark destabilisiert, dass es in Abwesenheit von Salz entfaltet vorliegt. Durch Erhöhung der Ionenstärke auf 2 M NaCl kann jedoch die Rückfaltung von RCM-T1 initiiert werden (Oobatake *et al.*, 1979; Pace & Grimsley, 1988). 15 % der RCM-T1 Moleküle besitzen das korrekte *cis*-Pro39 und falten in der Totzeit der Handmischung. Die Rückfaltung der übrigen 85 % der Moleküle ist limitiert durch die langsame *trans/cis*-Isomerisierung an Pro39 (Mücke & Schmid, 1992; Mücke & Schmid, 1994). Handelt es sich bei den SlpA-Varianten um effiziente Faltungshelfer, so sollten diese in der Lage sein, die mit einer Zeitkonstante von 500 s sehr langsame Rückfaltung von RCM-T1 zu beschleunigen. Um die Faltungshelferaktivität zu bestimmen, wurde analog zur Analyse der Prolylisomeraseaktivität, die Rückfaltung von RCM-T1 bei variierenden Konzentrationen an PPIase gemessen. Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten der RCM-T1-Rückfaltung wurden nach Subtraktion der Geschwindigkeitskonstanten der unkatalysierten Rückfaltung in Abhängigkeit der PPIase-Konzentration aufgetragen. Durch lineare Regression ergibt sich aus dem Anstieg der Gerade die Spezifitätskonstante $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ für die Rückfaltung von RCM-T1.

Bei der Analyse der Faltungshelferaktivität für die Rückfaltung von RCM-T1 zeigt sich, dass die SlpA-Proteine äußerst ineffiziente Faltungshelfer sind. Die Faltungshelferaktivität gegenüber Proteinen liegt wie auch die Prolylisomeraseaktivität gegenüber Peptiden in einem Bereich von $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Damit ergibt sich für die SlpA-Proteine im Vergleich zu SlyD eine

1000fach geringere Aktivität. Eine ähnlich geringe Aktivität für die RCM-T1-Faltung besitzt auch hFKBP12. Allerdings liegt dies im Fehlen der Chaperondomäne als Bindungsstelle für Proteinsubstrate begründet. Auffällig ist, dass *Ib* SlpA im Vergleich zu den anderen SlpA-Proteinen, trotz seiner niedrigen Stabilität nur eine geringfügig verminderte Aktivität zeigt. Möglicherweise begünstigt die Substratbindung die Strukturierung des Proteins und es kann dadurch stabilisiert werden. Ähnliches konnte bereits für andere destabilisierte Prolylisomerasen beobachtet werden (Drögemüller, 2009).

Für die niedrige Proteinfaltungsaktivität existieren zwei mögliche Begründungen. Falls die SlpA-Proteine in der Lage sind RCM-T1 innerhalb der IF-Domäne zu binden so ist die *trans/cis*-Isomerisierung von Pro39 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Rückfaltung von RCM-T1. Die Ursache der geringen Faltungshelferaktivität ist demnach auf die niedrige Aktivität als Prolylisomerase zurückzuführen, die nicht in der Lage ist, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung effizient zu katalysieren. Eine niedrige Faltungshelferaktivität könnte auch durch eine niedrige Affinität der SlpA-Proteine zu Proteinsubstraten begründet sein. Um zu überprüfen, ob SlpA in seiner Bindungsfähigkeit an entfaltete Proteinsubstrate beeinträchtigt ist, wird am Beispiel von *E. coli* SlpA im Kapitel 3.1.5 die Bindung an RNaseT1 untersucht werden.

Um genauer zu analysieren, wodurch die geringe Faltungsaktivität der SlpA-Proteine bedingt ist, wurden Experimente durchgeführt, die Aufschluss über die Chaperonaktivität der SlpA-Proteine geben. Solche Experimente werden anhand von Aggregationstests durchgeführt. Funktionsfähige Chaperone binden an aggregationssensitive Oberflächen von entfalten oder teilgefalteten Proteinen und reduzieren damit deren Konzentration in der Zelle. Für solche Chaperontests werden verschiedene Modellsubstrate wie α -Glucosidase (Höll-Neugebauer *et al.*, 1991), Luciferase (Hesterkamp & Bukau, 1998) oder Citratsynthase (Buchner *et al.*, 1998) genutzt. Diese werden thermisch oder chemisch entfaltet und anschließend in wässrigem Puffer verdünnt, was in Abwesenheit von Chaperonen zur Aggregation der Substrate führt. In diesem Fall wurde Citratsynthase als Modellsubstrat verwendet. Die Citratsynthase wurde in 6 M GdmCl reduzierend entfaltet. Bei Verdünnung in wässrigem Puffer kommt es zur Aggregation der Citratsynthase, die durch Zugabe von Chaperonen erniedrigt bzw. verhindert wird. Somit kann qualitativ die Fähigkeit eines Proteins als Chaperon zu wirken überprüft werden. Für die Chaperoneigenschaften von SlyD ist ausschließlich die IF-Domäne verantwortlich (Knappe *et al.*, 2007). Zeigen die SlpA-Proteine Chaperonaktivität würde dies also auf eine als Chaperondomäne wirksame IF-Domäne hindeuten. Die Aggregation von Citratsynthase wurde als Funktion der SlpA-Konzentration für alle SlpA-Varianten gemessen. Diese Daten sind im Anhang gezeigt (Abbildung 10-1). In Abbildung 3-5 ist die Aggregation von Citratsynthase in Anwesenheit von jeweils 6 μ M der einzelnen SlpA-Proteine dargestellt. Dies ermöglicht einen qualitativen Vergleich der Kurvenverläufe und damit eine relative Bewertung der Chaperonaktivität der SlpA-Proteine.

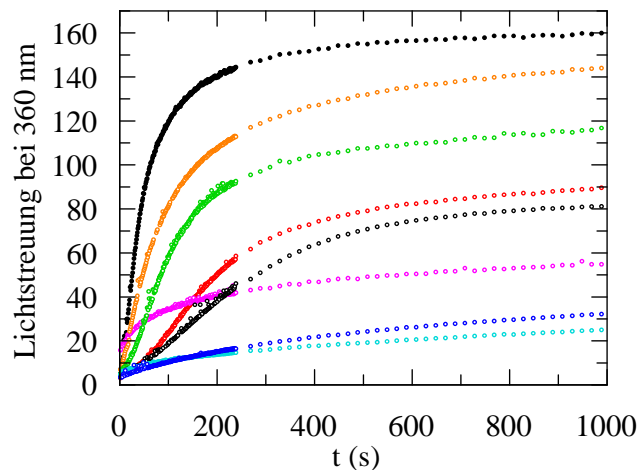


Abbildung 3-5: Citratsynthasetest zur Untersuchung der Chaperonaktivität der SlpA-Proteine. Dargestellt ist die Zunahme der Lichtstreuung durch Aggregation von $0,15 \mu\text{M}$ chemisch denaturierter Citratsynthase in Abwesenheit (schwarze, geschlossene Kreise) und in Anwesenheit (offene Kreise) von jeweils $6 \mu\text{M}$ *E. coli* SlpA (schwarz), *Kp* SlpA (rot), *Es* SlpA (grün), *Vc* SlpA (blau), *Yp* SlpA (cyan), *Sf* SlpA (orange) und *Ib* SlpA (magenta). Die Aggregation der chemisch denaturierten Citratsynthase (in 50 mM Tris/HCl , $\text{pH}^{15^\circ\text{C}} 8,0$, 6 M GdmCl und 20 mM DTE) wurde durch 200fache Verdünnung in Endbedingungen von 50 mM Tris/HCl , $\text{pH}^{15^\circ\text{C}} 8,0$, 30 mM GdmCl und $0,1 \text{ mM DTT}$ initiiert. Die Aggregation wurde über die Zunahme des Streulichts bei 360 nm bei 15°C verfolgt. Die Bandbreiten betragen 1 nm für das Einstrahlungslicht und 3 nm für das Streulicht.

Alle SlpA-Proteine sind in der Lage, die Aggregation von Citratsynthase zu verringern und zeigen damit Chaperonaktivität. Durch Anwesenheit von $6 \mu\text{M}$ *Vibrio cholera* und *Yersinia pestis* SlpA wird die Aggregation nahezu vollständig unterdrückt, damit zeigen diese Proteine die höchste Chaperonaktivität. *Sf* SlpA besitzt von allen SlpA-Proteinen die geringste Chaperonaktivität. Dies ist vermutlich darin begründet, dass *Sf* SlpA bei 15°C nicht mehr vollständig nativ vorliegt. Bei dieser Temperatur ist die IF-Domäne, die für die Chaperonaktivität verantwortlich ist, möglicherweise schon teilweise entfaltet. Anscheinend ist ein weniger strukturiertes Protein, insbesondere durch eine wenig strukturierte IF-Domäne, in seinen Chaperoneigenschaften beeinflusst. Zusammenfassend ist jedoch zu sagen, dass alle SlpA-Proteine in der Lage sind die Aggregation von Citratsynthase zu verringern. In ihren Chaperoneigenschaften ähneln die SlpA-Varianten SlyD (Scholz *et al.*, 2006; Knappe *et al.*, 2007) oder anderen Faltungsenzymen wie Triggerfaktor (Maier *et al.*, 2001). Eine geringe Prolylisomeraseaktivität und eine hohe Chaperonaktivität sind demzufolge konserviert innerhalb der SlpA-Familie. Dies lässt vermuten, dass die geringe Faltungsaktivität der SlpA-Proteine auf der äußerst geringen Prolylisomeraseaktivität der FKBP-Domäne beruht, und nicht auf einer gestörten Chaperonaktivität der IF-Domäne.

3.1.3 Die IF-Domäne stabilisiert die FKBP-Domäne und ist auch in isolierter Form vollständig gefaltet

SlpA besteht wie SlyD aus zwei Domänen, bei dem eine Gastdomäne, die IF-Domäne, in eine Schleife (*flap*) der FKBP-Domäne (Wirtsdomäne) inseriert ist. Daher ist SlpA ein geeignetes

System, um die Auswirkungen der Domäneninsertion auf die Stabilitäten beider Domänen zu untersuchen. Trotz des modularen Aufbaus kann die Entfaltung von SlyD mit einem einfachen Zweizustandsmechanismus beschrieben werden, bei dem die IF-Domäne zusammen mit der FKBP-Domäne entfaltet. Im Gesamtprotein wird die IF-Domäne aufgrund des Zusammenhaltens der Termini durch die FKBP-Domäne entropisch stabilisiert (Zoldák *et al.*, 2009b). Daher ist die IF-Domäne von SlyD in isolierter Form nicht gefaltet. Die IF-Domäne von SlpA wird, wie auch die SlyD-IF-Domäne, von den konservierten Tripeptid-Motiven AFG und VHF (AYG bzw. LXF bei SlyD und hFKBP12) flankiert.

Um die isolierte FKBP-Domäne von SlpA herzustellen (SlpA Δ IF), wurden die 70 Reste der IF-Domäne entfernt, und die *flap*-Region aus hFKBP12, die sich innerhalb der konservierten Tripeptid-Motive befindet, eingeführt (Abbildung 3-1b). Die resultierende Variante SlpA Δ IF zeigt die gleiche niedrige Prolylisomeraseaktivität wie das Vollängenprotein SlpA (Daten nicht gezeigt). Um zu untersuchen, ob die IF-Domäne von SlpA so wie die IF-Domäne von SlyD in isolierter Form entfaltet vorliegt und inwieweit die Insertion der IF-Domäne die FKBP-Domäne beeinflusst, wurde die thermodynamische Stabilität von SlpA, SlpA Δ IF und der isolierten IF-Domäne (IF) anhand der Änderung der Elliptizität bei 225 nm analysiert (Abbildung 3-6).

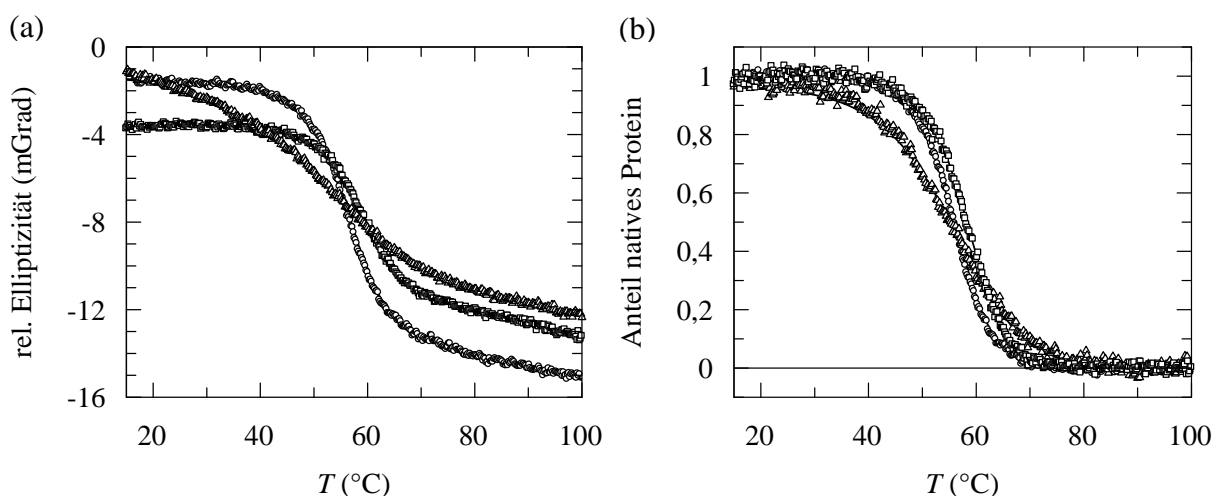


Abbildung 3-6: Thermisch-induzierte Entfaltung von SlpA (○), SlpA Δ IF (□) und der IF-Domäne (Δ). Aufgetragen sind (a) die Änderung des CD-Signals bei 225 nm und (b) die normierten Entfaltungsübergänge in Abhängigkeit der Temperatur. Die Übergänge wurden mit jeweils 4 μ M Protein bei einer Schichtdicke von 1 cm, einer Dämpfung von 8 s in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 gemessen. Die Linien entsprechen der Auswertung der Daten gemäß eines Zweizustandsmodells. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Die Übergänge waren reversibel (Daten nicht gezeigt) und konnten somit gemäß eines Zweizustandsmodells ausgewertet werden. Im Gegensatz zu SlyD zeigt sich, dass die isolierte IF-Domäne von SlpA bei 15 °C gefaltet vorliegt. Die geringe Größe der IF-Domäne (69 AS) erklärt die mit 132 kJ mol⁻¹ sehr niedrige van't Hoff Enthalpie der Entfaltung ΔH_D . In SlpA Δ IF ist der Schmelzpunkt der FKBP-Domäne mit 58,3 °C höher als im Gesamtprotein

($T_M = 55,8 \text{ }^\circ\text{C}$). Es stellt sich die Frage, ob es sich dabei um einen ähnlichen Effekt handelt, wie schon für SlyD beobachtet, dass die Wirtsdomäne (FKBP-Domäne) im Vollängenprotein durch die Insertion der Gastdomäne (IF) destabilisiert wird (Zoldák *et al.*, 2009b). Dies würde die erhöhte thermische Stabilität der isolierten SlpA-FKBP-Domäne erklären. Im Gesamtprotein ist die lösungsmittel-exponierte Fläche bei der Entfaltung größer als bei SlpA Δ IF. Dies zeigt sich jedoch nur geringfügig in der im Vergleich zur isolierten FKBP-Domäne ($\Delta H_D = 238 \text{ kJ mol}^{-1}$) kaum erhöhten van't Hoff Enthalpie von 245 kJ mol^{-1} . SlpA besitzt kein Tryptophanrest und nur einen Tyrosinrest an Position 81, jedoch neun Phenylalanine, von denen vier in der IF-Domäne und fünf in der FKBP-Domäne lokalisiert sind. Daher wurde die Harnstoff-induzierte Entfaltung anhand der Phenylalaninfluoreszenz bei 280 nm nach Anregung bei 260 nm verfolgt (Abbildung 3-7).

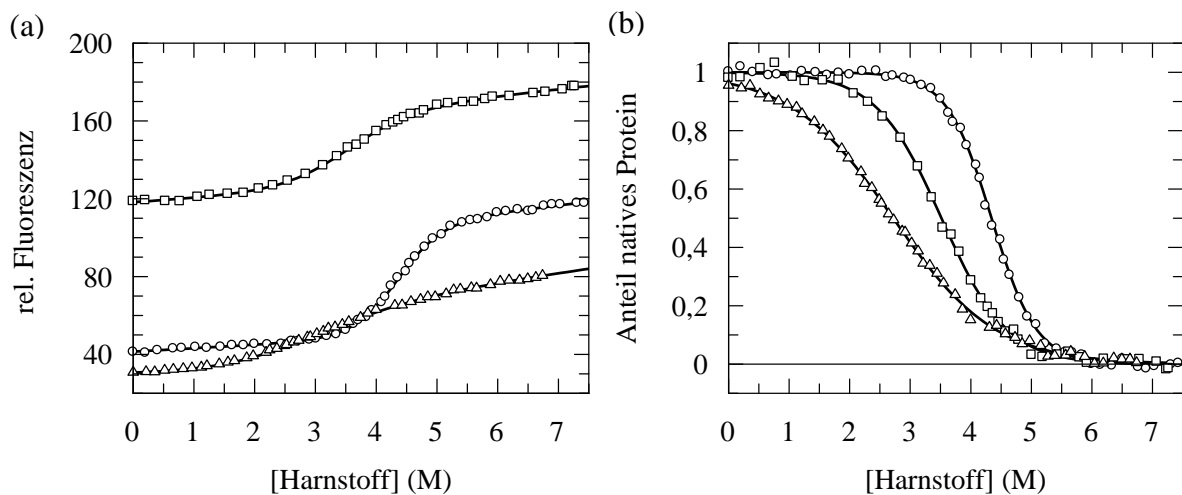


Abbildung 3-7: Harnstoff-induzierte Entfaltung von SlpA (\circ), SlpA Δ IF (\square) und der IF-Domäne (Δ). Aufgetragen sind (a) die Änderung des Fluoreszenzsignals bei 280 nm nach Anregung bei 260 nm und (b) die entsprechenden normierten Entfaltungsübergänge in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration. Die Übergänge wurden mit $4 \text{ } \mu\text{M}$ Protein bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen. Die Bandbreiten betragen 3 nm für das Anregungs- bzw. 5 nm für das Emissionslicht. Die Linien entsprechen der Auswertung der Daten gemäß eines Zweizustandsmodells. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Das Gesamtprotein zeigt gegenüber dem Denaturierungsmittel Harnstoff mit einem Übergangsmittelpunkt von 4,34 M Harnstoff eine deutlich höhere Stabilität als die isolierte FKBP-Domäne SlpA Δ IF ($[\text{Harnstoff}]_{1/2} = 3,52 \text{ M}$). Dies steht im Gegensatz zu SlyD. Im Fall von SlyD ergab die Analyse der Harnstoff-induzierten Entfaltung von SlyD und SlyD Δ IF, dass das Gesamtprotein durch Insertion der IF-Domäne destabilisiert wird. Aufgrund der Ergebnisse der Harnstoff-induzierten Entfaltung kann daher angenommen werden, dass die IF-Domäne von SlpA die FKBP-Domäne stabilisiert und nicht wie in SlyD destabilisiert. Die Entfaltung der isolierten FKBP-Domäne läuft mit einer geringeren Kooperativität ab als die Entfaltung des Gesamtproteins. Der m -Wert des Gesamtproteins ist mit $6,4 \text{ kJ mol}^{-1}\text{M}^{-1}$

deutlich höher als der m -Wert von SlpA Δ IF (4,4 kJ mol⁻¹M⁻¹), da bei der Entfaltung des Gesamtproteins eine größere Fläche zum Lösungsmittel exponiert wird.

Die IF-Domäne von SlpA ist in isolierter Form auch gegenüber dem Denaturierungsmittel Harnstoff relativ stabil, wobei die Hälfte aller Moleküle erst bei 2,72 M entfaltet vorliegen. Die IF-Domäne von SlyD hingegen liegt in isolierter Form entfaltet vor. Stefan Lorenz gelang es, die SlyD-IF-Domäne durch Einführen einer Disulfidbrücke zu stabilisieren (Lorenz, 2010). In diesem Konstrukt werden die Termini der IF-Domäne, die sonst durch die FKBP-Domäne geklammert werden, durch eine Disulfidbrücke künstlich zusammengehalten, was zu einer entropischen Stabilisierung führte. Der Übergangsmittelpunkt der Harnstoff-induzierten Entfaltung dieser disulfidverbrückten IF-Domäne von SlyD liegt bei 2,1 M Harnstoff und ähnelt damit dem Mittelpunkt der isolierten SlpA-IF-Domäne (2,72 M Harnstoff). Die disulfidverbrückte SlyD-IF-Domäne besitzt eine höhere Kooperativität (4 kJ mol⁻¹M⁻¹) als die isolierte SlpA-IF-Domäne (2,8 kJ mol⁻¹M⁻¹). Aufgrund des Zusammenhaltens von N- und C-Terminus durch die Disulfidbrücke ergibt sich vermutlich eine kompaktere Struktur als innerhalb der SlpA-IF-Domäne, bei der die Enden wahrscheinlich sehr flexibel sind. Der Unterschied zwischen nativer und gefalteter Form ist in der disulfidverbrückten Variante höher als in der isolierten SlpA-IF-Domäne, was zu dem erhöhten m -Wert führt. Die IF-Domäne von SlyD kann in isolierter Form nur nach der kovalenten Quervernetzung („Klammern“) der Termini gefaltet vorliegen. Somit besitzt die IF-Domäne von SlyD natürlicherweise eine wesentlich geringere intrinsische Stabilität als die IF-Domäne von SlpA.

Tabelle 3-3: Thermodynamische Parameter für die Entfaltung der SlpA-Varianten.

SlpA-Variante	Thermisch-induzierte Entfaltung			Harnstoff-induzierte Entfaltung		
	T_M (°C)	ΔH_D (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)	[Harnstoff] _{1/2} (M)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)
SlpA	55,8	245	13,4	4,34	6,4	30,0
SlpA Δ IF	58,3	238	15,9	3,52	4,4	15,6
IF	51,9	132	5,8	2,72	2,8	7,7

Angegeben sind die Schmelztemperaturen T_M , die van't Hoff Enthalpien der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt ΔH_D , die Übergangsmittelpunkte [Harnstoff]_{1/2}, die Kooperativitätsparameter m und die freien Enthalpien der Entfaltung $\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ bei 15 °C. Die thermisch-induzierte Entfaltung wurde anhand des CD-Signals bei 225 nm, die Harnstoff-induzierte Entfaltung wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 280 nm nach Anregung bei 260 nm verfolgt. Die Analyse der Daten erfolgte auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells. Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3-6 und 3-7 beschriebenen Bedingungen.

3.1.4 Die Domänen von *E. coli* SlpA stabilisieren sich gegenseitig

Die Untersuchung der Stabilitäten der einzelnen Domänen von SlpA im Gleichgewicht, hat gezeigt, dass die IF-Domäne auch in isolierter Form gefaltet vorliegt. Es ist jedoch nicht möglich, eine Aussage über die Stabilität der IF-Domäne innerhalb des Volllängenproteins SlpA zu machen. Daher ist es notwendig, die Faltung der FKBP- und der IF-Domäne in

isolierter Form und innerhalb des Gesamtproteins kinetisch zu untersuchen. Da die FKBP-Domäne von SlpA weder Tryptophan- noch Tyrosinreste besitzt, wurde sowohl in SlpA Δ IF als auch im Gesamtprotein an Position 48 anstelle des Leucinrestes ein Tryptophanrest eingeführt (SlpA Δ IF L48W und SlpA L48W). Dieser Rest wurde ausgewählt, da an der entsprechenden Position die homologe Prolylisomerase hFKBP12 natürlicherweise ein Tryptophan besitzt. Um eine spezifische Sonde innerhalb der IF-Domäne zu generieren, wurde im Konstrukt der isolierten IF-Domäne und im Gesamtprotein der Tyrosinrest an Position 81 gegen Tryptophan substituiert (IF Y81W und SlpA Y81W). Die thermodynamischen Stabilitäten dieser SlpA-Varianten gegenüber Harnstoff wurden analysiert und sind in Abbildung 3-8 und in Tabelle 3-4 dargestellt.

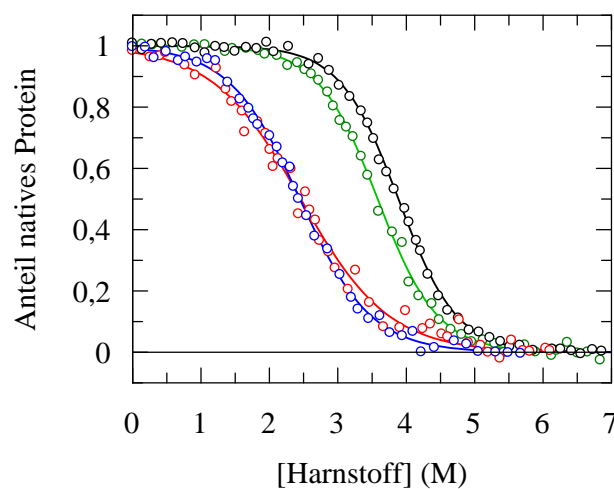


Abbildung 3-8: Harnstoff-induzierte Entfaltung der SlpA-Varianten mit Tryptophansubstitutionen. Gezeigt sind die Entfaltungsübergänge von SlpA L48W (\circ), SlpA Δ IF L48W (\circ), SlpA Y81W (\circ) und IF Y81W (\circ) in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration. Die Entfaltung wurde anhand des Fluoreszenzsignals bei 355 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Die Übergänge wurden mit 2 μ M Protein bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 bei 15 $^{\circ}$ C gemessen. Die Bandbreiten betragen 3 nm für das Anregungs- bzw. 5 nm für das Emissionslicht. Die Linien stellen die Auswertung der Daten mit Hilfe eines Zweizustandsmodells dar. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Das Einführen des Tryptophan an Position 48 verringert die Stabilität der FKBP-Domäne sowohl in isolierter Form als auch im Gesamtprotein. Für die isolierte FKBP-Domäne verschiebt sich der Übergangsmittelpunkt um 1,03 M Harnstoff auf $[\text{Harnstoff}]_{1/2} = 2,46$ M und im Gesamtprotein kommt es zu einer Verschiebung des Mittelpunktes um 0,7 M Harnstoff auf $[\text{Harnstoff}]_{1/2} = 3,61$ M (Tabelle 3-3 und 3-4). Erneut ist deutlich zu erkennen, dass die Anwesenheit der IF-Domäne die FKBP-Domäne stark stabilisiert. Wie schon für Wildtyp-SlpA beobachtet, ist die Kooperativität der Entfaltung der isolierten FKBP-Domäne niedriger als für das Gesamtprotein. Da bei der Entfaltung von SlpA Δ IF L48W die Oberfläche die zum Lösungsmittel exponiert wird, geringer ist als bei SlpA L48W resultiert dies in einem niedrigeren m -Wert. Auch das Einführen des Tryptophanrestes an Position 81 führt zu einer Destabilisierung von SlpA. Der

Übergangsmittelpunkt verschiebt sich von 4,34 M Harnstoff auf 3,89 M Harnstoff. Innerhalb der isolierten IF-Domäne führt der Aminosäureaustausch zu einer Verringerung der Stabilität um 0,55 M Harnstoff (Tabelle 3-3 und 3-4). Alle Protein-Varianten liegen jedoch bei 15 °C vollständig gefaltet vor. Somit kann anhand dieser Varianten, die Faltung von SlpA genauer analysiert werden.

Tabelle 3-4: Thermodynamische Parameter aus der Analyse der Harnstoff-induzierten Entfaltung der SlpA-Varianten mit Tryptophansubstitution.

Variante	[Harnstoff] _{1/2} (M)	<i>m</i> (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)
SlpA L48W	3,61	5,4	19,5
SlpA Δ IF L48W	2,46	4,6	11,3
IF Y81W	2,17	2,9	6,3
SlpA Y81W	3,89	5,6	21,8

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte [Harnstoff]_{1/2}, die Kooperativitätsparameter *m* und die freien Enthalpien der Entfaltung $\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ bei 15 °C. Die Harnstoff-induzierte Entfaltung wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 355 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Die Analyse der Daten erfolgte auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells. Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3-8 beschriebenen Bedingungen.

Die anhand der Gleichgewichtsübergänge analysierten Stabilitäten der Domänen zeigen, dass die IF-Domäne von SlpA auch ohne die FKBP-Domäne ihre native Konformation einnehmen kann. In Abbildung 3-9a ist exemplarisch die Rückfaltung der isolierten IF-Domäne IF Y81W und die Rückfaltung der IF-Domäne innerhalb von SlpA Y81W in 1,6 M Harnstoff gezeigt. Die isolierte IF-Domäne Y81W faltet extrem schnell mit einer Zeitkonstante τ von 1,32 ms (in 1,6 M Harnstoff, Abbildung 3-9a, rot). Es ist deutlich zu erkennen, dass die IF-Domäne von SlpA in der Lage ist, auch in Abwesenheit der FKBP-Domäne, also ohne das "Klammern" der Termini zu falten. Bei der Rückfaltung des Gesamtproteins SlpA Y81W können zwei Reaktionen beobachtet werden, wobei die schnellere der Faltung der IF-Domäne zugeordnet werden kann (Abbildung 3-9a, schwarz). Mit einer Zeitkonstanten von 1,35 ms (in 1,6 M Harnstoff, Abbildung 3-9a, schwarz) ist die Rückfaltung der IF-Domäne innerhalb des Gesamtproteins SlpA Y81W praktisch genauso schnell wie die Faltung der isolierten IF-Domäne Y81W. Auch innerhalb des Gesamtproteins SlpA Y81W ist die IF-Domäne also in der Lage zu falten, wenn die FKBP-Domäne noch nicht in ihrer nativen Struktur vorliegt. Die langsame Rückfaltungsreaktion bei der Faltung von SlpA Y81W kann der FKBP-Domäne zugeordnet werden (Abbildung 3-9b). Mit einer Zeitkonstante von 0,67 s (in 1,6 M Harnstoff, Abbildung 3-9b) faltet die FKBP-Domäne erst, wenn die Faltung der IF-Domäne schon abgeschlossen ist.

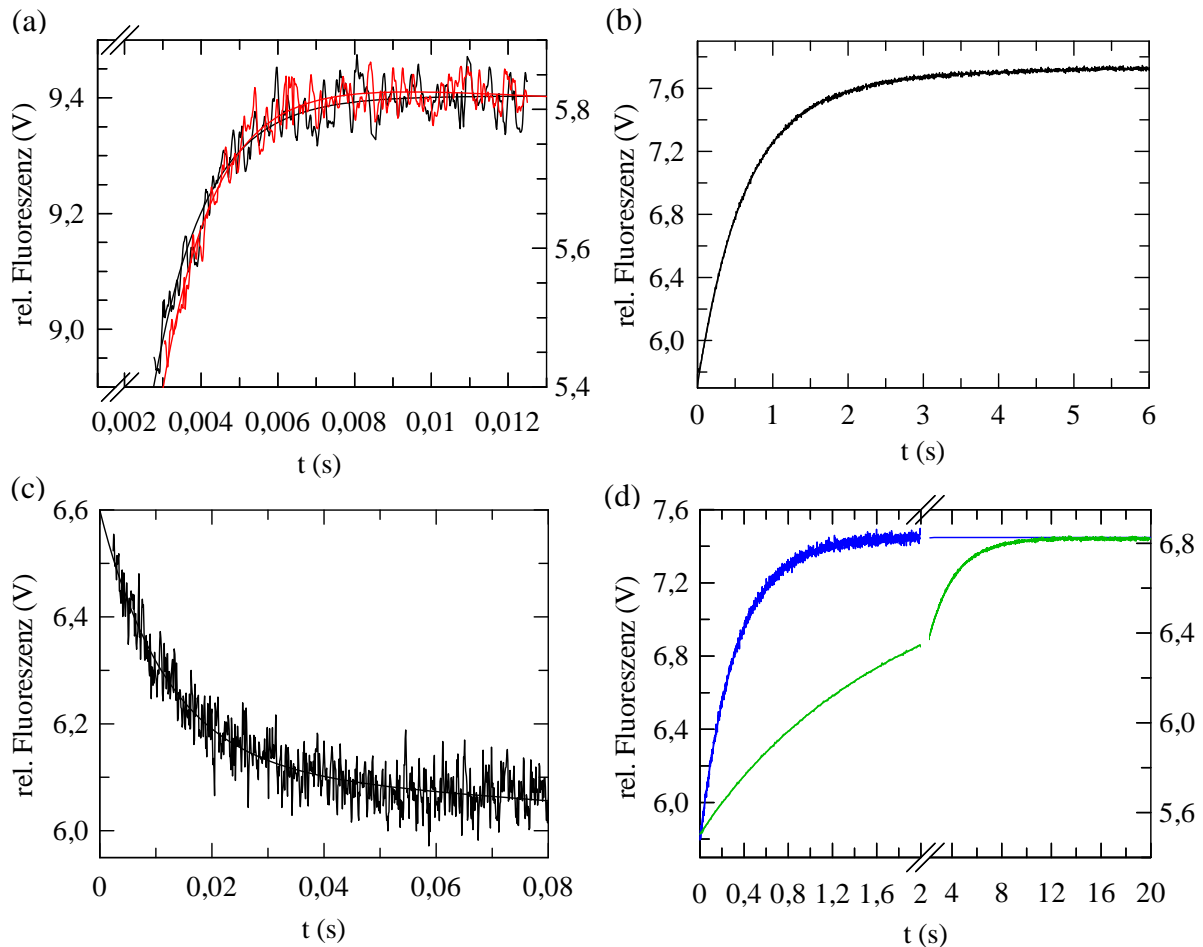


Abbildung 3-9: Beispielkinetiken der Rück- und Entfaltung verschiedener SlpA-Varianten.

(a) Rückfaltungskinetik der isolierten IF-Domäne IF Y81W (rot, linke Ordinate) und der IF-Domäne innerhalb des Gesamtproteins SlpA Y81W (schwarz, rechte Ordinate) in 1,6 M Harnstoff. (b) Rückfaltungskinetik der FKBP-Domäne von SlpA Y81W in 1,6 M Harnstoff. (c) Entfaltungskinetik der IF-Domäne innerhalb des Gesamtproteins SlpA Y81W in 6 M Harnstoff. (d) Entfaltungskinetik der isolierten FKBP-Domäne SlpA Δ IF L48W (blau, rechte Ordinate) und Entfaltung der FKBP-Domäne innerhalb des Gesamtproteins SlpA L48W (grün, linke Ordinate) in 4,5 M Harnstoff. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Angleich monoexponentieller Funktionen an die experimentellen Datenpunkte mit Zeitkonstanten τ von 1,35 ms (RF der IF-Domäne in SlpA Y81W), 1,32 ms (RF der isolierten IF-Domäne IF Y81W), 0,67 s (RF der FKBP-Domäne innerhalb von SlpA Y81W), 12,0 ms (EF der IF-Domäne innerhalb von SlpA Y81W), 0,33 s (EF von SlpA Δ IF L48W) und 1,99 s (EF der FKBP-Domäne in SlpA L48W). Die Faltungsreaktionen wurden an einer *stopped-flow*-Apparatur anhand der integralen Fluoreszenz oberhalb von 330 nm nach Anregung bei 280 nm bei 15 °C gemessen. Die Proteinkonzentration bei allen Messungen betrug 1 μ M in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5.

Die Entfaltung der isolierten IF-Domäne Y81W läuft wie auch die Rückfaltung mit Zeitkonstanten im Bereich von 1 bis 2 ms sehr schnell ab (Daten nicht gezeigt). Die Entfaltung der IF-Domäne im Gesamtprotein SlpA Y81W ist hingegen mit einer Zeitkonstante von 12 ms in 6 M Harnstoff deutlich langsamer (Abbildung 3-9c). Im Gegensatz zur Rückfaltung wird die Entfaltung der IF-Domäne also durch die Anwesenheit der FKBP-Domäne beeinflusst.

Die Entfaltung der FKBP-Domäne ist etwa 100fach langsamer und wird durch die IF-Domäne beeinflusst (Abbildung 3-9d). Die Entfaltungskinetiken der L48W-Varianten bestätigen, was schon die Gleichgewichtsdaten andeuteten. In Abwesenheit der IF-Domäne (in SlpAΔIF L48W) entfaltet die FKBP-Domäne mit einer Zeitkonstante τ von 0,33 s ungefähr sechsfach schneller, als in ihrer Anwesenheit (im Gesamtprotein SlpA L48W, $\tau = 1,99$ s in 4,5 M Harnstoff, Abbildung 3-9d). Durch die Anwesenheit der SlpA-IF-Domäne wird die FKBP-Domäne also stark stabilisiert und damit ihre Entfaltung verlangsamt.

Die Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen wurden bei variierenden Konzentrationen an Denaturierungsmittel gemessen und die daraus resultierenden apparenten Raten λ der einzelnen Faltungsreaktionen halblogarithmisch gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen (Chevronauftragung, Abbildung 3-10). λ entspricht dabei der Summe der Ent- und Rückfaltungsraten bei der jeweiligen Harnstoffkonzentration. Die kinetischen m -Werte (m_{NU} und m_{UN}) geben die Denaturierungsmittelabhängigkeit der Faltungsraten an. Die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung und der Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (k_{NU} und k_{UN}) können zusammen mit den kinetischen m -Werten durch eine Zweizustandsanalyse aus den apparenten Raten λ in der Chevronauftragung bestimmt werden (Kapitel 2.2.11, Gleichung 2-22).

Die Raten der Rückfaltung der isolierten IF-Domäne und der IF-Domäne im Gesamtprotein SlpA Y81W sind sehr hoch und nahezu identisch. Die IF-Domäne faltet also autonom und ihre Faltung ist praktisch abgeschlossen, bevor die FKBP-Domäne beginnt zu falten. Bei einem Vergleich der Faltungsraten der isolierten IF Y81W und der IF-Domäne in SlpA Y81W fällt auf, dass die Rückfaltung der IF-Domäne innerhalb des Gesamtproteins geringfügig langsamer abläuft (Abbildung 3-10a). Wenn die IF-Domäne in SlpA Y81W faltet, liegt die FKBP-Domäne noch entfaltet vor. Demzufolge befinden sich an den Termini der IF-Domäne lange unstrukturierte Bereiche, die die Faltung der IF-Domäne möglicherweise etwas behindern und dadurch unwesentlich verlangsamen.

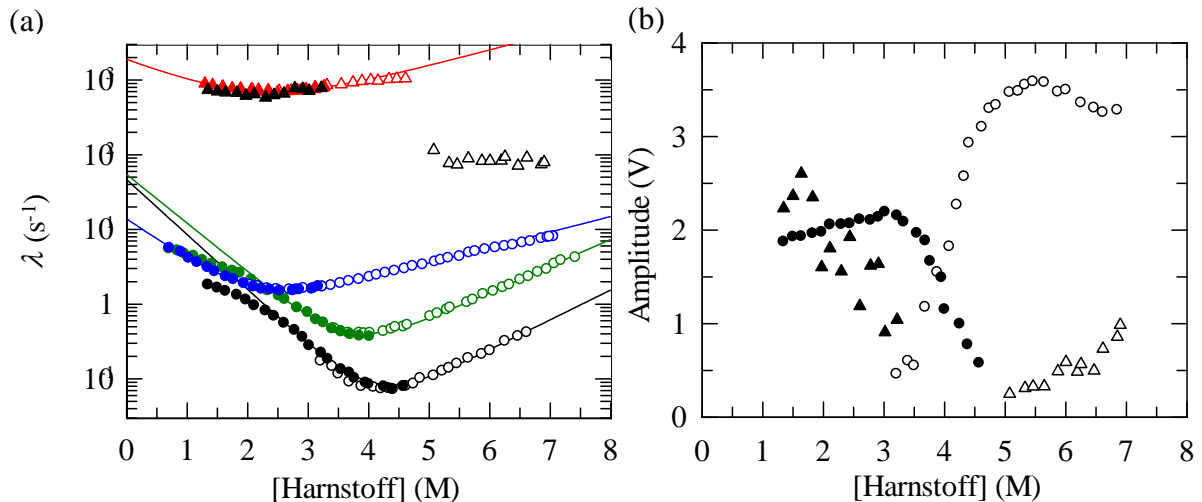


Abbildung 3-10: (a) Chevronauftragung der Entfaltungs- und Rückfaltungsraten der verschiedenen SlpA-Varianten mit Tryptophansubstitutionen. Dargestellt sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten λ der Entfaltung (offene Symbole) und Rückfaltung (geschlossene Symbole) von SlpA L48W (\circ, \bullet), SlpA Δ IF L48W (\circ, \bullet), IF Y81W (Δ, \blacktriangle) sowie die schnellen (Δ, \blacktriangle) und langsamen (\circ, \bullet) Faltungsraten von SlpA Y81W und (b) die zugehörigen Amplituden der Faltungsreaktionen von SlpA Y81W in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration. Die Faltungskinetiken wurden mit einer Proteinkonzentration von 1 μ M anhand der integralen Fluoreszenz oberhalb von 330 nm nach Anregung bei 280 nm in 0,1 M Kaliumphosphat pH 7,5 bei 15 °C an einem *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer bei 15 °C gemessen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich an die experimentellen Daten gemäß eines Zweizustandsmodells. Die aus dem Angleich erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3-5 aufgelistet.

Die Rückfaltungsraten der FKBP-Domäne in Abwesenheit der IF-Domäne (in SlpA Δ IF L48W) verlaufen wie bei einem typischen Chevron mit einem konstanten m_{UN} -Wert. Der Rückfaltungsast der FKBP-Domäne in Anwesenheit der IF-Domäne (in SlpA Y81W) ist von 0 bis 2,5 M Harnstoff dem Rückfaltungsast von SlpA Δ IF L48W sehr ähnlich. In diesem Bereich faltet sehr schnell zuerst die IF-Domäne. Somit hat sie innerhalb des Gesamtproteins schon ihre native Struktur eingenommen wenn anschließend die FKBP-Domäne faltet. Oberhalb von 2,5 M Harnstoff ist eine deutliche Krümmung des Rückfaltungsastes der FKBP-Domäne von SlpA Y81W zu beobachten. Die Rückfaltung ist in diesem Bereich zusätzlich verlangsamt, was in einem erhöhten m_{UN} -Wert resultiert. Unterhalb von 2,5 M Harnstoff spiegelt der Rückfaltungsast der Chevronauftragung nur die Faltung der FKBP-Domäne wider. Oberhalb von 2,5 M Harnstoff hingegen ist die IF-Domäne für sich allein nicht mehr stabil und wird daher in ihrer Faltung von der FKBP-Domäne abhängig. Die IF-Domäne kann erst falten, wenn die FKBP-Domäne ihre native Struktur einnimmt und damit die Termini der IF-Domäne in räumliche Nähe bringt. Daher bilden die beiden Domänen in ihrer Faltung eine einzige kooperative Einheit was zu einem erhöhten m_{UN} -Wert im Bereich von 2,5 bis 4 M Harnstoff führt und zu der beobachteten Krümmung des Rückfaltungsastes des Chevrons.

Eine unabhängige Analyse der Rückfaltungsraten der FKBP-Domäne von SlpA Y81W im Bereich von 0 bis 2,2 M Harnstoff liefert einen m_{UN} -Wert von $-0,8 \text{ M}^{-1}$. Dieser Wert ist nur geringfügig niedriger als der kinetische m -Wert der Rückfaltung von

SlpA Δ IF L48W ($-1,17 \text{ M}^{-1}$, Tabelle 5). Grund der geringen Abweichung ist möglicherweise der insertierte *flap* aus hFKBP12 in SlpA Δ IF L48W, der ja ebenfalls zur faltenden Einheit beiträgt. Daher ist die kooperative Einheit bei der Faltung von SlpA Δ IF L48W etwas größer als die FKBP-Domäne von SlpA Y81W innerhalb des Gesamtproteins. Die Summe von m_{UN} von IF Y81W und SlpA Δ IF L48W müsste in etwa dem m_{UN} -Wert des Gesamtproteins SlpA Y81W entsprechen. Dies trifft nur annähernd zu, was jedoch erneut durch den zusätzlichen *flap* innerhalb von SlpA Δ IF L48W begründet werden kann. Die m_{UN} -Werte für die Gesamtproteine SlpA Y81W und SlpA L48W sind jedoch deutlich größer als der Wert für SlpA Δ IF L48W (Tabelle 3-5).

Im Gesamtprotein SlpA Y81W ist die IF-Domäne in ihrem Faltungszustand an die FKBP-Domäne gekoppelt. Da die Entfaltung der FKBP-Domäne sehr langsam ist (vgl. Abbildung 3-10), ist ihr stabilisierender Einfluss auf die IF-Domäne noch vorhanden, wenn diese entfaltet. Dies erklärt, warum die Entfaltung der IF-Domäne in SlpA Y81W im Vergleich zur isolierten IF-Domäne etwa 20fach verlangsamt ist.

Wie für ein kleines Protein von nur 69 AS zu erwarten, sind die kinetischen m -Werte von IF Y81W sehr niedrig, somit zeigen die Ent- und Rückfaltungsraten eine sehr geringe Denaturierungsmittelabhängigkeit. Die Entfaltung der IF-Domäne als Teil von SlpA Y81W ist zwischen 5 und 7 M Harnstoff nahezu denaturierungsmittelunabhängig. Wenn die IF-Domäne in Anwesenheit der noch gefalteten FKBP-Domäne entfaltet, werden die Termini immer noch zusammengehalten, daher ist der energetische Unterschied zwischen nativem und entfaltetem Zustand möglicherweise nicht so groß wie bei der isolierten IF-Domäne. Somit ist die Denaturierungsmittelabhängigkeit ihrer Entfaltungsraten sehr gering bzw. fast gar nicht vorhanden und damit m_{NU} sehr niedrig.

Die Amplituden der schnellen Entfaltungsreaktion nehmen zwischen 5 und 7 M Harnstoff deutlich zu (Abbildung 3-10b). Dies deutet an, dass der Übergangsmittelpunkt der Entfaltung der IF-Domäne innerhalb des Gesamtproteins oberhalb von 5,5 M Harnstoff liegt und damit sehr viel höher ist, als der der isolierten IF-Domäne. Dadurch wird wiederum bestätigt, dass die IF-Domäne innerhalb des Gesamtproteins durch die FKBP-Domäne stark stabilisiert wird.

In SlpA Y81W befindet sich die Sonde anhand derer die Faltung beobachtet werden kann an Position 81 innerhalb der IF-Domäne. Die Entfaltung der FKBP-Domäne kann jedoch ebenfalls anhand dieser Sonde verfolgt werden. Insbesondere im Übergangsbereich zwischen 3 und 5 M Harnstoff folgt die IF-Domäne sehr schnell der Entfaltung der FKBP-Domäne und überträgt so ihre Amplitude auf die langsame Reaktion. Bei ca. 5 M Harnstoff ist die Entfaltung der FKBP-Domäne abgeschlossen, die Amplitude sollte demnach konstant bleiben. Sobald jedoch die IF-Domäne im Bereich von 6 bis 8 M sehr schnell entfaltet, nimmt die Amplitude der langsamen Entfaltungsreaktion (FKBP-Domäne) auf Kosten der schnellen Entfaltungsreaktion (Entfaltung IF-Domäne) ab. Dies zeigt klar die wechselseitige Abhängigkeit der beiden Faltungsreaktionen.

Bei den Varianten SlpA L48W und SlpA Δ IF L48W befindet sich die Faltungssonde innerhalb der FKBP-Domäne. Wie schon bei SlpA Y81W ist für den Rückfaltungsast von SlpA L48W eine ähnliche Krümmung zu beobachten. Dies bestätigt die für SlpA Y81W aufgestellte Interpretation, dass die IF-Domäne bei Konzentrationen oberhalb von 2,3 M Harnstoff für sich allein nicht mehr stabil ist und somit abhängig von der FKBP-Domäne faltet. Da jetzt eine größere kooperative Einheit faltet, führt dies zu einem erhöhten m_{UN} -Wert oberhalb von 2,3 M Harnstoff. Da diese Variante jedoch keine selektive Sonde für die Faltung der IF-Domäne besitzt, kann hier keine Aussage über den Verlauf der Faltungsraten der IF-Domäne getroffen werden.

Wie bereits erwähnt, ist die Entfaltung der FKBP-Domäne in Abwesenheit der IF-Domäne (SlpA Δ IF L48W) deutlich langsamer als in ihrer Anwesenheit (SlpA L48W) da die stabilisierenden Domänenwechselwirkungen fehlen. Ein weiterer möglicher Grund für die beschleunigte Entfaltung der isolierten FKBP-Domäne wäre ein destabilisierender Einfluss der *flap*-Region aus hFKBP12, die anstelle der IF-Domäne inseriert wurde. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die entsprechende Variante SlyD Δ IF ebenfalls durch Insertion dieser *flap*-Region konstruiert wurde, und hier kein destabilisierender Effekt beobachtet wurde.

Aus den auf 0 M Harnstoff extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten k_{NU} und k_{UN} und den kinetischen m -Werten lässt sich die thermodynamische Stabilität der Proteine berechnen. Die kinetischen Daten, sowie die daraus erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst. Für die Faltungsreaktionen der IF-Domäne innerhalb des Gesamtproteins SlpA Y81W konnten die Daten nicht anhand eines Zweizustandsmodells ausgewertet werden. Die Faltung der IF-Domäne kann in unabhängige Szenarien unterteilt werden. Zum einen ist die Rückfaltung in Abwesenheit der FKBP-Domäne mit Zeitkonstanten von 1 bis 2 ms ein sehr schneller Prozess. Sobald aber die FKBP-Domäne gefaltet vorliegt stabilisiert sie die IF-Domäne und verringert somit die Entfaltungsraten der Gastdomäne. Daher gehen die Rückfaltungs- und Entfaltungsraten nicht in eine gemeinsame Chevron-Auftragung über.

Tabelle 3-5: Parameter aus der Analyse der Chevronauftragung der SlpA-Varianten mit Tryptophansubstitution.

Protein	k_{NU} (s ⁻¹)	m_{NU} (M ⁻¹)	k_{UN} (s ⁻¹)	m_{UN} (M ⁻¹)	[Harnstoff] _{1/2} (M)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$\Delta G_D^{15^\circ C}$ (kJ mol ⁻¹)
SlpA L48W	0,010	0,823	54,48	-1,50	3,69	5,6	20,7
SlpA Δ IF L48W	0,302	0,491	11,33	-1,17	2,18	4,0	8,7
IF Y81W	131,5	0,492	1763,9	-0,76	2,07	3,0	6,2
SlpA Y81W	0,001	0,921	46,50	-1,69	4,08	6,3	25,7

Die kinetischen Daten wurden durch Fluoreszenzmessung an einem *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Angegeben sind die auf 0 M Harnstoff 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} . Die Daten wurden gemäß eines Zweizustandsmodells ausgewertet. Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3-10 beschriebenen Bedingungen.

Bis auf geringe Abweichungen, spiegeln die aus der kinetischen Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Stabilitäten im Gleichgewicht wider. Nur für SlpA Δ IF L48W zeigt sich eine Abweichung des Übergangsmittelpunktes um 0,28 M Harnstoff. Aufgrund der relativ geringen Stabilität von SlpA Δ IF L48W konnten im Vergleich zu den Raten der Entfaltung, nur wenige Rückfaltungsraten für die Analyse verwendet werden. Aufgrund dieser ungleichmäßigen Gewichtung, lässt sich die Abweichung zur Analyse des Gleichgewichtsüberganges erklären. Der Schnittpunkt der Amplituden der Rückfaltungs- und Entfaltungsraten ist ein weiterer Hinweis für den Übergangsmittelpunkt der Entfaltung der jeweiligen Domäne. Dieser stimmt für alle Protein-Varianten ebenfalls mit den Daten aus der Analyse der Gleichgewichtsübergänge überein (Anhang, Abbildung 10-2).

Die Faltung von SlpA läuft nach einem anderen Mechanismus ab, als die von SlyD. Für die Prolylisomerase SlyD zeigte sich, dass die IF-Domäne nur falten kann, wenn die FKBP-Domäne schon ihren nativen Zustand eingenommen hat. Eine autonome Rückfaltung der IF-Domäne wie bei SlpA ist bei SlyD nicht zu beobachten. Die Entfaltung von SlyD verläuft ähnlich wie bei SlpA. Die IF-Domäne entfaltet im Bereich niedriger Harnstoffkonzentrationen zusammen mit der FKBP-Domäne, da die Termini nicht mehr zusammengehalten werden. Im Bereich hoher Harnstoffkonzentrationen können eine schnelle (Entfaltung IF-Domäne) und eine langsame Reaktion (Entfaltung FKBP-Domäne) beobachtet werden. Da die IF-Domäne innerhalb des Gesamtproteins durch die FKBP-Domäne stabilisiert wird, ist ihre Entfaltung erst bei hohen Harnstoffkonzentrationen zu beobachten (Zoldák *et al.*, 2009b).

Die kinetischen Faltungsanalysen geben detaillierteren Aufschluss über den Faltungszustand von SlpA als die Gleichgewichtsanalysen. Dabei zeigte sich, dass sich SlpA in seiner Faltung deutlich von SlyD unterscheidet. Die IF-Domäne von SlpA faltet extrem schnell und autonom, solange ihre eigene Stabilität ausreicht, unabhängig davon, ob die entfaltete FKBP-Domäne anwesend ist oder nicht. Oberhalb von 3 M Harnstoff, wenn die Stabilität der IF-Domäne nicht mehr ausreicht, kann diese nur gekoppelt an die FKBP-Domäne falten. Die kooperative Faltungseinheit nimmt damit zu, was sich in einem erhöhten *m*-Wert der Rückfaltung widerspiegelt. Die Entfaltung der IF-Domäne wird durch die noch gefaltete FKBP-Domäne stark verlangsamt. Die IF-Domäne entfaltet erst im Bereich oberhalb von 5 M Harnstoff, wenn die FKBP-Domäne noch gefaltet vorliegt. Mit Hilfe der kinetischen Analyse konnte gezeigt werden, dass nicht nur die IF-Domäne die FKBP-Domäne stabilisiert, sondern auch die gefaltete FKBP-Domäne stabilisierend auf die IF-Domäne wirkt. Beide Domänen wirken also wechselseitig stabilisierend.

3.1.5 Die Bindung von SlpA an RNaseT1 ist sehr dynamisch und vergleichbar mit SlyD

SlyD bindet entfaltete Substrate mit sehr hoher Affinität. Die Dissoziationskonstanten liegen im Bereich von 0,5 μM (Zoldák & Schmid, 2011). Dabei stellte sich heraus, dass die Bindung ein hoch dynamischer Prozess ist, der durch die IF-Domäne bestimmt wird. Bei der Komplexbildung konnten sehr hohe Assoziationsraten beobachtet werden. Damit eine effiziente Weiterleitung des Substrates von der Bindungsstelle (IF-Domäne) zum katalytischen Zentrum der FKBP-Domäne gewährleistet ist, liegt die Lebensdauer des Komplexes im Millisekundenbereich. Eine hohe Assoziationsrate sowie eine kurze Lebenszeit des Komplexes aus Faltungsenzym und Substrat scheint demzufolge eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente Katalyse zu sein.

Um die Affinität von SlpA für entfaltete Proteine mit der von SlyD zu vergleichen, und um zu klären, inwieweit die niedrige Faltungsaktivität von SlpA in den Bindungseigenschaft der IF-Domäne begründet liegt, wurde die Bindung an RNaseT1 genauer analysiert. Die Affinität von SlpA zu RNaseT1 wurde anhand von Gleichgewichtstitrationen analysiert. Desweiteren wurde die Kinetik der Interaktion von SlpA und RNaseT1 untersucht, um Informationen über die Dynamik der Bindung zu erhalten.

Die Bindung wurde mit Hilfe von Förster-Resonanz-Energie-Transfer untersucht. Dafür ist es notwendig, dass in einem Interaktionspartner mindestens ein Tryptophanrest vorhanden ist und in dem anderen Partner ein Akzeptor, der die Energie des Tryptophanrestes übernehmen kann. Der Energietransfer findet ohne Photonenemission durch Wechselwirkung der Übergangsdipole statt, wobei eine Überlappung des Emissionsspektrums des Tryptophanrestes (Donor) mit dem Anregungsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes (Akzeptor) Voraussetzung ist. Um Fluorophore in Proteine einzubringen, werden diese meist kovalent mit Cysteinresten verknüpft. Da SlpA kein Cysteinrest besitzt, wurde die Variante SlpA Y81W also Donor für die Bindungsexperimente genutzt. Somit ist ein entfaltetes Substrat notwendig, das kein Tryptophan und ein einzelnes Cystein enthält, an das ein geeigneter Akzeptor kovalent angeknüpft werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für solche Bindungsanalysen eine permanent entfaltete Form von RNaseT1 konstruiert. Die entsprechende RNaseT1-Variante besitzt die Substitutionen Cys2Ser, Cys6Ser, Cys10Asn, Pro39Ala, Ser54Gly, Pro55Asn und Trp59Phe (im Folgenden als RNaseT1_{Cys} bezeichnet).

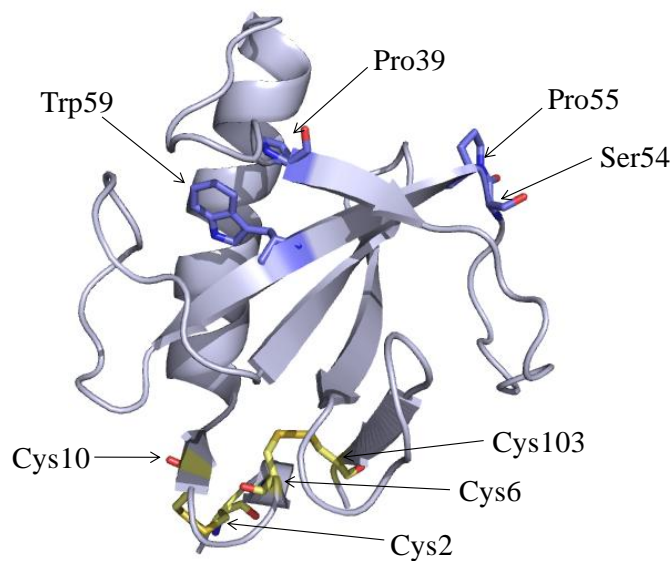


Abbildung 3-11: Tertiärstruktur von RNaseT1 aus *Aspergillus oryzae*. Die beiden Disulfidbrücken Cys2-Cys10 und Cys6-Cys103 sind als Stäbchenmodelle in gelb hervorgehoben, die *cis*-Proline an Position 39 und 55, Ser54 und Trp55 sind als Stäbchenmodelle in dunkelblau dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm Pymol (DeLano, 2003) erstellt und basiert auf den Koordinaten der Kristallstruktur von Martinez-Oyanedel *et al.* (1991, PDB-Eintrag: 9RNT).

Wie auch bei der RCM-Form von RNaseT1 (Kapitel 3.1.2) fehlt aufgrund der Substitutionen Ser54Gly und Pro55Asn eines der beiden *cis*-Proline. Darüberhinaus wurde das zweite *cis*-Prolin durch die Substitution Pro39Ala entfernt. Da drei der vier Cysteine fehlen, können die für die Stabilität essentiellen Disulfidbrücken nicht ausgebildet werden. Die Substitutionen der Cysteinreste und der Prolinreste gewährleisten, dass RNaseT1_{Cys} auch in 2 M NaCl permanent entfaltet vorliegt. Da diese Form der RNaseT1 durch die weitere Substitution Trp59Phe kein Tryptophanrest mehr enthält, kann der verbliebene, exponierte Cysteinrest über eine nukleophile Substitution mit dem Fluoreszenzfarbstoff IAEDANS modifiziert werden (RNaseT1_{Cys}-AEDANS). Da Dansylverbindungen wie beispielsweise AEDANS im Bereich der Tryptophanemission stark absorbieren, sind sie als Energieakzeptoren hervorragend geeignet (Lakowicz, 1999). RNaseT1_{Cys}-AEDANS kann somit als Substrat genutzt werden, um die Bindung von SlpA an entfaltete Proteine anhand von FRET zu untersuchen.

Als Messpuffer wurde 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 und 2 M NaCl verwendet. Die reduzierte und carboxymethylierte Form von RNaseT1 kann unter diesen Bedingungen falten. Daher wurde zunächst überprüft, ob die Variante RNaseT1_{Cys} unter den gewählten Bedingungen permanent entfaltet vorliegt. Anhand der in Abbildung 3-12 gezeigten CD-Spektren ist zu erkennen, dass RNaseT1_{Cys} sowohl bei 0 M als auch bei 2 M NaCl das Spektrum eines entfalteten Proteins aufweist.

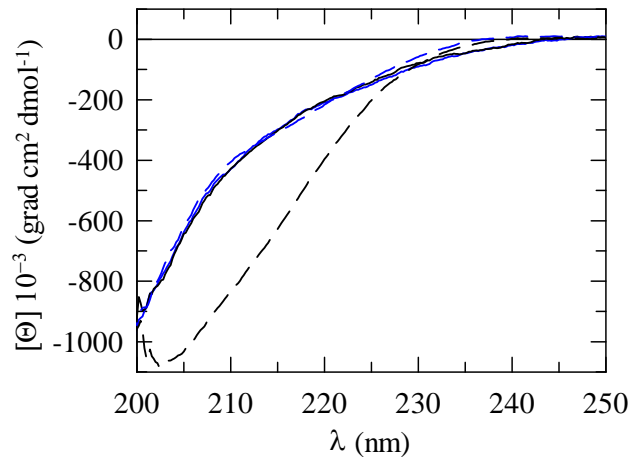


Abbildung 3-12: Fern-UV-CD-Spektren von RNaseT1_{Cys}. Gezeigt sind die Fern-UV-CD-Spektren von RNaseT1_{Cys} in 0 M (blau, durchgezogene Linie) und in 2 M NaCl (blau, unterbrochene Linie) und die Spektren von RCM-T1 in 0 M (schwarz, durchgezogene Linie) und 2 M NaCl (schwarz, unterbrochene Linie). Die Proteinkonzentration betrug jeweils 5 μ M in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 bei 15 °C. Die Spektren wurden zehnmal gemessen, gemittelt und um das Spektrum des Puffers korrigiert. Die Messung erfolgte mit einer Schichtdicke von 0,1 cm, einer Bandbreite von 1 nm und einer Dämpfung von 2 s.

Die Fern-UV-CD-Spektren von RNaseT1_{Cys} bei 0 und 2 M NaCl sind identisch mit dem von RCM-T1 bei 0 M NaCl. RCM-T1 liegt unter diesen Bedingungen vollständig entfaltet vor. Es ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen, zu dem CD-Spektrum der gefalteten Form von RCM-T1 bei 2 M NaCl. Das Substrat RNaseT1_{Cys} ist folglich unter den gewählten Bedingungen permanent entfaltet und ist somit als Substrat für SlpA geeignet. Um die Bindungsaffinität von SlpA Y81W zu RNaseT1_{Cys} quantifizieren zu können, wurde das einzige verbliebene Cys103 von RNaseT1_{Cys} durch eine nukleophile Substitution mit dem Fluoreszenzfarbstoff IAEDANS markiert. Somit kann das Substrat RNaseT1_{Cys}-AEDANS als Fluoreszenzakzeptor für Bindungsexperimente genutzt werden.

Im Fall von SlyD wurde die Bindung an entfaltete Proteinsubstrate bisher mit dem Substrat RCM-T1-P39A untersucht (Zoldák & Schmid, 2011). Zum besseren Vergleich mit SlpA, wurden ebenfalls Assoziationsexperimente mit SlyD und RNaseT1_{Cys}-AEDANS durchgeführt. Für diese Messungen wurde eine SlyD-Variante verwendet (SlyD D101W), die ein Tryptophanrest innerhalb der Chaperondomäne besitzt (Carstensen, 2008). Im Folgenden wurden Fluoreszenzspektren von SlpA Y81W und SlyD D101W in An- und Abwesenheit des Substrats RNaseT1_{Cys}-AEDANS gemessen um einen Energietransfer und damit eine mögliche Interaktion festzustellen (Abbildung 3-13). In Abwesenheit des Substrates ist ein Maximum der Donorfluoreszenz bei 350 nm (SlpA Y81W) bzw. bei 328 nm (SlyD D101W) zu beobachten. Bei einer äquimolaren Mischung beider Bindungspartner aus jeweils 5 μ M RNaseT1_{Cys}-AEDANS und SlpA Y81W ist eine deutliche Abnahme der Donorfluoreszenz jedoch kein Anstieg der Akzeptorfluoreszenz zu beobachten (Abbildung 3-13a). Für SlyD zeigt sich bei Wechselwirkung mit RNaseT1_{Cys}-AEDANS ebenfalls eine deutliche Abnahme

der Donorfluoreszenz, hier gekoppelt mit einer geringen Zunahme der Akzeptorfluoreszenz (Abbildung 3-13b).

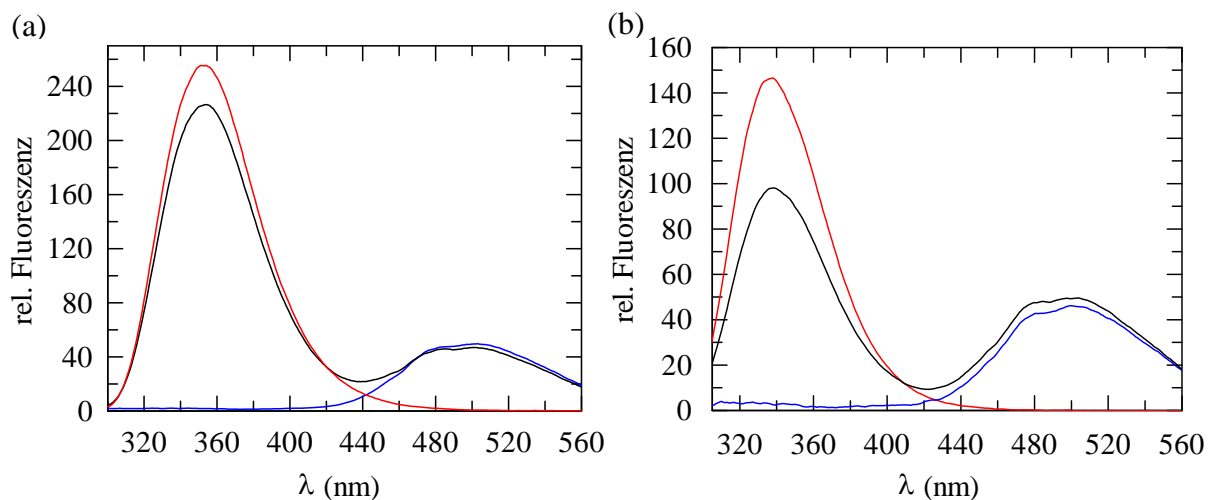


Abbildung 3-13: (a) Fluoreszenzspektren von 5 μM SlpA Y81W (rot), 5 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS (blau) und des Komplexes aus jeweils 5 μM SlpA Y81W und RNaseT1_{Cys}-AEDANS (schwarz). (b) Fluoreszenzspektren von 5 μM SlyD D101W (rot), 5 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS (blau) und des Komplexes aus 5 μM SlyD D101W und 5 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS. Die Spektren wurde mit einer Anregung bei 295 nm mit Bandbreiten von 3 nm (Anregungsspalt) und 5 nm (Emissionsspalt) und einer mittleren Sensitivität in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 M NaCl bei 15 °C aufgenommen.

Die Abnahme der Donorfluoreszenz bei 350 nm (SlpA Y81W) bzw. 328 nm (SlyD D101W) nach Anregung bei 295 nm kann genutzt werden, um durch Titration die Dissoziationskonstante K_D im Gleichgewicht zu bestimmen. Dafür wurde die Konzentration des Fluoreszenzdonors (SlpA Y81W bzw. SlyD D101W) konstant gehalten, mit steigenden Konzentrationen von 0 bis 15 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS titriert und die Abnahme der Donorfluoreszenz gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen (Abbildung 3-14). Die Analyse der Daten erfolgte durch Angleich einer Bindungskurve mit einem zusätzlichen linearen Anteil, da die Fluoreszenz bei hohem Überschuss an RNaseT1_{Cys}-AEDANS als Folge des *inner filter* Effektes insbesondere bei SlpA Y81W kontinuierlich abnimmt. Der Angleich der Kurve an die experimentellen Daten ergab für die Interaktion von SlpA Y81W und RNaseT1_{Cys}-AEDANS eine Bindungsstöchiometrie von 1:1 und eine Dissoziationskonstante des Komplexes von 3,0 μM (Abbildung 3-14a). Die Analyse der Gleichgewichtstitration von SlyD D101W und RNaseT1_{Cys}-AEDANS lieferte eine Dissoziationskonstante von 1,2 μM . Dieser Wert passt sehr gut zu den von Zoldak *et al.* bestimmten K_D -Werten, die sich im Bereich von 0,4 bis 1,9 μM befinden und anhand des inversen Titrationssystems bestimmt wurden. Dabei besitzt das Substrat RCM-T1-P39A ein Tryptophanrest (Trp59) als Donor und der Akzeptor AEDANS befindet sich innerhalb der IF-Domäne von SlyD. Die Daten in Abbildung 3-14b zeigen, dass die Bindung unabhängig davon ist, ob der Akzeptor innerhalb der Chaperondomäne oder innerhalb des Substrates lokalisiert ist.

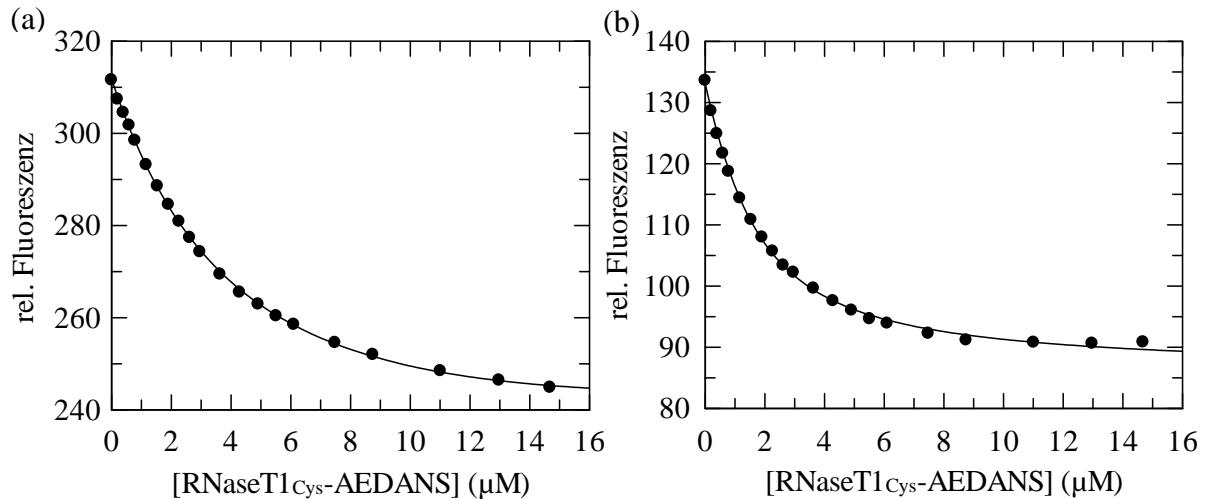


Abbildung 3-14: Fluoreszenzänderung bei Assoziation von (a) 1 µM SlpA Y81W und (b) 1 µM SlyD D101W mit steigenden Konzentrationen an RNaseT1_{Cys}-AEDANS. Die Linie zeigt den Angleich einer Bindungskurve (Gleichung 2-29) mit der Dissoziationskonstanten $K_D = 3,0 \mu\text{M}$ (SlpA Y81W) und $K_D = 1,2 \mu\text{M}$ (SlyD D101W) an die Messpunkte. Die Assoziation wurde anhand der Abnahme der Donorfluoreszenz bei 350 nm für SlpA Y81W bzw. 328 nm für SlyD D101W (Bandbreite 5 nm) nach Anregung bei 295 nm (Bandbreite 3 nm) in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 2 M NaCl bei 15 °C verfolgt.

Die Kinetik der Komplexbildung von SlpA Y81W und RNaseT1_{Cys}-AEDANS nach schneller Mischung konnte trotz der nur geringen Änderung der AEDANS-Fluoreszenz anhand des Energietransfers vom Tryptophanrest von SlpA Y81W auf RNaseT1_{Cys}-AEDANS verfolgt werden. Um die Effizienz des Energie-Transfers zu erhöhen wurde anstatt bei 295 nm bei 280 nm angeregt. Zudem wurde die Komplexbildung anhand der integralen Fluoreszenz oberhalb von 450 nm verfolgt, somit ist möglicherweise ein deutlicherer FRET-Effekt zu erwarten. Wie Abbildung 3-15 zeigt, kann die Kinetik der Assoziation trotz der geringen Signaländerung verfolgt werden. Die Assoziation von 3 µM SlpA Y81W mit 0,5 µM RNaseT1_{Cys}-AEDANS ist ein sehr schneller Prozess, der innerhalb von 40 ms abgeschlossen ist. Er ist damit etwas schneller als die Assoziation von SlyD D101W mit RNaseT1_{Cys}-AEDANS, die erst nach 100 ms abgeschlossen ist (Abbildung 3-15). Sowohl in Gleichgewichtstitrationen (Daten nicht gezeigt) als auch anhand der Untersuchung des Zeitverlaufes der Assoziation geht hervor, dass bei Mischung der isolierten IF-Domäne IF Y81W und RNaseT1_{Cys}-AEDANS keine Interaktion beobachtet werden konnte (Abbildung 3-15). Warum dies so ist, ist schwer zu erklären. Möglicherweise ist die Anwesenheit der FKBP-Domäne und damit das Klammern der Termini für die Bindungsfähigkeit der IF-Domäne notwendig.

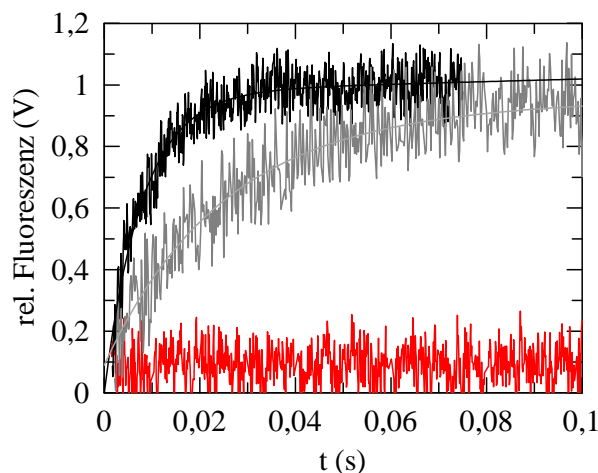


Abbildung 3-15: Kinetik der Assoziation von 3 μM SlpA Y81W (schwarz), 3 μM SlyD D101W (grau) und 3 μM IF Y81W (rot) mit 0,5 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS. Die Reaktion wurde anhand der Änderung der AEDANS-Fluoreszenz oberhalb von 450 nm nach Anregung bei 280 nm in *stopped-flow*-Mischexperimenten verfolgt. Die Linien repräsentieren die Angleiche monoexponentieller Funktionen mit Zeitkonstanten von 8,5 ms (SlpA Y81W) und 24,5 ms (SlyD D101W) an die Daten. Die Messungen wurden in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 M NaCl bei 15 °C durchgeführt.

Die Raten der Assoziation steigen mit zunehmender SlpA Y81W-Konzentration und können durch den Angleich von monoexponentiellen Funktionen analysiert werden. Da SlpA Y81W im Vergleich zu RNaseT1_{Cys}-AEDANS (Endkonzentration 0,5 μM) im Überschuss vorliegt, vereinfacht sich die Analyse der Komplexbildung von einer Reaktion zweiter Ordnung zu einer Reaktion pseudo-erster Ordnung. Die Auftragung der apparenten Assoziationsraten mit steigender Titrandkonzentration liefert nach linearer Regression und unter Voraussetzung einer 1:1 Stöchiometrie der Bindungspartner die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{on} (Geradensteigung) und Dissoziation k_{off} (Achsenabschnitt Ordinate) (Abbildung 3-16a). Für die Komplexbildung zwischen SlpA Y81W und RNaseT1_{Cys} wurde für k_{on} ein Wert von 37,8 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für k_{off} ein Wert von 17,6 s^{-1} erhalten. Der Komplex aus 1 μM SlpA Y81W und 0,5 μM Substrat wird also innerhalb von 26 ms gebildet und hat eine Lebensdauer von 57 ms. Die entsprechende Assoziationsreaktion von SlyD D101W und RNaseT1_{Cys}-AEDANS verläuft mit einem k_{on} -Wert von 8,8 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ langsamer. Die Dissoziationsraten der beiden Komplexe sind mit k_{off} -Werten von 17,6 s^{-1} (SlpA Y81W) und 10,0 s^{-1} (SlyD D101W) sehr ähnlich. Die erhaltenen k_{on} und k_{off} -Werte befinden sich in einem ähnlichen Bereich, wie die Werte, die von Zoldak *et al.* (2011) für das inverse System SlyD D101C-AEDANS und RCM-T1-P39A ermittelt wurden ($k_{\text{on}} = 24 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 35 \text{s}^{-1}$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von RNaseT1_{Cys}-AEDANS an SlpA Y81W ein ähnlich schneller und dynamischer Prozess ist, wie die Bindung an SlyD. Aus dem Quotienten der mikroskopischen Raten kann zudem die Dissoziationskonstante K_{D} zu 0,5 μM bestimmt werden. Dieser Wert ist deutlich niedriger, als der K_{D} -Wert, der aus den Gleichgewichtstitrationen erhalten wurde. Vermutlich ist die Analyse der Gleichgewichtstitration fehlerbehaftet, da es hier zu einem starken Fluoreszenzabfall kommt, wodurch der Kurvenverlauf möglicherweise künstlich nach unten gedrückt wird.

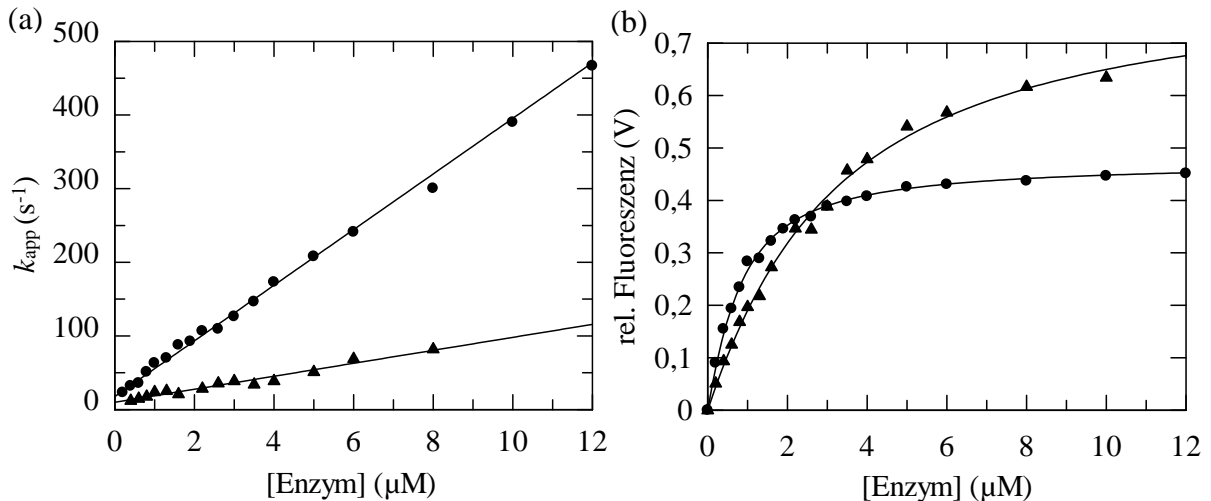


Abbildung 3-16: (a) Abhängigkeit der apparenten Assoziationsrate und (b) Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzamplitude von der Konzentration an SlpA Y81W (●) und SlyD D101W (▲). Lineare Regression der Assoziationsraten lieferte Werte für SlpA Y81W für k_{on} von $37,8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für k_{off} von $17,6 \text{s}^{-1}$, für SlyD D101W für k_{on} von $8,8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für k_{off} von $10,0 \text{s}^{-1}$. Die in (b) gezeigten Linien stellen den Angleich von Gleichung 2-29 an die Messpunkte dar und liefern Dissoziationskonstanten K_D für SlpA Y81W von $0,6 \mu\text{M}$ und für SlyD D101W von $2,6 \mu\text{M}$. Die Konzentration an RNaseT1_{Cys}-AEDANS betrug jeweils $0,5 \mu\text{M}$. Die Reaktionen wurden anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 450 nm nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 10 nm) an einem *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer verfolgt. Alle Experimente wurden in $0,1 \text{ M}$ Tris/HCl pH $8,0$, 2 M NaCl bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Die Dissoziationskonstante kann außerdem, analog zu den Gleichgewichtstitrations (Abbildung 3-14), auch aus der Abhängigkeit der Reaktionsamplituden von der Prolylisomerasekonzentration bestimmt werden (Abbildung 3-16b). Die Amplituden der Assoziationsreaktionen steigen zunächst ebenfalls mit zunehmender Konzentration an SlpA Y81W. Bei Konzentrationen oberhalb von $4 \mu\text{M}$ bleiben sie nahezu konstant. Für den Komplex aus SlpA Y81W und RNaseT1_{Cys}-AEDANS ist bei dieser Konzentration die Sättigung erreicht. Durch Angleich einer Bindungskurve (Gleichung 2-29) an die Daten ergibt sich eine Bindungsstöchiometrie von 1:1 und eine Dissoziationskonstante von $0,6 \mu\text{M}$. Dieser Wert passt sehr gut zu dem K_D -Wert der aus dem Quotient k_{off}/k_{on} erhalten wurde und deutet ebenfalls an, dass die Analyse der Gleichgewichtstiteration mit einem systematischen Fehler behaftet ist. Die Ergebnisse zeigen, dass SlpA mit hoher Affinität an entfaltete Proteinsubstrate bindet und die Bindung sehr dynamisch ist. Hinsichtlich seiner Substratbindungseigenschaften ähnelt SlpA seinem Homolog SlyD sehr stark und daher kann eine verminderte Bindungsaffinität oder Bindungsdynamik als Ursache der niedrigen Faltungsaktivität von SlpA Y81W ausgeschlossen werden. Da die Bindungseigenschaften von der IF-Domäne dominiert werden, zeigt dies erneut, dass die Ursache der geringen Faltungsaktivität von SlpA in seiner FKBP-Domäne begründet liegt.

3.1.6 Die IF-Domäne aus SlpA stabilisiert auch die FKBP-Domäne von SlyD

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass sich SlpA bezüglich seiner Stabilität und Faltung von SlyD unterscheidet, insbesondere weil die IF-Domäne in SlpA stabilisierend auf die FKBP-Domäne wirkt. Im Gegensatz dazu, weisen die Bindungsexperimente darauf hin, dass die Bindung an die IF-Domäne sehr ähnlich zu SlyD abläuft. In Kapitel 3.1.5 wurde gezeigt, dass die geringe Faltungsaktivität durch das aktive Zentrum der PPIase bedingt ist und nicht durch eine beeinträchtigte Funktion der IF-Domäne als Bindungsmodul. Um dies weiter zu untermauern, wurde ein chimäres Protein aus der FKBP-Domäne aus SlyD und der IF-Domäne aus SlpA hergestellt (im Folgenden SlyD-SlpA-Chimäre genannt). Diese Chimäre wurde konstruiert, indem in SlyD die eigene IF-Domäne durch die IF-Domäne von SlpA ersetzt wurde. Die Sequenzen, die als Verknüpfungspunkte gewählt wurden, waren die konservierten Tripeptide AYG(SlyD)/AFG(SlpA) und LVF(SlyD)/VHF(SlpA) (Abbildung 3-1b). Es wurden zwei Varianten dieser SlyD-SlpA-Chimäre hergestellt, zum einen die Chimäre mit der Wildtyp-SlpA-IF-Domäne, zum anderen wurde die IF-Domäne mit dem Aminosäureaustausch Tyr81Trp inseriert. Die resultierenden chimären Proteine wurden hinsichtlich ihrer Stabilität und Aktivität charakterisiert.

Die Stabilität der SlyD-SlpA-Chimäre wurde gegenüber dem Denaturierungsmittel Harnstoff untersucht. In Abbildung 3-17 sind vergleichend die Entfaltungsübergänge der Chimären, der Wildtyp-Proteine und der jeweiligen isolierten FKBP-Domänen aus SlpA und SlyD dargestellt. Die dazugehörigen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-6 aufgeführt.

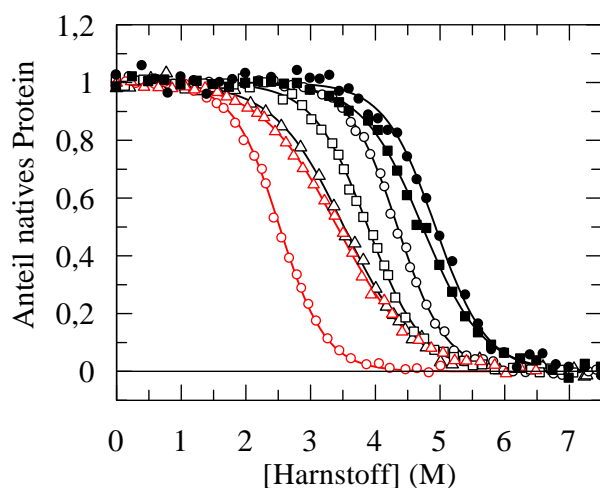


Abbildung 3-17: Harnstoff-induzierte Entfaltung der SlyD-SlpA-Chimäre (●), der SlyD-SlpA Y81W-Chimäre (■), von SlpA (○), SlpA Y81W (□), SlpA Δ IF (Δ), SlyD (◊) und SlyD Δ IF (Δ). Gezeigt sind die normierten Entfaltungsübergänge, die anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals bei 280 nm nach Anregung bei 260 nm (SlpA, SlpA Δ IF), anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals bei 304 nm nach Anregung bei 280 nm (SlyD-Varianten, SlyD-SlpA-Chimäre) bzw. anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals bei 355 nm nach Anregung bei 295 nm (SlpA Y81W, SlyD-SlpA Y81W-Chimäre) in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration gemessen wurden. Die Übergänge wurden mit 4 μ M (SlpA, SlpA Δ IF) bzw. 2 μ M Protein (alle weiteren Varianten) bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 bei 15 °C gemessen. Die Bandbreiten betragen 3 nm für das Anregungs- bzw. 5 nm für das Emissionslicht. Die Linien stellen die Auswertung der Daten mit Hilfe eines Zweizustandsmodells dar.

Der Einbau der SlpA-IF-Domäne führt zu einer enormen Stabilisierung der FKBP-Domäne von SlyD. Der Übergangsmittelpunkt verschiebt sich von 2,5 auf 4,9 M Harnstoff. Das chimäre Protein ist sogar stabiler als SlpA selbst. Die FKBP-Domänen von SlpA und SlyD werden demnach gleichermaßen durch das Vorhandensein dieser IF-Domäne stabilisiert. Warum die IF-Domäne in Kombination mit der SlyD-FKBP-Domäne eine noch höhere Stabilität besitzt als Wildtyp-SlpA ist unklar. Möglicherweise kommt es zu lokalen stabilisierenden Wechselwirkungen innerhalb der Chimäre, die in SlpA nicht vorhanden sind.

Die erhöhte Stabilität der SlyD-SlpA-Chimäre zeigt erneut, dass sich die Domänen innerhalb von SlpA gegenseitig stabilisieren, wohingegen in SlyD die instabile IF-Domäne die FKBP-Domäne destabilisiert. Dies wird ebenfalls deutlich bei einem Vergleich der Entfaltungsübergänge der jeweiligen isolierten FKBP-Domänen von SlyD und SlpA. Diese besitzen nahezu die gleiche Stabilität (Abbildung 3-17, Tabelle 3-6). Durch Insertion des *flap* aus hFKBP12 anstelle der IF-Domäne wird die SlpA-FKBP-Domäne (SlpA Δ IF) destabilisiert, wohingegen die SlyD-FKBP-Domäne (SlyD Δ IF) stabilisiert wird. Auch dies zeigt, dass die IF-Domänen aufgrund ihrer unterschiedlichen Stabilitäten das Gesamtprotein stabilisieren oder destabilisieren.

Der Aminosäureaustausch Tyr81Trp führt innerhalb der SlyD-SlpA Y81W-Chimäre ähnlich wie bei SlpA zu einer geringfügigen Destabilisierung und damit zu einer leichten Verschiebung des Übergangsmittelpunktes von 4,93 auf 4,73 M Harnstoff. Für SlpA führte diese Aminosäuresubstitution zu einer stärkeren Verringerung der Stabilität. Dass die Destabilisierung für die Chimäre weniger deutlich ausfällt, kann möglicherweise ebenfalls durch die stabilisierenden Wechselwirkungen, die vermutlich zwischen SlpA-IF-Domäne und SlyD-FKBP-Domäne herrschen und zu der im Vergleich zum Wildtyp-SlpA erhöhten Stabilität beitragen, erklärt werden.

Tabelle 3-6: Thermodynamische Parameter aus der Analyse der Harnstoff-induzierten Entfaltung der SlyD-SlpA-Chimären, der isolierten FKBP-Domänen, von SlyD und SlpA.

Variante	[Harnstoff] _{1/2} (M)	<i>m</i> (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)
SlyD-SlpA-Chimäre	4,93	6,0	29,8
SlyD-SlpA Y81W-Chimäre	4,73	5,1	24,2
SlpA Y81W	3,89	5,6	21,8
SlpA	4,34	6,4	30,0
SlpA Δ IF	3,52	4,4	15,6
SlyD	2,50	6,5	16,2
SlyD Δ IF	3,41	4,1	13,9

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte [Harnstoff]_{1/2}, die Kooperativitätsparameter *m* und die freien Enthalpien der Entfaltung $\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ bei 15 °C. Die Analyse der Daten erfolgte auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells. Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3-17 beschriebenen Bedingungen.

Die Analyse der Gleichgewichtsübergänge (Tabelle 3-6) zeigte, dass genau wie bei SlpA die IF-Domäne die SlyD-FKBP-Domäne innerhalb der Chimäre enorm stabilisiert. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken der SlyD-SlpA Y81W-Chimäre gemessen. Dadurch ist es möglich zu analysieren, inwieweit sich die Domänen in dem chimären Konstrukt in ihrer Faltung beeinflussen. Die erhaltenen Entfaltungs- und Rückfaltungsraten und die zugehörigen Amplituden der Faltungsreaktionen sind in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration in Abbildung 3-18 aufgetragen.

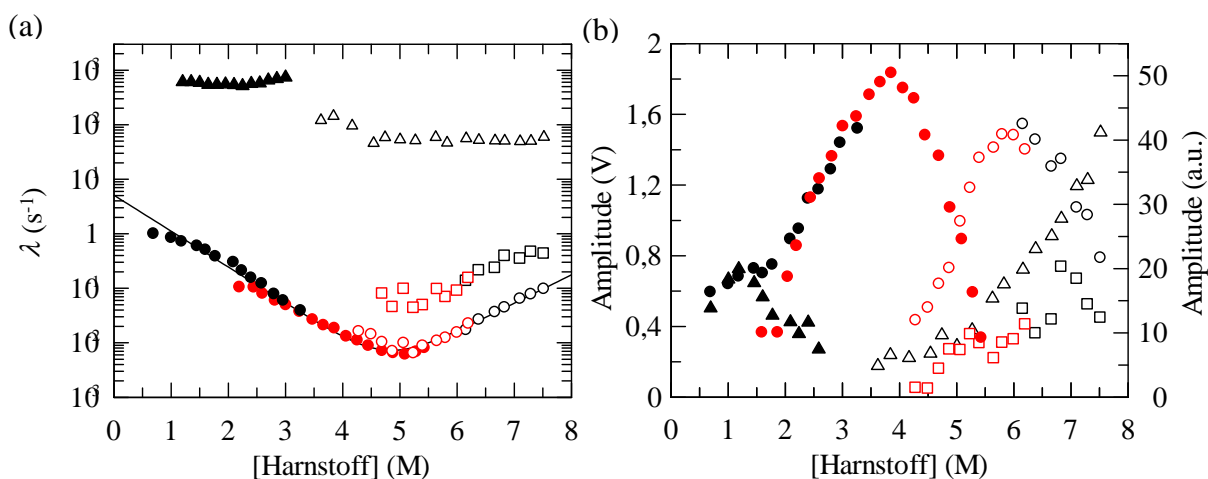


Abbildung 3-18: (a) Chevronauftragung der Entfaltungs- und Rückfaltungsraten und (b) Auftragung der zugehörigen Amplituden der Faltungsreaktionen der SlyD-SlpA Y81W-Chimäre in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten λ und die zugehörigen Amplituden der Entfaltung sind als offene Symbole dargestellt, die der Rückfaltung als geschlossene Symbole. Die Faltungsreaktionen, die nach schneller *stopped-flow*-Mischung gemessen wurden, sind in schwarz dargestellt: schnelle Faltungsreaktionen der SlpA Y81W-IF-Domäne (▲,△), Rückfaltungsreaktionen (●) und schnelle und langsame Entfaltungsreaktionen (○,□) der SlyD-FKBP-Domäne. Die in rot dargestellten Faltungsraten wurden nach manueller Mischung detektiert: Rückfaltungsreaktionen (●) und schnelle und langsame Entfaltungsreaktionen (○,□) der SlyD-FKBP-Domäne. (b) Die Amplituden der Reaktionen nach schneller Mischung (schwarz) sind in auf der linken Ordinate aufgetragen, die nach manueller Mischung (rot) auf der rechten Ordinate. Die durchgezogene Linie in (a) entspricht einem Angleich an die experimentellen Daten gemäß eines Zweizustandsmodells und liefert $k_{\text{NU}} = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $m_{\text{NU}} = 1,2 \text{ M}^{-1}$, $k_{\text{UN}} = 5,1 \text{ s}^{-1}$ und $m_{\text{UN}} = -1,5 \text{ M}^{-1}$. Daraus ergibt sich der Übergangsmittelpunkt $[\text{Harnstoff}]_{1/2} = 4,77 \text{ M}$, $m = 6,5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und $\Delta G_{\text{D}} = 31,1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Faltungskinetiken wurden anhand der integralen Fluoreszenz oberhalb von 330 nm nach Anregung bei 295 nm an einem *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer oder nach manueller Mischung bei 355 nm nach Anregung bei 295 nm mit einer Proteinkonzentration von 1 μM an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 bei 15 °C gemessen.

Für die Rückfaltung ist wie schon für SlpA Y81W eine schnelle und eine langsame Faltungsreaktion zu beobachten. Die schnelle Reaktion kann der Rückfaltung der IF-Domäne zugeordnet werden. Wie auch innerhalb von SlpA Y81W läuft diese Reaktion im Millisekundenbereich mit Zeitkonstanten von 1 bis 2 ms ab. Die langsame Faltungsreaktion kann der SlyD-FKBP-Domäne zugeordnet werden. Die Rückfaltung läuft wie auch die Rückfaltung der isolierten SlyD-FKBP-Domäne im Sekundenbereich ab (Zoldák *et al.*, 2009b) und ist damit langsamer als die Faltung der FKBP-Domäne von SlpA

(vgl. Kapitel 3.1.4). Auffällig ist, dass die Rückfaltungsraten der SlyD-FKBP-Domäne, wie bei SlpA Y81W (Abbildung 3-10), unterhalb von 2 M Harnstoff eine niedrigere Denaturierungsmittelabhängigkeit zeigen als oberhalb von 2 M Harnstoff. Diese Verringerung von m_{UN} kann auch hier durch die Anwesenheit der gefalteten IF-Domäne erklärt werden. Wie bei SlpA Y81W faltet die IF-Domäne unterhalb von 2 M Harnstoff autonom und sehr schnell und liegt somit schon in ihrer nativen Struktur vor, wenn die SlyD-FKBP-Domäne faltet.

Bei höheren Harnstoffkonzentrationen wird die IF-Domäne destabilisiert und ihre Faltung ist an die Faltung der FKBP-Domäne gekoppelt. Mit Zeitkonstanten von 12 bis 20 ms ist die Entfaltung der IF-Domäne auch wie bei SlpA Y81W im Vergleich zur Rückfaltung verlangsamt. Die IF-Domäne wird durch das Vorhandensein der FKBP-Domäne stabilisiert und entfaltet zum größten Teil erst nachdem die FKBP-Domäne entfaltet. Dies spiegelt sich auch in den Amplituden wider. Erst oberhalb von 5 M Harnstoff liegt die FKBP-Domäne schon zum großen Teil entfaltet vor und entsprechend beginnt die Amplitude der schnellen Entfaltungsreaktion auf Kosten der Amplitude der langsamen Reaktion deutlich anzusteigen, wodurch die Entfaltung der IF-Domäne angezeigt wird. Die Sonde der Entfaltung (Trp81) ist innerhalb der IF-Domäne lokalisiert. Die Entfaltung der FKBP-Domäne kann dennoch anhand dieser Sonde verfolgt werden, da etwa zwischen 3 und 5 M Harnstoff die Entfaltung der IF-Domäne an die Entfaltung der FKBP-Domäne gekoppelt ist. Sobald jedoch die IF-Domäne autonom entfaltet und die Amplitude dieser Reaktion folglich steigt, fällt entsprechend die Amplitude der Entfaltungsreaktionen der FKBP-Domäne.

Im Gegensatz zur Entfaltung der SlpA-FKBP-Domäne konnte die Entfaltung der SlyD-FKBP-Domäne in der SlyD-SlpA Y81W-Chimäre nicht als monoexponentielle Reaktion analysiert werden; ein biexponentieller Angleich war erforderlich. Die Reaktion mit der größeren Amplitude ist der langsameren Entfaltungsreaktion zuzuordnen (Abbildung 3-18a und b). Die Entfaltungsraten dieser Reaktion und die Rückfaltungsraten fallen im Bereich von 5 M Harnstoff zusammen. Die Analyse der entsprechenden Chevronauftragung anhand eines Zweizustandsmodells ergibt einen Übergangsmittelpunkt von $[\text{Harnstoff}]_{1/2} = 4,77 \text{ M}$ und einen m -Wert von $6,5 \text{ kJ mol}^{-1}\text{M}^{-1}$ und passt damit sehr gut zu den Daten des Gleichgewichtsübergangs. Es ist nicht klar, welchen Prozess die etwas schnellere Phase mit der geringeren Amplitude widerspiegelt (Abbildung 3-18a und b). Möglicherweise existieren bei der Entfaltung zwei Spezies, zum einen Moleküle, in denen die IF-Domäne noch gefaltet ist, und nur die FKBP-Domäne entfaltet, zum anderen Moleküle, in denen beide Domänen gleichzeitig entfalten. Diese zweite Reaktion, könnte dann der etwas schnelleren Phase zugeordnet werden, da durch die Abwesenheit der IF-Domäne die Entfaltung der SlyD-FKBP-Domäne beschleunigt wäre, da die Termini durch die IF-Domäne nicht mehr zusammengehalten werden. Allerdings wäre in solch einem Fall zu erwarten, dass die beiden Entfaltungsäste nicht parallel verlaufen, da bei hohen Harnstoffkonzentrationen die IF-Domäne mit der FKBP-Domäne zusammen entfaltet und somit der Ast der langsamen Phase mit dem Ast der intermediären Phase zusammenfallen sollte. Bei der Analyse der

Faltung der Wildtyp-SlyD-SlpA-Chimäre (ohne Tyr81Trp) konnten für die Entfaltungsreaktionen der SlyD-FKBP-Domäne, die anhand der Tyrosinfluoreszenz verfolgt wurden, ebenfalls biexponentielle Reaktionen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte auch hier nicht geklärt werden, woher diese zusätzliche intermediäre Phase stammt. Dies zeigt, dass der Faltungsmechanismus der SlyD-SlpA-Chimäre sehr komplex ist. Da jedoch die folgenden Untersuchungen unter nativen Bedingungen durchgeführt wurden, wurde auf eine weitere Analyse verzichtet.

3.1.7 Die Chimäre aus SlpA und SlyD ist ein effektiver Faltungshelfer

Im Fall von SlyD zeigt die isolierte FKBP-Domäne eine hohe katalytische Aktivität für die Isomerisierung der Prolylbindung in kurzen Peptiden, besitzt jedoch keinerlei Faltungshelferaktivität, da die IF-Domäne als Bindungsstelle für entfaltete Proteine fehlt. SlpA weist als Gesamtprotein nur eine sehr niedrige Faltungshelferaktivität auf, was darauf zurückzuführen ist, dass die Isomeraseaktivität der FKBP-Domäne äußerst gering ist. Die Insertion der SlpA-IF-Domäne in die FKBP-Domäne von SlyD sollte also zu einem effizienten Faltungsenzym führen, welches sowohl eine hohe Isomeraseaktivität und aufgrund des Vorhandenseins der SlpA-IF-Domäne eine ebenfalls hohe Faltungshelferaktivität besitzen sollte.

Die Prolylisomeraseaktivität der SlyD-SlpA Y81W-Chimäre wurde mit Hilfe des proteasefreien Tests von Zoldak *et al.* ermittelt. Die katalytische Aktivität $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ für die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung im Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*p*Na wurde zu $0,96 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt. Dieser Wert ist der Prolylisomeraseaktivität von SlyD ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 1,27 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) sehr ähnlich und 760fach höher als die Prolylisomeraseaktivität von SlpA (Abbildung 3-19a). Daher ist es auch nicht überraschend, dass die SlyD-SlpA Y81W-Chimäre ein effizienter Faltungshelfer ist. Die katalytische Aktivität der Chimäre für die Rückfaltung von RCM-T1 beträgt $0,19 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Damit ist die Faltungshelferaktivität der SlyD-SlpA Y81W-Chimäre zwar geringfügig niedriger als die von SlyD ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 0,7 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), aber durch das Vorhandensein der katalytisch aktiven SlyD-FKBP-Domäne 190fach höher als die von SlpA ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 1,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

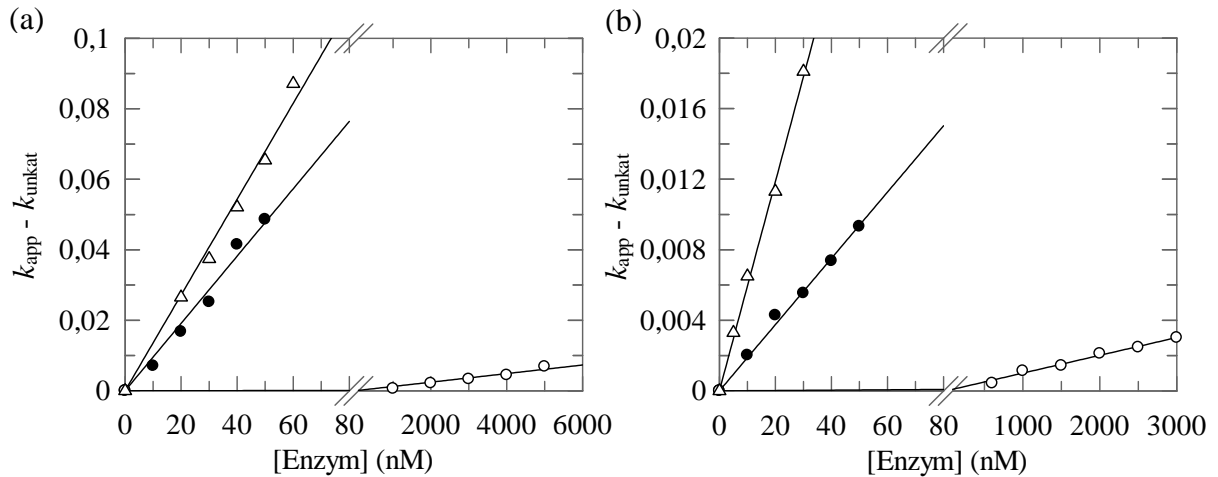


Abbildung 3-19: Katalytische Effizienz für die (a) Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung im Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*p*Na und (b) für die Rückfaltung von RCM-T1 durch die SlyD-SlpA Y81W-Chimäre (●), SlpA (○) und SlyD (Δ). Die Isomerisierung von 3 μM Tetrapeptid wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 416 nm (Spaltbreite 5 nm) nach Anregung bei 316 nm (Spaltbreite 3 nm) bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5, 1 mM EDTA bei 15 °C gemessen. Die Messungen der Rückfaltung von 0,1 μM RCM-T1 wurden anhand der Fluoreszenzänderung bei 320 nm (Spaltbreite 5 nm) nach Anregung bei 268 nm (Spaltbreite 3 nm) bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 M NaCl, bei 15 °C durchgeführt. Die Fluoreszenzverläufe wurden mit Gleichung 2-21 bzw. 2-30 analysiert. Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden als Funktion der Prolylisomerasekonzentration aufgetragen. Nach linearer Regression wurden aus den Geradensteigungen die Spezifitätskonstanten ermittelt ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ für die Tetrapeptidisomerisierung: 0,96 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Chimäre), 1,27 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (SlyD) und $1,22 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (SlpA) und $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ für die Rückfaltung von RCM-T1: 0,19 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Chimäre), 0,70 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (SlyD) und $1,01 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (SlpA)). Die Daten für SlyD wurden der Diplomarbeit von L. Carstensen entnommen.

Die katalytische Effizienz $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ eines Enzyms, wie sie in Abbildung 3-19 gezeigt ist, beschreibt seine Effizienz bei niedrigen Substratkonzentrationen. Die Chimäre aus SlyD und SlpA ist genau wie SlyD selbst ein äußerst effizienter Faltungshelfer. Die Funktion von SlyD als Faltungsenzym ist bereits sehr gut untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die enzymatischen Parameter k_{kat} und K_{M} durch die Chaperondomäne, also die IF-Domäne und nicht durch das aktive Zentrum der PPIase bestimmt werden. Um die Ursache der hohen Faltungsaktivität zu untersuchen, ist es notwendig, die enzymatischen Kenngrößen k_{kat} und K_{M} einzeln anhand einer Michaelis-Menten-Auftragung zu bestimmen. Dies wurde für die SlyD-SlpA Y81W-Chimäre durchgeführt. Für die Michaelis-Menten-Experimente wurde die Enzymkonzentration konstant gehalten und die Anfangsgeschwindigkeit der Faltung bei variierenden Konzentrationen von 0,1 bis 12 μM Substrat RCM-T1 gemessen. Da der Anteil der unkatalysierten Rückfaltung mit der RCM-T1-Konzentration linear zunimmt, wird bei hohen T1-Konzentrationen der Faltungsverlauf durch die unkatalysierte Faltung dominiert. Daher wurden die Faltungsexperimente nur bis zu einer maximalen Konzentration von 12 μM RCM-T1 durchgeführt. Die jeweiligen Beiträge von unkatalysierter und katalysierter Faltung wurden nach dem Verfahren von Kofron *et al.* (Kofron *et al.*, 1991) mit dem Programm *Scientist* ermittelt. Die Anfangsgeschwindigkeiten der katalysierten Faltungsreaktion in Abhängigkeit der Substratkonzentration sind in Abbildung 3-20 gezeigt.

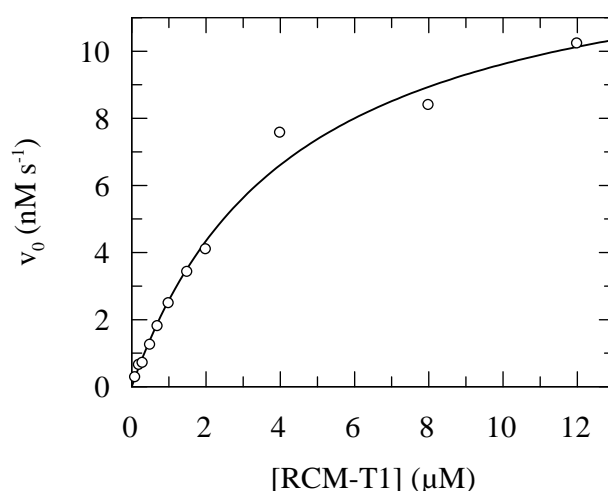


Abbildung 3-20: Michaelis-Menten Kinetik der durch 20 nM SlyD-SlpA Y81W-Chimäre katalysierten Rückfaltung von RCM-T1. Gezeigt ist die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der katalysierten Rückfaltung in Abhängigkeit der RCM-T1-Konzentration. Der Angleich der Michaelis-Menten-Gleichung (durchgezogene Linie) an die Messdaten liefert $v_{\max} = 13,8 \text{ nM s}^{-1}$, die Michaelis-Konstante $K_M = 4,35 \text{ μM}$ und die Umsatzzahl $k_{\text{kat}} = 0,69 \text{ s}^{-1}$. Die Messungen wurden in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 M NaCl bei 15 °C durchgeführt.

Der Verlauf der Kurve in Abbildung 3-20 zeigt den typischen Verlauf eines Michaelis-Menten-Enzyms. Die Analyse der Anfangsgeschwindigkeiten auf Grundlage der Michaelis-Menten-Gleichung liefert für die SlyD-SlpA Y81W-Chimäre eine Umsatzzahl k_{kat} von $0,69 \text{ s}^{-1}$ und eine Michaelis-Menten-Konstante K_M von $4,35 \text{ μM}$. Der Quotient aus diesen Werten ($k_{\text{kat}}/K_M = 0,16 \text{ μM}^{-1}\text{s}^{-1}$) stimmt gut mit den k_{kat}/K_M -Werten überein, die für Rückfaltung von RCM-T1 bei variierenden Enzymkonzentrationen ermittelt wurden ($k_{\text{kat}}/K_M = 0,19 \text{ μM}^{-1}\text{s}^{-1}$, Abbildung 3-19b). Die Umsatzzahl k_{kat} ist nahezu identisch zu SlyD ($k_{\text{kat}} = 0,7 \text{ s}^{-1}$). hFKBP12 besitzt bei 5 °C eine Umsatzzahl von 600 s^{-1} für die *cis/trans*-Isomerisierung der Leu-Pro-Bindung in Tetrapeptiden (Park *et al.*, 1992). Die deutlich geringeren k_{kat} -Werte für die Isomerasen mit zusätzlichen Chaperondomänen lassen vermuten, dass die Umsatzzahl in diesem Fall zusätzlich durch das Abdissoziieren von der Chaperondomäne und dem Weiterreichen zum aktiven Zentrum bestimmt wird. Allerdings ist auch die Rate der Dissoziation k_{off} , die für die SlpA-IF-Domäne bestimmt wurde, mit $17,6 \text{ s}^{-1}$ (Kapitel 3.1.5) 25fach größer als der k_{kat} -Wert.

Der K_M -Wert ist geringfügig höher als der für SlyD ermittelte Wert ($K_M = 1,65 \text{ μM}$) befindet sich jedoch in einem Bereich, der typisch ist für die Affinität von Faltungsenzymen gegenüber entfaltenen Proteinsubstraten. Ähnliche K_M -Werte wurden auch für RCM-T1 und Trigger-Faktor (Scholz *et al.*, 1997b) oder auch für andere Proteinsubstrate wie die N2-Domäne des G3P ermittelt (Jakob *et al.*, 2009). Diese Experimente zeigen, dass die IF-Domäne von SlpA in gleicher Art und Weise wie die IF-Domäne von SlyD die enzymatischen Parameter K_M und k_{kat} dominiert. Jedoch ist für eine effiziente Katalyse natürlich auch das Vorhandensein einer aktiven Prolylisomerasedomäne wie der FKBP-Domäne von SlyD essentiell.

3.2 Konstruktion artifizierlicher Faltungshelfer durch Kombination aus der PPIase hFKBP12 und nicht-verwandten Chaperondomänen

Faltungshelferenzyme besitzen häufig einen modularen Aufbau. Sie sind in mehreren Domänen organisiert, die verschiedene Aufgaben wahrnehmen. So kommt es häufig vor, dass die Bindung von entfaltenen Proteinketten, und die Katalyse des geschwindigkeitsbestimmenden Faltungsschrittes an verschiedenen Domänen innerhalb eines Faltungsenzymes stattfinden. Viele Prolylisomerasen besitzen eine Chaperondomäne, die entfaltete oder teilgefaltete Proteine bindet, die eigentliche Katalyse findet jedoch am aktiven Zentrum der PPIase statt. Ähnliches ist auch für die meisten Proteindisulfidisomerasen bekannt. Diese Enzyme besitzen katalytisch aktive Domänen, die die Disulfidbrückenbildung beschleunigen. Außerdem haben fast alle Disulfidisomerasen zusätzliche Binde- bzw. Chaperondomänen, die die Bindung an entfaltete Substrate vermitteln.

Am Beispiel der Prolylisomerase SlyD konnte dieser modulare Aufbau von Faltungsenzymen deutlich gezeigt werden. SlyD ist, wie auch hFKBP12, ein Vertreter der FKBP-Proteine. Im Gegensatz zu hFKBP12, das nur aus einer Prolylisomerasedomäne besteht, besitzt SlyD wie bereits ausgeführt eine zusätzliche Domäne, die IF-Domäne. hFKBP12 und SlyD sind beide hochaktive Prolylisomerasen aber nur SlyD ist ein effizienter Faltungshelfer für die prolinlimitierte Faltung von Proteinsubstraten. Um der Ursache der hohen Faltungsaktivität auf den Grund zu gehen, wurde zum Einen die IF-Domäne in SlyD deletiert, zum Anderen wurde die SlyD-IF-Domäne in den *flap* von hFKBP12 inseriert und somit das artifizierliche Faltungsenzym hFKBP12-IF konstruiert (Einleitung, Abbildung 1-4). Das SlyD-Konstrukt, in dem die IF-Domäne fehlt, hat jegliche Faltungshelferfunktion verloren, wohingegen durch die Insertion der IF-Domäne in hFKBP12 ein aktiver Faltungshelfer generiert werden konnte. Dies zeigte, dass die IF-Domäne als Chaperondomäne fungiert und somit für die Bindung an entfaltete Proteinsubstrate verantwortlich ist, was für eine effiziente Faltungsaktivität notwendig ist.

Diese Erkenntnisse warfen nun die Frage auf, ob die Steigerung der Faltungsaktivität durch Insertion einer Chaperondomäne nur auftritt, wenn es sich um homologe Enzyme handelt. SlyD und hFKBP12 gehören beide zur Familie der FKBP-Proteine und besitzen eine Sequenzidentität von 18 % und eine Sequenzähnlichkeit von 29 %. Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist auch die Struktur der beiden Isomerasedomänen sehr ähnlich. Ist die Steigerung der Faltungsaktivität durch eine zusätzliche Chaperondomäne ein genereller Effekt, der nur durch das Vorhandensein einer hydrophoben Bindedomäne bedingt ist, unabhängig von deren Herkunft, so sollte auch die Insertion einer nicht verwandten Chaperondomäne die Faltungsaktivität von hFKBP12 erhöhen. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit artifizierliche Faltungshelfer konstruiert, indem chimäre Proteine aus hFKBP12 und nicht homologen Substratbindungsdomänen generiert wurden. Dafür wurden die Chaperondomänen von Faltungsenzymen ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie auch in isolierter Form aktiv sind: die apikale Domäne von GroEL und die

Chaperondomäne des periplasmatischen Faltungshelfers SurA aus *Escherichia coli* und die b'-Domäne der Proteindisulfidisomerase aus *Saccharomyces cerevisiae*. In den folgenden Kapiteln soll nun die Konstruktion und die Aktivität dieser artifiziellen Faltungsenzyme beschrieben werden.

3.2.1 Die apikale Domäne von GroEL als Chaperondomäne

Der GroEL-Chaperonkomplex ist ein Homo-Oligomer das aus 14 Untereinheiten besteht, die zylinderförmig in zwei Ringen angeordnet sind. Im Inneren dieser zylinderförmigen Hohlräume findet die Faltung von neusynthetisierten oder fehlgefalteten Proteinen statt. Für die Funktion als Faltungsenzym wird zusätzlich das Cochaperon GroES und ATP als Energiequelle benötigt. Ein GroEL-Monomer ist aus drei Domänen aufgebaut: die äquatoriale Domäne (Reste 6 bis 133 und 409 bis 523), die für die ATP-Bindung verantwortlich ist, die apikale Domäne, die als Substratbindungsdomäne identifiziert wurde und die intermediäre Domäne (Reste 134 bis 190 und 377 bis 408), die beide miteinander verbindet (Abbildung 3-21a). Der Gruppe um Alan Fersht (Zahn *et al.*, 1996; Golbik *et al.*, 1998) gelang es, die apikale Domäne (Reste 188 bis 376) und ein verkürztes Fragment von dieser (Reste 191 bis 345) in isolierter Form herzustellen und zu untersuchen (Abbildung 3-21b).

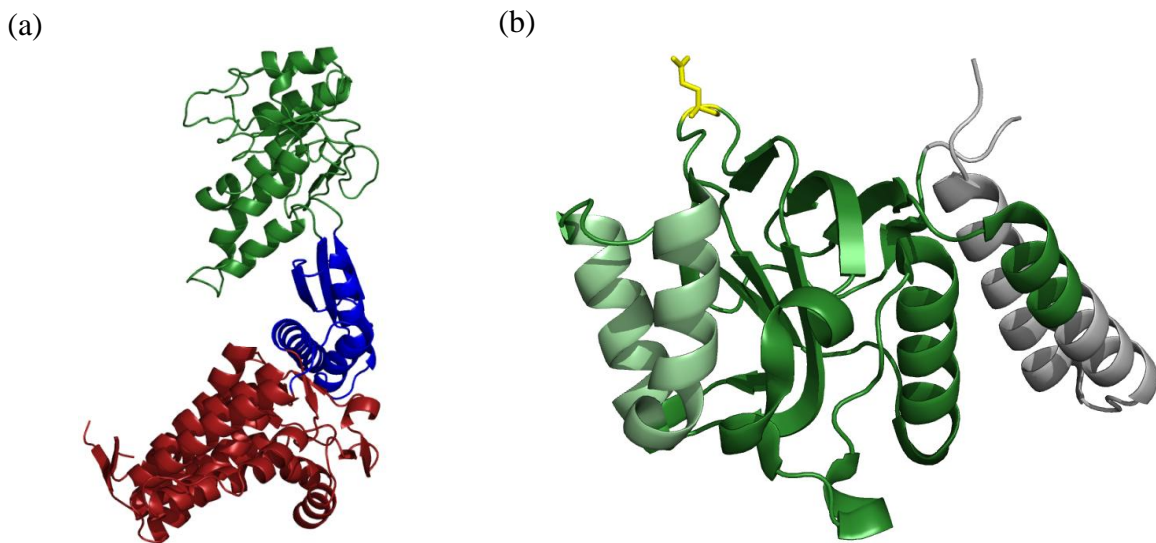


Abbildung 3-21: (a) Struktur des GroEL-Monomers. Die äquatoriale Domäne ist in rot, die intermediäre Domäne in blau und die apikale Domäne in grün gezeigt. (b) Struktur der apikalen Domäne, bestehend aus den Resten 188-376, dabei sind die Reste 191-245 in grün dargestellt, die in grau gezeigten Reste Helix H12 und der Anfang von Helix H11 wurden für die Konstruktion der GroEL-Chimäre nicht genutzt. Helix 8 und 9 die für die Substratbindung verantwortlich sind sind in hellgrün gezeigt (Feltham & Gierasch, 2000). Glutamat207, an dessen Stelle für die Bindungsexperimente im Rahmen dieser Arbeit ein Cystein eingeführt wurde, ist als Stäbchenmodell in gelb dargestellt. Die Abbildungen wurden mit Hilfe des Programmes Pymol (DeLano, 2003) unter Verwendung der pdb-Einträge 1AON (a) und 1LA1 (b) erstellt.

Es zeigte sich, dass diese Domäne auch in Isolation gefaltet und als funktionsfähiges Chaperon vorliegt. So sind sowohl das Volllängen- als auch das verkürzte Konstrukt der

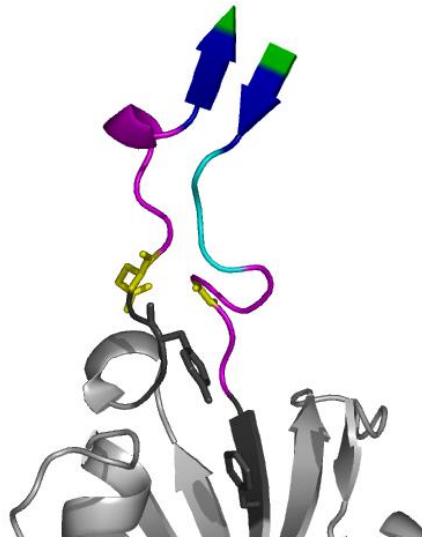
apikalen Domäne in der Lage, die Rückfaltung von Rhodanese und Cyclophilin A und die Entfaltung von Barnase zu katalysieren (Zahn *et al.*, 1996). Im Gegensatz zum GroEL/ES-Proteinkomplex ist die Chaperonaktivität der apikalen Domäne ATP-unabhängig. Demzufolge wurde die apikale Domäne als sogenanntes "Minichaperon" bezeichnet, da ihre Aktivität unabhängig vom zentralen Hohlraum und der allosterischen Regulation innerhalb des GroEL/ES-Komplexes ist.

In der Struktur der verkürzten apikalen Domäne ist der Bereich von Aminosäure 335 bis 345 der in der Struktur des Vollängenkonstruktes den Anfang der Helix H11 bildet nicht aufgelöst. Da aber das verkürzte Konstrukt die gleiche konformationelle Stabilität gegenüber Harnstoff zeigt wie das Vollängenkonstrukt, ist davon auszugehen, dass die beiden C-terminalen α -Helices für die Stabilität der apikalen Domäne nicht von Bedeutung sind. Die Analyse der thermisch-induzierten Entfaltung hat zudem gezeigt, dass diese beiden Helices eine separate Faltungseinheit bilden, die unter physiologischen Bedingungen schon zu 50 % entfaltet vorliegen ($T_M = 34,4$ °C). Es wird vermutet, dass Helix H11 und H12 nur für die Bewegung der apikalen Domänen innerhalb des GroEL-Ringes von Bedeutung sind und somit essentiell für die kooperative Bindung der GroEL-Untereinheiten (Golbik *et al.*, 1998). Auch für die Rückfaltung von Cyclophilin A und Rhodanese ergeben sich sowohl für die beiden verschiedenen Konstrukte der apikalen Domäne, als auch für den GroEL/ES-Komplex identische Ratenkonstanten. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die verkürzte Variante der apikalen Domäne als Chaperondomäne geeignet ist, um ein artifizielles Faltungsenzym zu konstruieren.

3.2.2 Die Länge des Linkers zwischen den Domänen der GroEL-Chimäre ist kritisch für Stabilität und Aktivität

Die Konstruktion der artifiziiellen Faltungshelfer erfolgte basierend auf den bisherigen Erkenntnissen zum Faltungsenzym hFKBP12-IF (Abbildung 1-4, Abbildung 3-22a). Hier wurde die IF-Domäne von SlyD anstelle des *flap* in hFKBP12 inseriert. Als flankierende Sequenzen wurden die in allen FKBP-Proteinen hochkonservierten Motive AYG (N-terminal) und LXF (C-terminal) genutzt. Entsprechend wurden auch die Aminosäuren 191 bis 345 der apikalen Domäne in hFKBP12 anstelle des *flap* inseriert und somit die erste Variante der GroEL-Chimäre erzeugt (im Folgenden als GroEL-Chimäre 1 bezeichnet, Abbildung 3-22b). Um einen ausreichenden Abstand und somit genug Flexibilität zwischen den Domänen zu gewährleisten, wurden die glycinreichen Linker GTGGSE (N-terminal) und GGSETS (C-terminal) eingefügt (grau, Abbildung 3-22b).

(a)



(b)

<i>hFKBP12</i>	FKBP-AYG-----ATGHGPIIPPHAT-----LVF-FKBP
<i>E. coli SlyD</i>	SlyD-AYGQYDENLVQRVPKDVFMGVDELQVGMRFLEAETDQGPVPEITAVEDDHVVVDGNHMLAGQNLKF-SlyD
<i>hFKBP12-IF</i>	FKBP-AYGQYDENLVQRVPKDVFMGVDELQVGMRFLEAETDQGPVPEITAVEDDHVVVDGNHMLAGQNLKF-FKBP
<i>GroEL-Chimäre1</i>	FKBP-AYGGTGGSE---EGMQFD-----apikale-Domäne-----AAIQGR-----GGSETSLVF-FKBP
<i>GroEL-Chimäre2</i>	FKBP-AYGQYDENL---EGMQFD-----apikale-Domäne-----AAIQGR-----MLAGQNLVF-FKBP
<i>GroEL-Chimäre3</i>	FKBP-AYGQYDENLGG-EGMQFD-----apikale-Domäne-----AAIQGR-----GGMLAGQNLVF-FKBP
<i>GroEL-Chimäre4</i>	FKBP-AYGQYDENL---EGMQFD-----apikale-Domäne-----AAIQGR-----MLAGQNLVF-FKBP
<i>GroEL-Chimäre5</i>	FKBP-AYGQYDENL---EGMQFD-----apikale-Domäne-----AAIQGR-----GNHMLAGQNLVF-FKBP
<i>GroEL-Chimäre6</i>	FKBP-AYGQYDENLVQ-EGMQFD-----apikale-Domäne-----AAIQGR-VDGNHMLAGQNLVF-FKBP
<i>GroEL-Chimäre7</i>	FKBP-AYGQYDENLVQREGMQFD-----apikale-Domäne-----AAIQGRVVDGNHMLAGQNLVF-FKBP
<i>GroEL-Chimäre7 SS</i>	FKBP-AYGQYDENLVQREGMQFD-----apikale-Domäne-----AAIQGRVVDGNHMLACQNLVF-FKBP

Abbildung 3-22: (a) Tertiärstruktur des Linkerbereiches von hFKBP12-IF. Die FKBP-Domäne von hFKBP12 ist in hellgrau dargestellt, die konservierten Tripeptide in schwarz. Die für die Katalyse essentiellen Reste Tyr82 und Phe99 innerhalb dieser Tripeptide sind als Stäbchenmodell gezeigt. Die Linkersequenzen der GroEL-Chimäre 2 aus SlyD sind in magenta, die Linkersequenz der GroEL-Chimäre 5 in cyan, der GroEL-Chimäre 6 in blau und der GroEL-Chimäre 7 in hellgrün. Die Aminosäuren Gln und Gly die zu Cys mutiert wurden, sind als Stäbchenmodell in gelb gezeigt. Die Abbildungen wurden mit Hilfe des Programmes Pymol (DeLano, 2003) erstellt. (b) Sequenzvergleich der verschiedenen konstruierten GroEL-Chimären. Das Sequenzalignment wurde mit Hilfe des Programmes BioEdit/Clustal W erstellt (Hall, 1999). Die FKBP-Domänen von hFKBP12 und SlyD und der *flap* von hFKBP12 sind in hellgrau dargestellt, die IF-Domäne von SlyD in magenta, die konservierten Tripeptide in schwarz. Die apikale Domäne von GroEL ist in dunkelgrün gezeigt. Der glycinreiche Linker in der GroEL-Chimäre 1 und die zusätzliche Glycine in GroEL-Chimäre 3 sind in hellgrau dargestellt, die Linkersequenzen der GroEL-Chimäre 2 aus SlyD entsprechend der IF-Domäne in magenta, die Linkersequenz der GroEL-Chimäre 5 in cyan, der GroEL-Chimäre 6 in blau und der GroEL-Chimäre 7 in hellgrün. Die eingeführten Cysteine sind in gelb dargestellt.

Um den Einfluss der Insertion der apikalen Domäne in hFKBP12 sowohl auf die "Wirtsdomäne" als auch auf die "Gastdomäne" zu untersuchen, wurde die Stabilität der GroEL-Chimäre 1 gegenüber Entfaltung durch Harnstoff untersucht. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass das einzige Tryptophan von hFKBP12 (Trp 59) im nativen Zustand im Inneren des Proteins lokalisiert ist und daher seine Fluoreszenz stark gelöscht wird (Egan *et al.*, 1993). Bei der Entfaltung wird es nach außen exponiert und es kommt zu einem enormen Fluoreszenzanstieg, der somit auch in den chimären Proteinen als Sonde für die Entfaltung der FKBP-Domäne genutzt werden kann.

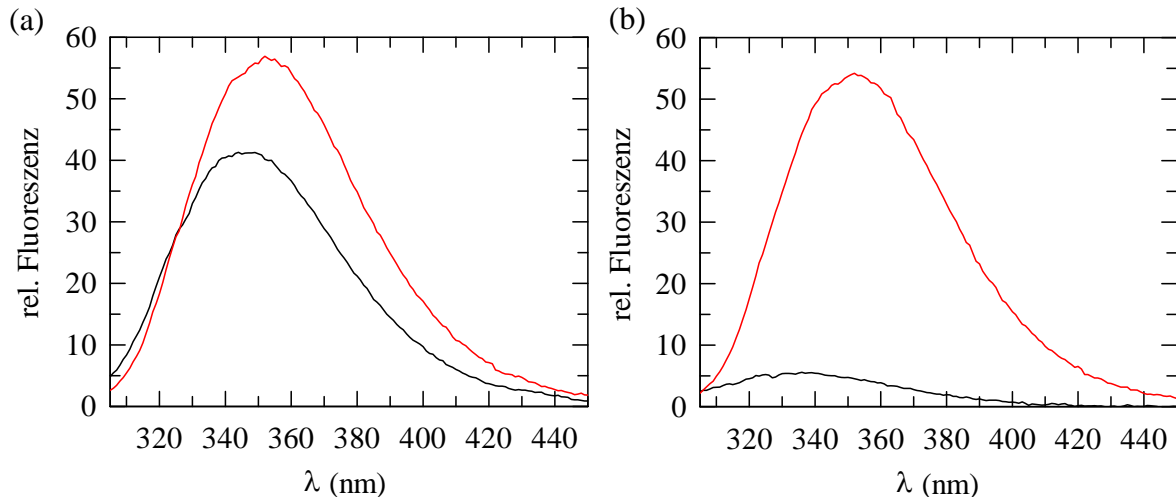


Abbildung 3-23: Fluoreszenzspektren der GroEL-Chimäre 1 und von hFKBP12. Gezeigt sind (a) die Fluoreszenzspektren der GroEL-Chimäre 1 und (b) von hFKBP12 in 0 M Harnstoff (schwarz) und 6 M Harnstoff (rot) nach Anregung bei 295 nm. Die Spektren wurden mit 1 μ M Protein in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 mit einer Schichtdicke von 1 cm, Bandbreiten von 3 nm (Anregungsspalt) und 3 nm (Emissionsspalt) bei 15 °C aufgenommen.

Abbildung 3-23a zeigt die Fluoreszenzspektren des chimären Proteins. Bei einem Vergleich mit den Spektren des isolierten hFKBP12 (Abbildung 3-23b) fällt auf, dass die Fluoreszenz der GroEL-Chimäre 1 bei 0 M Harnstoff deutlich höher ist, als die von isoliertem hFKBP12 bei 0 M Harnstoff. Die Intensität der Fluoreszenz der GroEL-Chimäre bei 0 M Harnstoff lässt darauf schließen, dass die Chimäre möglicherweise zu etwa 70 % entfaltet vorliegt. Dies zeigt, dass in der GroEL-Chimäre 1 die FKBP-Domäne durch Insertion der apikalen Domäne so stark destabilisiert ist, dass das Protein bei 0 M Harnstoff schon zum großen Teil entfaltet vorliegt. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Fluoreszenzspektren in Anwesenheit von Na_2SO_4 gemessen, welches als stark stabilisierendes Salz fungiert und somit die Bildung der nativen Struktur begünstigen sollte (Daten nicht gezeigt). Dies konnte auch bestätigt werden: in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen an Na_2SO_4 kommt es zu einer Fluoreszenzabnahme, also demzufolge zu einer Zunahme der nativen Struktur, was wiederum zeigt, dass die Insertion der apikalen Domäne hFKBP12 stark destabilisiert. Um genauere Aussagen über die Stabilität der beiden Domänen im chimären Protein zu machen, wurde ein Harnstoff-induzierter Entfaltungübergang gemessen. Wie die Fluoreszenzspektren schon vermuten ließen, konnte für die FKBP-Domäne kein Übergang beobachtet werden. Jedoch kann anhand der Tyr-Fluoreszenz die Entfaltung der apikalen Domäne verfolgt werden (Abbildung 3-24b). Im Vergleich zur isolierten apikalen Domäne ($[\text{Harnstoff}]_{\text{M}} = 2,38 \text{ M}$) ist die apikale Domäne innerhalb der GroEL-Chimäre 1 zwar destabilisiert ($[\text{Harnstoff}]_{\text{M}} = 1,94 \text{ M}$), liegt jedoch im Gegensatz zur FKBP-Domäne vollständig gefaltet vor (Tabelle 3-7). Die Stabilitätsdaten der GroEL-Chimäre 1 sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst. Sie zeigen, dass bei Insertion einer Gast-Domäne, besonders die Wirts-Domäne in ihrer Stabilität beeinflusst wird. Es kommt zu einer Erhöhung der Entropie,

die durch den Verlust von kovalenten Kontakten innerhalb des Schleife von hFKBP12 hervorgerufen wird.

Zusätzlich zur Stabilität ist es notwendig auch die Aktivität der Prolylisomerase zu untersuchen. Die Prolylisomeraseaktivität wird mit Hilfe des schon in Kapitel 3.1.2 beschriebenen proteasefreien Peptidtests untersucht (Zoldák *et al.*, 2009a). Die Peptide haben die allgemeine Form Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-*p*Na. In wasserfreiem Trifluorethanol und 0,55 M Lithiumchlorid liegt das Isomerisierungsgleichgewicht der Prolylbindung zu 50 bis 70 % auf der Seite der *cis*-Konformation, durch Überführen des Peptids in wässrige Umgebung kommt es zur *cis/trans*-Isomerisierung und demzufolge zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignales. PPIasen beschleunigen die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung der Tetrapeptide und somit kann die Aktivität des katalytischen Zentrums der PPIase bestimmt werden, da die Peptide vorwiegend dort binden. Im Folgenden wird für diesen Test der Prolylisomeraseaktivität immer das Peptid mit der Leu-Pro-Sequenz verwendet (Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*p*Na), da für hFKBP12 bekannt ist, dass es für Peptide, die einen hydrophoben Rest an der P1-Position (AS vor Prolin) tragen, besonders hohe Aktivität zeigt (Harrison & Stein, 1990). Dieser Peptidtest soll künftig als Maß für die Aktivität der FKBP-Domäne in den chimären Proteinen dienen.

Die GroEL-Chimäre 1 zeigt im Peptidtest eine sehr geringe Aktivität, die nur 0,02 % der Aktivität von isoliertem hFKBP12 entspricht (Tabelle 3-7). Dies korreliert mit den Stabilitätsdaten. Da die FKBP-Domäne vermutlich vollständig entfaltet vorliegt, hat sie nahezu ihre gesamte Prolylisomeraseaktivität verloren. Um die FKBP-Domäne zu stabilisieren und somit ihre Aktivität zurückzugewinnen, wurden anstelle des glycinreichen Linkers jeweils sechs Aminosäuren des natürlichen Linkers aus SlyD eingeführt und somit die GroEL-Chimäre 2 konstruiert (Abbildung 3-22).

Die Harnstoff-induzierte Entfaltung wurde erneut mit Hilfe der Trp-Fluoreszenz (Sonde für die Entfaltung der FKBP-Domäne) und der Tyr-Fluoreszenz (Sonde für die Entfaltung der apikalen Domäne) untersucht. In Abbildung 3-24 (a) ist gezeigt, dass im Gegensatz zu der GroEL-Chimäre 1 das Ende des Überganges der FKBP-Domäne detektiert werden konnte. Jedoch liegt diese schon bei Harnstoffkonzentrationen oberhalb von 1 M nahezu vollständig entfaltet vor. Die apikale Domäne konnte durch den Einbau des natürlichen Linkers stabilisiert werden und besitzt in der GroEL-Chimäre 2 die gleiche Stabilität wie die isolierte apikale Domäne (Abbildung 3-24b, Tabelle 3-7). Vermutlich sind die Linkerbereiche nicht vollkommen unstrukturiert, sondern bilden Wechselwirkungen aus, die in günstigen entropischen Effekten für die Termini der apikalen Domäne resultieren. Die Stabilisierung der FKBP-Domäne zeigt sich auch in der wiedergewonnenen Prolylisomeraseaktivität, die nun etwa 2,5 % der Aktivität von hFKBP12 entspricht (Abb 3-25, Tabelle 3-7).

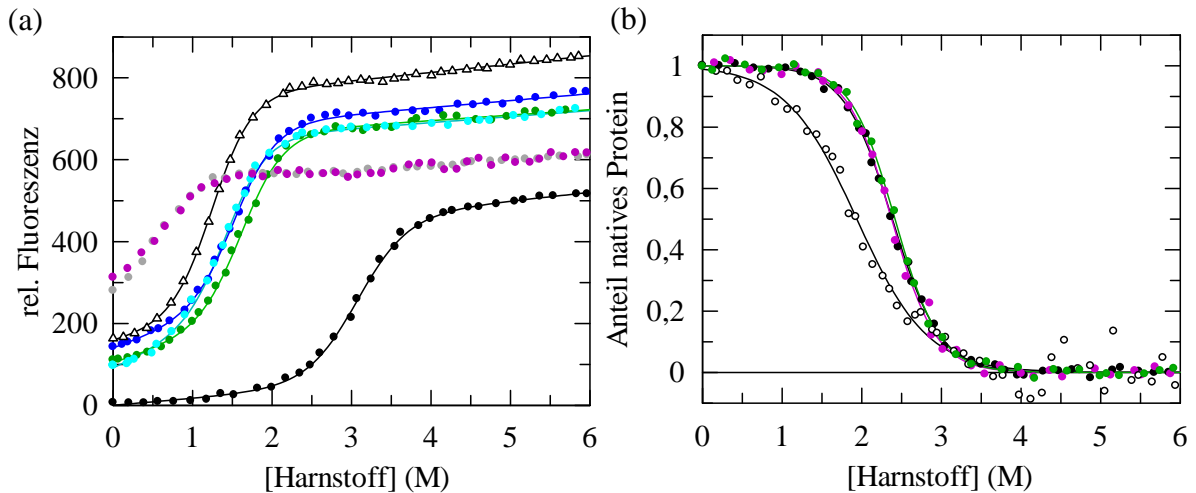


Abbildung 3-24: Harnstoff-induzierte Entfaltung der verschiedenen Varianten der GroEL-Chimäre. (a) Dargestellt ist die Entfaltung der FKBP-Domäne in der GroEL-Chimäre 2 (●), GroEL-Chimäre 3 (○), GroEL-Chimäre 4 (Δ), GroEL-Chimäre 5 (●), GroEL-Chimäre 6 (●), GroEL-Chimäre 7 (●) und von hFKBP12 (●). Die Entfaltung wurde anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. (b) Gezeigt sind die normierten Entfaltungsübergänge der apikalen Domäne in den Chimären exemplarisch für GroEL-Chimäre 1 (○), GroEL-Chimäre 2 (●), GroEL-Chimäre 7 (●) und von der isolierten apikalen Domäne (●). Das CD-Signal bei 217 nm bzw. das Fluoreszenzsignal bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm diente dabei als Sonde für die Entfaltung der apikalen Domäne. Die Übergänge wurden mit 2 μM Protein bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 bei 15 °C gemessen. Die Bandbreiten betragen 3 nm für das Anregungs- bzw. 5 nm für das Emissionslicht für die Fluoreszenzmessungen bzw. 1 nm für die CD-Messungen. Die Linien stellen den Angleich eines Zweizustandsmodells an die Daten dar. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Ziel der Fusion von FKBP-Domäne und der apikalen Domäne als Chaperondomäne war es jedoch, ein effizientes Faltungsenzym zu generieren. Um die Faltungsaktivität der GroEL-Chimäre 2 zu untersuchen, wurde ihr Einfluss auf die prolinlimitierte Rückfaltung von RNaseT1 analysiert. Für diesen Faltungstest wurde die schon in Kapitel 3.1.3 beschriebene reduzierte und carboxymethylierte Variante von S54G/P55N-RNaseT1 (RCM-T1) verwendet. Die Rückfaltung von RCM-T1 ist limitiert durch die langsame *trans/cis*-Isomerisierung an Pro39. Handelt es sich bei den konstruierten Enzymen um gute Faltungshelfer, sind diese in der Lage, die mit einer Zeitkonstante von 500 s sehr langsame Rückfaltung von RCM-T1 zu beschleunigen. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass hFKBP12 eine sehr geringe Proteinfaltungsaktivität aufweist, da es keine Chaperondomäne besitzt (Knappe *et al.*, 2007). Die GroEL-Chimäre 2 ist zwar in der Lage, die Rückfaltung von RCM-T1 zu beschleunigen, jedoch liegt die Spezifitätskonstante für die Proteinrückfaltung im selben Bereich wie für hFKBP12 (Tabelle 3-7). Die Verlängerung des Linkers durch zwei „nicht natürliche“ Glycine (GroEL-Chimäre 3) ergab keinen Gewinn in Stabilität oder Aktivität. Dies zeigt, dass der natürliche Linker vermutlich eine definierte Struktur annimmt und somit die FKBP-Domäne stabilisieren kann. Dies ist durch die beiden Glycine nicht möglich.

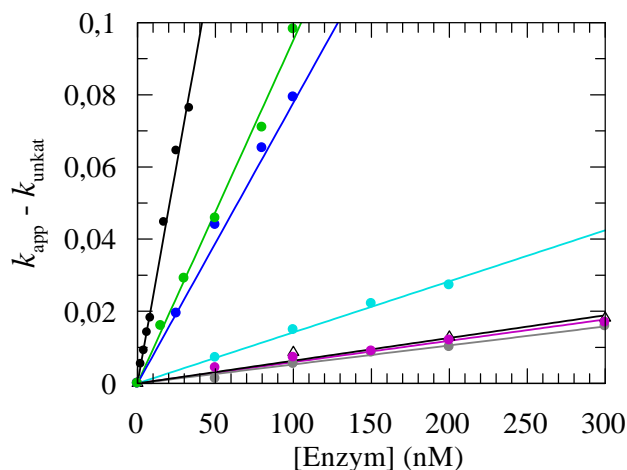


Abbildung 3-25: Prolylisomeraseaktivität der GroEL-Chimären. Dargestellt ist die katalytische Aktivität der GroEL-Chimäre 2 (●), GroEL-Chimäre 3 (●), GroEL-Chimäre 4 (Δ), GroEL-Chimäre 5 (●), GroEL-Chimäre 6 (●), GroEL-Chimäre 7 (●) und von hFKBP12 (●) für die Prolylisomerisierung von 3 μ M Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*p*Na. Die Messungen zur Peptidaktivität wurden anhand der Fluoreszenzänderung bei 416 nm (Spaltbreite 5 nm) nach Anregung bei 316 nm (Spaltbreite 3 nm) bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5, 1 mM EDTA bei 15 °C durchgeführt.

In einer weiteren Variante, der GroEL-Chimäre 4, wurde der C-terminale His-*tag* entfernt. Dies führte zu einer Stabilisierung der FKBP-Domäne um etwa 1 M Harnstoff (Abbildung 3-24), die FKBP-Domäne liegt nun bei 0 M Harnstoff vollständig gefaltet vor. Jedoch resultierte das Entfernen des His-*tag* nicht in einer erhöhten Prolylisomeraseaktivität. Die Aktivität der FKBP-Domäne wird durch die Insertion der apikalen Domäne stark beeinflusst, da der Insertionsort sehr nahe am aktiven Zentrum liegt. Der Blattstrang β_6 , der C-terminal an den *flap* von hFKBP12 anschließt (Abbildung 1-4, Abbildung 3-22a), ist vermutlich am stärksten durch die Insertion beeinflusst. Da sich hier für die Katalyse essentielle Reste befinden (besonders F99 von FKBP12 im LVF-Motiv), spiegelt sich ein "Aufweichen" der Struktur durch die Domäneninsertion deutlich in der Prolylisomeraseaktivität wider. Das Entfernen des His-*tag* führt zwar zu einer generellen Stabilisierung der FKBP-Domäne, das aktive Zentrum ist durch die Insertion jedoch immer noch stark beeinträchtigt. Um diese Beeinträchtigung zu kompensieren, wurde der C-terminale Linker nochmals um drei Aminosäuren verlängert (GNH, Abbildung 3-22) und somit die GroEL-Chimäre 5 konstruiert. Da das C-terminale LVF-Motiv sehr viel weiter innerhalb des aktiven Zentrums lokalisiert ist (Abbildung 3-22) waren die Linkersequenzen in den bisherigen chimären Konstrukten nicht symmetrisch. Aufgrund der C-terminalen Verlängerung des Linkers mit der natürlichen Sequenz aus SlyD scheint der Linker nun C- und N-terminal die gleiche Länge zu besitzen, vorausgesetzt er ist auf die gleiche Weise strukturiert wie in hFKBP12-IF (Abbildung 1-4, Abbildung 3-22).

Für die GroEL-Chimäre 5 zeigt sich, dass durch die nun symmetrischen Linker erneut eine Stabilisierung der FKBP-Domäne erzielt werden konnte. Sie besitzt nun einen Übergangsmittelpunkt von 1,4 M Harnstoff (Abbildung 3-24a, Tabelle 3-7). Für die apikale Domäne konnte keine weitere Stabilisierung erzielt werden (Abbildung 3-24b, Tabelle 3-7).

Da aufgrund der Kristallstruktur (Abbildung 3-21b) anzunehmen ist, dass die Enden der apikalen Domäne unstrukturiert vorliegen, scheint die "Symmetrie" des Linkers auf die apikale Domäne keinen großen Einfluss zu haben. Die Prolylisomeraseaktivität korreliert erneut mit dem Anstieg der Stabilität. Die GroEL-Chimäre 5 besitzt bereits 6 % der Aktivität von hFKBP12. Im Vergleich zur GroEL-Chimäre 2 zeigte sich für die Proteinfaltungsaktivität keine deutliche Veränderung (Tabelle 3-7). Für weitere chimäre Konstrukte wurden wiederum jeweils zwei bzw. eine zusätzliche AS des Linkers aus SlyD eingeführt und somit GroEL-Chimäre 6 und 7 konstruiert (Abbildung 3-22).

Die FKBP-Domäne in der GroEL-Chimäre 6 und 7 konnte durch die Linkerverlängerung erneut stabilisiert werden und zeigt Übergangsmittelpunkte von 1,53 bzw. 1,64 M Harnstoff (Abbildung 3-24a, Tabelle 3-7). Auch die apikale Domäne wurde durch die Linkerverlängerung stabilisiert, entspricht dabei jedoch im Rahmen des Fehlers der Stabilität der isolierten apikalen Domäne (Abbildung 3-24b, Tabelle 3-7). Die Stabilisierung der FKBP-Domäne spiegelt sich in einem starken Anstieg der Prolylisomeraseaktivität wider, die GroEL-Chimäre 6 besitzt 33 % und GroEL-Chimäre 7 40 % der Aktivität von hFKBP12. Bemerkenswert ist, dass obwohl die Peptidaktivität noch stark beeinträchtigt ist, die Faltungsaktivität für beide Chimären im Vergleich zu hFKBP12 deutlich gesteigert, sogar verdoppelt werden konnte (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Stabilitätsdaten und katalytische Aktivität der GroEL-Chimären.

Variante	Harnstoff-induzierte Entfaltung				Spezifitätskonstante k_{kat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
	FKBP Domäne		Chaperon Domäne		Tetrapeptid- Isomerisierung	RCM-T1 Rückfaltung
	[Hst.] _{1/2} (M)	m ($\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$)	[Hst.] _{1/2} (M)	m ($\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$)		
hFKBP12	3,04	6,9	-	-	2400	15
apikale Domäne	-	-	2,38	8,0	-	-
GroEL-Chimäre1	-	-	1,94	5,3	0,4	-
GroEL-Chimäre2	< 1,50	-	2,33	8,5	59	9,8
GroEL-Chimäre3	< 1,50	-	2,25	8,3	53	n.b.
GroEL-Chimäre4	1,26	9,1	2,20	6,7	61	n.b.
GroEL-Chimäre5	1,40	9,4	2,33	7,6	140	7,3
GroEL-Chimäre6	1,53	9,0	2,46	13,7	780	33
GroEL-Chimäre7	1,64	8,9	2,46	8,6	950	24
GroEL-Chimäre7 SS ox.	1,25	8,8	3,92	8,3	205	22
GroEL-Chimäre7 SS red.	< 1,50	-	2,55	8,7	-	-

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte [Harnstoff]_{1/2} ([Hst.]_{1/2}) und die Kooperativitätsparameter m ($m = \delta G_D / \delta [\text{Harnstoff}]$). Die Harnstoff-induzierte Entfaltung wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm (FKBP-Domäne) und bei 310 nm nach Anregung bei 280 nm (Sonde apikale Domäne, isolierte apikale Domäne und GroEL-Chimäre 1, 3, 4, 5, 6) bzw. anhand der Änderung des CD-Signals bei 222 nm (Sonde apikale Domäne, GroEL-Chimäre 2, 7 und 7 SS) verfolgt. Die Analyse der Daten erfolgte auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells. Die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung in 3 μM Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-pNa und die Rückfaltung von 0,1 μM RCM-T1 wurde in Abhängigkeit von der Prolylisomerasekonzentration bei 15 °C untersucht und die Fluoreszenzverläufe mit Gleichung 2-21 bzw. 2-30 analysiert. Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden als Funktion der Prolylisomerasekonzentration aufgetragen und die Spezifitätskonstante nach linearer Regression aus der Geradensteigung berechnet. n.b.: nicht bestimmt.

3.2.3 Das Einführen einer Disulfidbrücke lässt Stabilität und Aktivität unbeeinflusst

Die Konstruktion der verschiedenen Varianten der GroEL-Chimäre hatte gezeigt, dass eine Möglichkeit die Wirts-Domäne zu stabilisieren, die Optimierung der Linkersequenz ist. Als Vorbild diente hier die Linkersequenz der Prolylisomerase SlyD, die schon natürlicherweise eine insertierte Chaperondomäne innerhalb der FKBP-Domäne besitzt. Eine weitere Möglichkeit die Gast-Domäne zu stabilisieren, ist der Einbau einer Disulfidbrücke im Übergangsbereich zwischen den beiden Domänen. Das Einführen einer Disulfidbrücke könnte die Interaktionen der Faltblattstränge $\beta 5$ und $\beta 6$ wiederherstellen, und somit einen entropisch günstigen Stabilitätsbeitrag liefern. Die Aminosäuren Glutamin und Glycin im Linkerbereich der GroEL-Chimäre 7 wurden durch Cysteine substituiert und somit die GroEL-Chimäre 7 SS konstruiert. Diese Aminosäuren wurden ausgewählt, da in der Struktur von hFKBP12-IF (Abbildung 1-4, Abbildung 3-22a) der Abstand zwischen den beiden C_{α} -Kohlenstoffatomen nur 4,14 Å beträgt, was ein günstiger Abstand für die Ausbildung einer Disulfidbrücke ist (Thornton, 1981).

Um den Effekt der Disulfidbrücke und den Einfluß der eingeführten Cysteine auf beide Domänen zu untersuchen, wurden Harnstoff-induzierte Übergänge in Abwesenheit und Anwesenheit von Reduktionsmittel gemessen (Abbildung 3-26).

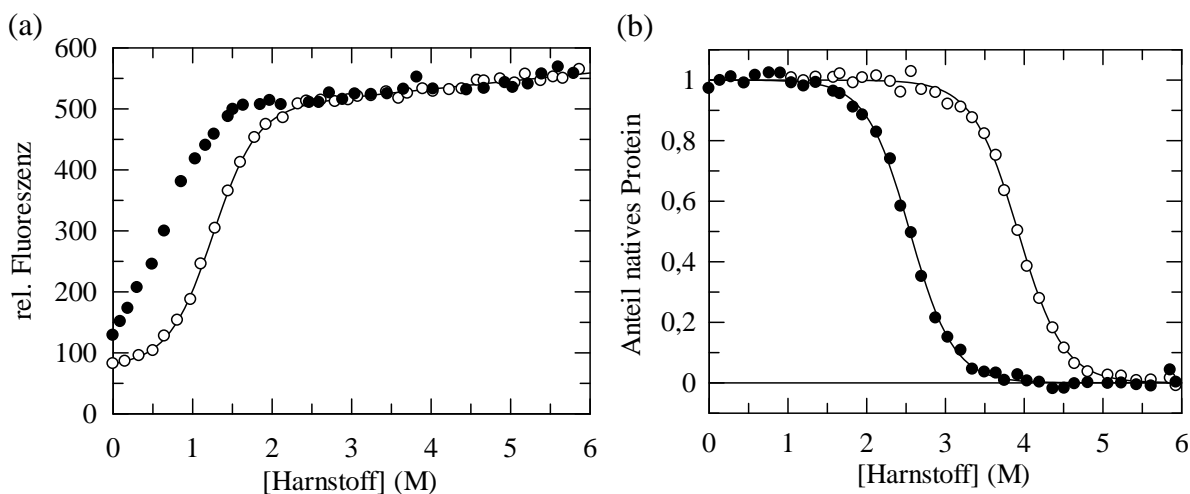


Abbildung 3-26: Harnstoff-induzierte Entfaltung der GroEL-Chimäre 7 SS im oxidierten Zustand (○), und im reduzierten Zustand (●). (a) Dargestellt ist die Änderung des Fluoreszenzsignals bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm, welches als Sonde für die Entfaltung der FKBP-Domäne dient. (b) Gezeigt sind die normierten Entfaltungsübergänge der apikalen Domäne von GroEL in der GroEL-Chimäre 7 SS. Das CD-Signal bei 222 nm diente dabei als Sonde für die Entfaltung der apikalen Domäne. Die Übergänge wurden mit 2 μ M Protein bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat pH 7,5 bei 15 °C gemessen, für die Messung unter reduzierenden Bedingungen enthielt der Messpuffer zusätzlich 1 mM TCEP. Die Bandbreiten betragen 3 nm für das Anregungs- bzw. 5 nm für das Emissionslicht für die Fluoreszenzmessungen bzw. 1 nm für die CD-Messungen. Die Linien entsprechen der Auswertung der Daten gemäß eines Zweizustandsmodells. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Im oxidierten Zustand liegt die FKBP-Domäne gefaltet vor, es konnte jedoch keine deutliche Erhöhung der Stabilität im Gegensatz zur GroEL-Chimäre 7 festgestellt werden. Mit 1,25 M

Harnstoff liegt der Übergangsmittelpunkt sogar noch unterhalb des Übergangsmittelpunktes der GroEL-Chimäre 7 ($[\text{Harnstoff}]_{1/2} = 1,64 \text{ M}$). Möglicherweise wirken die Cysteine an sich schon destabilisierend. Die Stabilität der reduzierten GroEL-Chimäre 7 SS bestätigt diese Annahme. Das Einführen der Cysteine ist *per se* energetisch ungünstig, die GroEL-Chimäre 7 SS liegt im reduzierten Zustand bei 0 M Harnstoff nicht vollständig gefaltet vor. Diese Destabilisierung kann durch die Ausbildung der Disulfidbrücke nicht kompensiert werden. Würden die Cysteine keinen Einfluss auf die Stabilität haben, wäre die Stabilität der reduzierten Chimäre vergleichbar mit der von Variante 7, da die Linkersequenzen bis auf die Cysteine identisch sind. Möglicherweise ist der Linker der GroEL-Chimäre für die Stabilität der FKBP-Domäne schon optimal. Auch die Peptidaktivität, die nur noch ca. 22 % der von GroEL-Chimäre 7 entspricht, scheint dies zu bestätigen. Bei Betrachtung der Stabilität der apikalen Domäne zeigt sich jedoch, dass das Einführen der Disulfidbrücke für die Gast-Domäne einen enormen Stabilitätsgewinn gebracht hat. Die Disulfidbrücke, und damit das "Klammern" der Enden der apikalen Domäne, erhöht die Stabilität der Chaperondomäne von 2,46 auf 3,92 M Harnstoff. Diese enorme Stabilisierung ist schwer zu erklären. Möglicherweise werden durch das Zusammenbringen der Termini die Anordnungsmöglichkeiten der Peptidkette verringert, was einen günstigen entropischen Beitrag liefert.

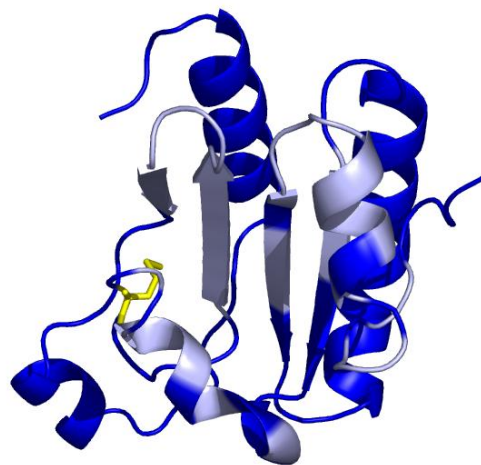
3.2.4 Die b'-Domäne von PDI aus *S. cerevisiae* als Chaperondomäne

Am Beispiel der GroEL-Chimäre konnte gezeigt werden, dass die Faltungshelferfunktion von hFKBP12 durch Insertion einer nicht-verwandten Chaperondomäne verbessert werden kann und somit stabile und funktionsfähige Enzyme konstruiert werden können. Aber ist das auch möglich, mit Proteinbindedomänen, die nicht als "klassische" Chaperone angesehen werden? Zu diesen Proteinen gehören die Proteindisulfidisomerasen. Zu den eukaryontischen Proteindisulfidisomerasen (PDI) gehören ca. 20 Proteine, die im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind. Sie sind in der Lage Disulfidbrücken zu bilden, aufzulösen oder zu isomerisieren. Zudem besitzen sie *in vitro* und *in vivo* Chaperonfunktion, unabhängig von ihrer Redoxfunktion, womit sie eine entscheidende Rolle in der Qualitätskontrolle innerhalb des ER einnehmen. Sie sind aus vier Domänen aufgebaut, nämlich zwei katalytisch aktiven Thioredoxindomänen a und a' und zwei inaktiven Thioredoxindomänen b und b'. Zwischen b' und a' existiert eine zusätzliche Schleife, die als x-Region bezeichnet wird (Pirneskoski *et al.*, 2004). Die Domänen sind in der Form abb'xa'c hufeisenförmig angeordnet (Tian *et al.*, 2006), wobei c dem C-terminalen Bereich mit der ER-Erkennungssequenz entspricht. Der b- und b'-Domäne wird die Funktion der Substratbindung zugeschrieben, wobei die b'-Domäne dabei die wichtigste Rolle spielt (Klappa *et al.*, 1998). Dies zeigt sich auch darin, dass das b'a'-Fragment eine ähnlich hohe PDI-Aktivität zeigt, wie das gesamte Protein (Pirneskoski *et al.*, 2001).

Da die b'-Domäne Chaperoneigenschaften besitzt und für den Großteil der Substratbindung verantwortlich ist, wurde diese als Chaperondomäne ausgewählt, um ein neues chimäres

Konstrukt aus der PPIase hFKBP12 und einer Substratbindungsdomäne zu generieren. Für dieses chimäre Konstrukt wurden AS 237 bis AS 362 der b'-Domäne verwendet. Für humane PDI ist bekannt, dass die b'-Domäne auch in Isolation bzw. in Kombination mit der a'-Domäne gefaltet und funktional vorliegt (Pirneskoski *et al.*, 2004). Um die Flexibilität zwischen den beiden Domänen zu gewährleisten, wurde der in GroEL-Chimäre 7 optimierte Linker aus SlyD und zwei zusätzliche Glycine als Verbindung zwischen den Domänen verwendet. Die zwei zusätzlichen Glycine wurden eingeführt, um die Flexibilität der Domänen weiter zu erhöhen, da die Termini der b'-Domäne in der Struktur der PDI weit voneinander entfernt sind. Somit wurde ein artifizielles Enzym hergestellt, exprimiert und gereinigt, das im Folgenden als PDI-Chimäre bezeichnet wird (Abbildung 3-27).

(a)



(b)

<i>hFkbp12</i>	FKBP-AYG-----ATGHPGIIPPHAT-----LVF-FKBP
<i>E. coli SlyD</i>	SlyD-AYGQYDENLVQRVPKDVFMGVDELQVGMRFIAETDQGPVPEITAVEDDHVVVDGNHMLAGQNLKF-SlyD
<i>GroEL-Chimäre 7</i>	FKBP-AYGQYDENLVQRREGMQFD----apikale Domäne GroEL---AAIQGRVVDGNHMLAGQNLVF-FKBP
<i>PDI-Chimäre</i>	FKBP-AYGQYDENLVQRGGALPYFG----b' Domäne PDI----LKG DASGGVVDGNHMLAGQNLVF-FKBP
<i>PDI-Chimäre SS</i>	FKBP-AYGQYDENLVQRGGALPYFG----b' Domäne PDI----LKG DASGGVVDGNHMLA C QNLVF-FKBP
<i>PDI-Chimäre SS k</i>	FKBP-AYG C YDEN----GGALPYFG----b' Domäne PDI----LKG DASGG----NHMLA C QNLVF-FKBP

Abbildung 3-27: (a) Struktur der b'-Domäne von PDI aus *S. cerevisiae*. Die Reste der b'-Bindungstasche, die bei Bindung an entfaltete RNaseA eine chemische Verschiebung zeigen, sind in hellblau dargestellt (Denisov *et al.*, 2009). Methionin306, an dessen Stelle für die Bindungsexperimente im Rahmen dieser Arbeit ein Cystein eingeführt wurde, ist als Stäbchenmodell in gelb dargestellt. Die Abbildungen wurden mit Hilfe des Programmes Pymol (DeLano, 2003) unter Verwendung des pdb-Eintrages 2B5E (Tian *et al.*, 2006) erstellt. (b) Sequenzvergleich der verschiedenen konstruierten Chimären. Das Sequenzalignment wurde mit Hilfe des Programmes BioEdit/Clustal W erstellt (Hall, 1999). hFKBP12, die FKBP-Domäne von SlyD und die zwei zusätzlichen Glycine der PDI-Chimäre sind in hellgrau dargestellt, die konservierten Tripeptide in schwarz. Die apikale Domäne von GroEL ist in grün, die b' Domäne in blau dargestellt. Die IF-Domäne von SlyD bzw. die entsprechenden Linkersequenzen sind in magenta gezeigt, die eingeführten Cysteine, die in der PDI-Chimäre SS die Disulfidbrücke bilden, sind in gelb dargestellt.

Wie auch schon bei der GroEL-Chimäre ist es notwendig, zuerst den Einfluss der Domänen-Insertion auf Wirts- und Gastdomäne zu untersuchen. Dies wurde mit Hilfe von Harnstoff-induzierten Übergängen überprüft. Obwohl der optimierte Linker aus der GroEL-Chimäre 7 verwendet wurde, ist die FKBP-Domäne durch Insertion der b'-Domäne in ihrer Stabilität stark beeinträchtigt. Bei 0 M Harnstoff liegt schon ein Großteil der Moleküle entfaltet vor und

bei einer Harnstoffkonzentration oberhalb von 1 M ist die FKBP-Domäne der PDI-Chimäre komplett entfaltet (Abbildung 3-28a, Tabelle 3-8). Im Gegensatz dazu liegt die b'-Domäne im chimären Konstrukt bei 0 M Harnstoff vollständig in ihrer nativen Struktur vor, ist jedoch mit einem Übergangsmittelpunkt von 1,08 M Harnstoff deutlich destabilisiert im Vergleich zur isolierten Domäne ($[\text{Harnstoff}]_{1/2} = 1,95 \text{ M}$). In der Kristallstruktur von PDI aus *S. cerevisiae* und auch in der Struktur der b'-x- und bb'-Domänen zeigt sich, dass die Termini sehr weit voneinander entfernt sind (Tian *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2008; Denisov *et al.*, 2009). Möglicherweise kommt es durch das "Zusammendrücken" der Termini zu einer Verzerrung der Struktur, wodurch der native Zustand destabilisiert wird.

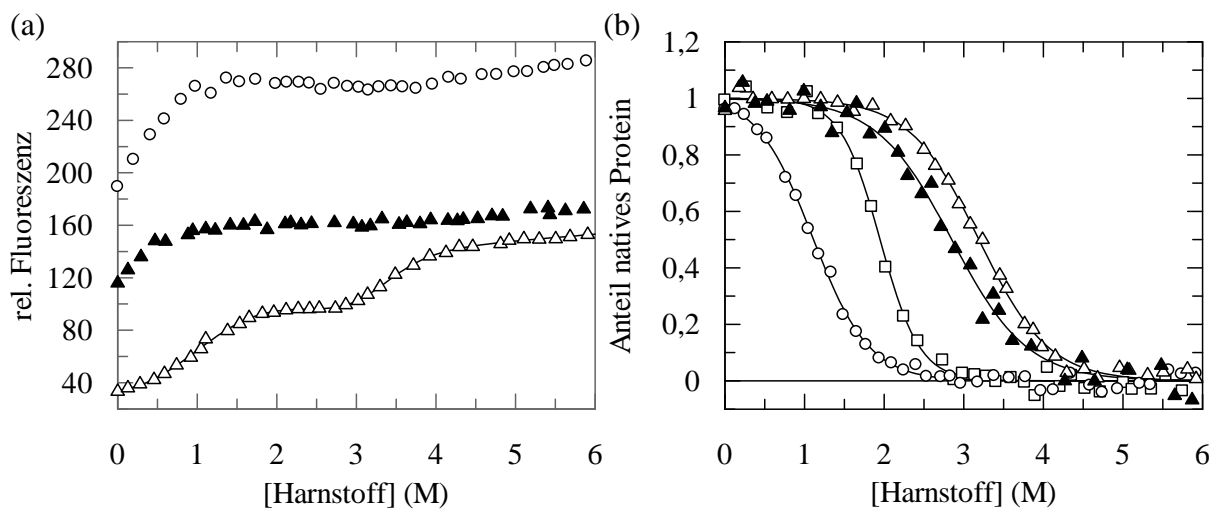


Abbildung 3-28: Harnstoff-induzierte Entfaltung der PDI-Chimäre (○), der PDI-Chimäre SS im oxidierten (△) und im reduzierten Zustand (▲) und der isolierten PDI-b'-Domäne (□). (a) Dargestellt ist die Änderung des Fluoreszenzsignals bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm, welches als Sonde für die Entfaltung der FKBP-Domäne dient. (b) Gezeigt sind die normierten Entfaltungsübergänge der PDI-b'-Domäne in den jeweiligen Konstrukten. Das CD-Signal bei 217 nm diente dabei als Sonde für die Entfaltung der PDI-b'-Domäne. Die Übergänge wurden mit 2 μM Protein bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 bei 15 °C gemessen. Die Bandbreiten betragen 3 nm für das Anregungs- bzw. 5 nm für das Emissionslicht (Fluoreszenzmessungen) bzw. 1 nm (CD-Messungen). Die Linien entsprechen der Auswertung der Daten gemäß eines Dreizustandsmodells (PDI Chimäre SS in (a)) bzw. Zweizustandsmodells (alle weiteren Varianten). Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

Um den Einfluss der Insertion auf die Prolyl-Isomeraseaktivität der FKBP-Domäne zu untersuchen wurde, wie schon für die GroEL-Chimären, die Aktivität für die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung im Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*p*Na bestimmt. Wie auch schon bei der GroEL-Chimäre beobachtet, korreliert die Destabilisierung der FKBP-Domäne mit einer verminderten Peptidaktivität. Überraschend ist jedoch, dass die PDI-Chimäre trotz der Destabilisierung immer noch 29 % der Peptidaktivität von hFKBP12 besitzt. Bei GroEL-Chimäre 2, bei der eine ähnlich destabilisierte FKBP-Domäne vorlag, entsprach die Peptidaktivität nur 2,5 % der Aktivität von hFKBP12. Möglicherweise, besitzt die b'-Domäne eine höhere Affinität für kurze Peptide als die apikale Domäne. Um die

Faltungshelferaktivität der PDI-Chimäre zu untersuchen wurde die Rückfaltung von RCM-T1 in Anwesenheit der Chimäre untersucht. Auch hier zeigte sich, trotz der destabilisierten FKBP-Domäne eine Zunahme der Faltungshelferaktivität im Vergleich zur besten GroEL-Chimäre. Die Spezifitätskonstante für die Rückfaltung des Proteinsubstrates RCM-T1 konnte mit $33 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ im Vergleich zu hFKBP12 mehr als verdoppelt werden (Tabelle 3-8).

Aus Kapitel 3.2.2 ist bekannt, dass durch Stabilisierung der FKBP-Domäne die Peptid- und damit auch die Faltungshelferfunktion verbessert werden konnte. Die Stabilisierung wurde in diesen Fällen durch Verlängerung des Linkers erreicht. Es ist jedoch denkbar, dass bei weiterer Linkerverlängerung der Abstand der Domänen soweit vergrößert wird, dass aufgrund fehlender Wechselwirkungen zwischen den Domänen keine effiziente Katalyse mehr stattfinden kann. Auf Grund dessen wurde in die PDI-Chimäre zur Stabilisierung der FKBP-Domäne eine Disulfidbrücke eingeführt. Die Cysteine wurden an den gleichen Positionen wie auch bei der GroEL-Chimäre 7 SS eingeführt (Abbildung 3-22b) und die resultierende PDI-Chimäre SS hinsichtlich ihrer Stabilität und Aktivität untersucht.

Anders als bei der GroEL-Chimäre 7 SS konnte durch das Einführen der Disulfidbrücke die FKBP-Domäne der PDI-Chimäre SS deutlich stabilisiert werden. Die FKBP-Domäne liegt nun bei 0 M Harnstoff vollständig gefaltet vor und besitzt einen Übergangsmittelpunkt von 1,02 M Harnstoff. Dennoch ist die thermodynamische Stabilität der Chimäre immer noch sehr viel geringer als die von hFKBP12 ($[\text{Harnstoff}]_{1/2} = 3,04 \text{ M}$). Im reduzierten Zustand ist die FKBP-Domäne in der PDI-Chimäre SS ähnlich instabil wie die FKBP-Domäne in der Chimäre ohne Disulfidbrücke. Die Cysteine wirken demnach innerhalb dieses Konstrukts *per se* weder stabilisierend noch destabilisierend auf die FKBP-Domäne.

Die Stabilisierung der FKBP-Domäne durch die Disulfidbrücke zeigt sich in einer erhöhten Prolylisomeraseaktivität im Peptidtest, die nun 117 % der Aktivität von isoliertem hFKBP12 entspricht. Dies deutet erneut daraufhin, dass die b'-Domäne vermutlich einen sehr niedrigen K_M für kurze Peptide besitzt. In der Literatur ist jedoch nur der K_M für PDI bekannt, der im Bereich $< 3 \mu\text{M}$ liegt (Darby *et al.*, 1994). Die Faltungshelferaktivität konnte im Vergleich zur PDI-Chimäre ohne Disulfidbrücke geringfügig gesteigert werden und ist mehr als doppelt so hoch wie der k_{kat}/K_M von hFKBP12.

Wie auch schon bei der GroEL-Chimäre 7 SS beobachtet, kommt es durch den Einbau der Disulfidbrücke zu einer enormen Stabilisierung der insertierten b'-Domäne. Der Übergangsmittelpunkt erhöht sich von 1,08 M Harnstoff auf 3,19 M Harnstoff was einer Stabilisierung von 10 kJ mol^{-1} entspricht. Anders als bei der FKBP-Domäne wirken sich die Cysteine schon im reduzierten Zustand günstig auf die Stabilität der b'-Domäne innerhalb der Chimäre aus. In der Literatur sind nur wenige Beispiele bekannt, bei denen das *de novo Design* von Disulfidbrücken, so wie im Fall der Chimären, zu einer Stabilisierung von Proteinen führte (Matsumura *et al.*, 1989; Martensson *et al.*, 2002; Pecher & Arnold, 2009).

Tabelle 3-8: Stabilitätsdaten und katalytische Aktivität der PDI-Chimären.

Variante	Harnstoff-induzierte Entfaltung				Spezifitätskonstante k_{kat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	
	FKBP Domäne		Chaperon Domäne		Tetrapeptid- Isomerisierung	RCM-T1 Rückfaltung
	[Hst.] _{1/2} (M)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	[Hst.] _{1/2} (M)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)		
hFKBP12	3,04	6,9	-	-	2400	15
PDI-b'-Domäne	-	-	1,95	9,7	-	-
PDI-Chimäre	< 1,0	-	1,08	6,6	690	33
PDI-Chimäre SS ox.	1,02	7,6	3,19	5,5	2800	40
PDI-Chimäre SS red.	< 1,0	-	2,85	5,1	-	-
PDI-Chimäre SS k ox.	1,21	8,7	3,44	7,0	51	32

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte [Harnstoff]_{1/2} ([Hst.]_{1/2}) und die Kooperativitätsparameter m ($m = \delta G_D / \delta [\text{Harnstoff}]$). Die Harnstoff-induzierte Entfaltung wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm (FKBP-Domäne) und anhand der Änderung des CD-Signals bei 217 nm (Sonde PDI-b'-Domäne) verfolgt. Die Analyse der Daten erfolgte auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells oder Dreizustandsmodells (PDI-Chimäre SS). Die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung von 3 μM Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*pNa* und die Rückfaltung von 0,1 μM RCM-T1 wurde in Abhängigkeit von der Prolylisomerasekonzentration bei 15 °C untersucht und die Fluoreszenzverläufe mit Gleichung 2-21 bzw. 2-30 analysiert. Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden als Funktion der Prolylisomerasekonzentration aufgetragen und die Spezifitätskonstante nach linearer Regression aus der Geradensteigung berechnet.

Durch das Einführen der Disulfidbrücke ist es möglich, einen stabilen und aktiven Faltungshelfer aus hFKBP12 und der b'-Domäne von PDI zu konstruieren. Die Annahme, dass die Disulfidbrücke die FKBP-Domäne in ihrer nativen Konformation „klammert“, lässt den Schluss zu, dass in dem Konstrukt PDI-Chimäre SS beide Domänen entkoppelt voneinander vorliegen. Somit sollte eine Linkerverkürzung auf der Seite der Chaperondomäne keine Auswirkungen auf die Stabilität der FKBP-Domäne haben. Für den Fall, dass der Abstand beider Domänen entscheidend für die Funktionalität ist, sollte solch eine Linkerverkürzung jedoch Auswirkungen auf die Aktivität des chimären Faltungsenzyms haben. Daher wurde eine weitere chimäre Variante konstruiert, in der N-terminal und C-terminal die beiden Glycine und weitere vier AS des Linkers entfernt wurden (im Folgenden PDI-Chimäre SS k, Abbildung 3-27b). Die Untersuchung der Stabilität der PDI-Chimäre SS k gegenüber dem Denaturierungsmittel Harnstoff ergab, dass die Linkerverkürzung sich nicht negativ auf die Stabilität auswirkt. Es konnte sogar eine Stabilisierung beider Domänen beobachtet werden. Die Übergangsmittelpunkte der beiden Domänen im chimären Konstrukt sind um jeweils 0,2 M Harnstoff erhöht. Hier zeigt sich jedoch, dass die Prolylisomeraseaktivität nicht immer mit der Stabilität korreliert. Durch die Verkürzung des Linkers um jeweils sechs Aminosäuren ist die Peptidaktivität enorm beeinträchtigt und ist sogar noch niedriger als bei der PDI-Chimäre ohne Disulfidbrücke. Auch die Faltungsaktivität ist in etwa so weit erniedrigt wie die der disulfidfreien Chimäre. Möglicherweise sind im Konstrukt PDI-Chimäre SS k beide Domänen zu nah beieinander, so dass es zu sterischen Hinderungen des aktiven Zentrums kommt und die Prolylisomerase das Substrat nicht mehr umsetzen kann, bzw. das Peptidsubstrat nicht mehr im aktiven Zentrum

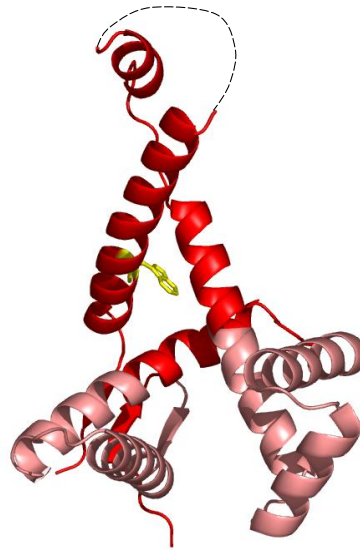
binden kann. Wäre der Grund nur eine unzureichende Flexibilität zwischen den Domänen, so würde nur eine Erniedrigung der Faltungsaktivität erwartet werden, und nicht auch der Aktivitätsverlust der Prolylisomerase-domäne.

3.2.5 Die Chaperondomäne von SurA als Bindungsdomäne

Wie die vorangegangenen Kapitel gezeigt haben, ist es möglich, die Faltungshelferaktivität einer Prolylisomerase durch Anwesenheit einer nicht-verwandten Chaperondomäne zu steigern. Diese Aktivitätserhöhung ist jedoch, im Vergleich zur Prolylisomerase hFKBP12, immer noch sehr gering. Daher wurde eine weitere Chaperondomäne ausgewählt, die Chaperondomäne von SurA, um in Kombination mit der Prolylisomerase hFKBP12 einen hochaktiven Faltungshelfer zu konstruieren.

Die im Periplasma von Prokaryonten lokalisierte Prolylisomerase SurA ist an der Faltung und Assemblierung von Porinen der äußeren Membran (OMPs) beteiligt (Lazar & Kolter, 1996; Rouviere & Gross, 1996). SurA ist aus drei Domänen aufgebaut. Die Chaperondomäne von SurA besteht aus dem N-terminalen Teil des Proteins (AS 24 bis 168) und einer C-terminalen Helix (AS 389 bis 428). Zudem hat SurA zwei Prolylisomerase-domänen, die zur Familie der Parvuline gehören (Par1 und Par2) und von denen nur Par2 Prolylisomeraseaktivität besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass für die *in vivo* Funktion von SurA nur das Vorhandensein der isolierten Chaperondomäne essentiell ist. Die isolierte Chaperondomäne besitzt auch *in vitro* die Fähigkeit, die Aggregation von denaturierter Citratsynthase zu unterdrücken. Sie hat demzufolge eine ähnlich gute, wenn nicht sogar bessere Chaperonaktivität als SurA selbst (Behrens *et al.*, 2001). Ähnlich wie bei Triggerfaktor, sind die beiden Parvulindomänen in die Struktur der Chaperondomäne eingefügt. Behrens *et al.* konnten jedoch zeigen, dass das Vorhandensein der C-terminalen Helix für die Chaperonaktivität von SurA unbedingt notwendig ist. Daher wurde die N-terminale Domäne (AS 24-174) mit der C-terminalen Helix (384-428) verknüpft und mit Hilfe der schon in der GroEL-Chimäre 7 verwendeten Linkersequenzen aus SlyD in hFKBP12 insertiert (Abbildung 3-21). Dieses chimäre Protein wird im Folgenden SurA-Chimäre genannt.

(a)



(b)

<i>hFkbp12</i>	FKBP-AYG-----ATGHPGIIPPHAT-----LVF-FKBP
<i>E. coli SlyD</i>	SlyD-AYGQYDENLVQRVFKDVFMGVDELQVGMRFLEATDQGPVPEITAVEDDHVVVDGNHMLAGQNLKF-SlyD
<i>GroEL-Chimäre 7</i>	FKBP-AYGQYDENLVQREGMQFD----apikale Domäne GroEL---AAIQGRVVDGNHMLAGQNLVF-FKBP
<i>SurA-Chimäre</i>	FKBP-AYGQYDENLVQRVVVDKVA----Chaperon Domäne SurA---VKILSNVVDGNHMLAGQNLVF-FKBP
<i>SurA-Chimäre SS</i>	FKBP-AYGQYDENLVQRVVVDKVA----Chaperon Domäne SurA---VKILSNVVDGNHMLACQNLVF-FKBP
<i>SurA-Chimäre SS k</i>	FKBP-AYGQYDEN---VVVDKVA----Chaperon Domäne SurA---VKILSN---NHMLACQNLVF-FKBP

Abbildung 3-29: (a) Tertiärstruktur der Chaperondomäne von SurA aus *E. coli*. Die hydrophobe Substratbindungsfurche ist in rosa dargestellt (Bitto & McKay, 2002). Tryptophan375, das als Energiedonor für FRET-Experimente genutzt wurde, ist als Stäbchenmodell in gelb gezeigt. Die Aminosäuren, die das N-terminale Fragment (24-174) und die C-terminale Helix (384-428) verbinden, sind als unterbrochene Linie dargestellt. Die Abbildung wurden mit Hilfe des Programmes Pymol (DeLano, 2003) unter Verwendung des pdb-Eintrages 1M5Y (Bitto & McKay, 2002) erstellt. (b) Sequenzvergleich der verschiedenen konstruierten Chimären. Das Sequenzalignment wurde mit Hilfe des Programmes BioEdit/Clustal W erstellt (Hall, 1999). hFKBP12 und die FKBP-Domäne von SlyD sind in hellgrau, die konservierten Tripeptide in schwarz dargestellt. Die apikale Domäne von GroEL ist in grün und die Chaperondomäne von SurA ist in rot gezeigt. Die IF-Domäne von SlyD bzw. die entsprechenden Linkersequenzen sind in magenta dargestellt, die eingeführten Cysteine, die die Disulfidbrücke bilden, sind in gelb gezeigt.

Um die Auswirkung der Insertion auf die Stabilität beider Domänen zu untersuchen, wurde wie schon bei den vorhergehenden Chimären die Stabilität gegenüber Harnstoff untersucht. Erneut zeigt sich, dass die Insertion der Chaperondomäne die FKBP-Domäne stark destabilisiert. In den vorherigen chimären Konstrukten konnte im Falle einer solchen Destabilisierung immer noch ein Teil des Überganges beobachtet werden. In diesem Fall, konnte kein Fluoreszenzanstieg detektiert werden, der mit der Entfaltung der FKBP-Domäne einhergeht. Daraus lässt sich schließen, dass in dem Konstrukt der SurA-Chimäre die FKBP-Domäne durch die Insertion vollständig entfaltet vorliegt. Die Chaperondomäne hingegen liegt in ihrer nativen Struktur vor. Im Vergleich zur isolierten Chaperondomäne, die einen Übergangsmittelpunkt von 4,42 M Harnstoff besitzt, sind schon bei 3,19 M Harnstoff die Hälfte der Moleküle entfaltet (Abbildung 3-30b, Tabelle 3-9). Die enorme Destabilisierung der FKBP-Domäne zeigt sich auch deutlich in der Prolyltransferaseaktivität. Für die SurA-Chimäre konnte keine Aktivität für die Tetrapeptidisomerisierung gemessen werden, selbst mit 5 μ M SurA-Chimäre ist keine Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung

zu beobachten. Erstaunlich ist jedoch, dass trotz der entfalteten FKBP-Domäne, die Aktivität für die Rückfaltung von RCM-T1 um mehr als das dreifache gesteigert werden konnte, verglichen mit isoliertem hFKBP12. Schon in vorangegangenen Arbeiten wurde beobachtet, dass trotz starker Beeinträchtigung des aktiven Zentrums, Prolylisomerasen noch in der Lage sind, die prolinlimitierte Faltung von Proteinen zu katalysieren. Eine Variante von hFKBP12-IF, bei der die Peptidaktivität durch zwei Substitutionen im aktiven Zentrum auf 1 % reduziert ist und die FKBP-Domäne ebenfalls stark destabilisiert vorliegt, besitzt immer noch eine messbare Proteinfaltungsaktivität für RCM-T1, die 4 % des Wildtyp-hFKBP12-IF entspricht (Drögemüller, 2009). Möglicherweise wirkt sich die Bindung der Chimäre an RCM-T1 stabilisierend auf die FKBP-Domäne aus und resultiert damit in einer relativ hohen Faltungsaktivität.

Um die FKBP-Domäne zu stabilisieren und somit die Prolylisomeraseaktivität und möglicherweise auch die Faltungshelferaktivität zu erhöhen, wurde eine Disulfidbrücke eingeführt. Entsprechend der PDI-Chimäre SS wurden die Aminosäuren Glutamin und Glycin im Linkerbereich durch Cysteine ersetzt (Abbildung 3-29b) und somit die SurA-Chimäre SS konstruiert. Die Harnstoff-induzierten Übergänge der SurA-Chimäre SS zeigen, dass durch das Einführen der Disulfidbrücke die FKBP-Domäne deutlich stabilisiert werden konnte (Abbildung 3-30a, Tabelle 3-9).

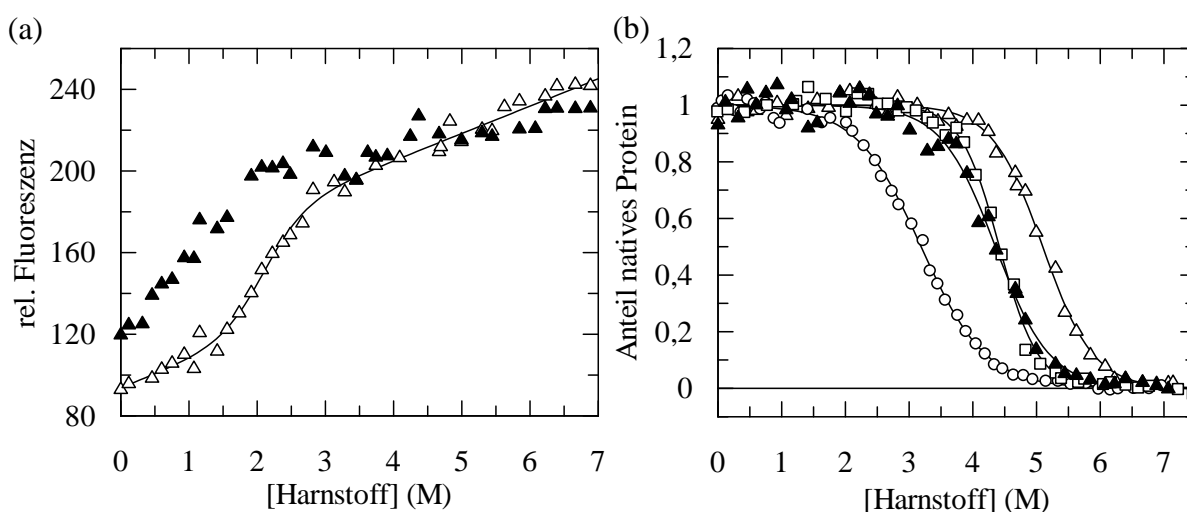


Abbildung 3-30: Harnstoff-induzierte Entfaltung der SurA-Chimäre (\circ), der SurA-Chimäre SS ox. (Δ) und red. (\blacktriangle) und der isolierten SurA-Chaperon-Domäne (\square). (a) Dargestellt ist die Änderung des Fluoreszenzsignals bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm, welches als Sonde für die Entfaltung der FKBP-Domäne dient. (b) Gezeigt sind die normierten Entfaltungsübergänge der Chaperondomäne von SurA in den chimären Konstrukten in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration. Die Entfaltung der Chaperon-Domäne in der SurA-Chimäre wurde bei 310 nm, in der SurA-Chimäre SS bei 315 nm und in isolierter Form bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Übergänge wurden mit 2 μ M Protein bei einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 bei 15 °C gemessen. Die Bandbreiten betragen 3 nm für das Anregungs- bzw. 5 nm für das Emissionslicht. Die Linien entsprechen der Auswertung der Daten gemäß eines Zweizustandsmodells. Die aus der Analyse erhaltenen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst.

Der Übergangsmittelpunkt der FKBP-Domäne liegt nun bei 2,01 M Harnstoff. Dies kommt der ursprünglichen Stabilität von hFKBP12 von allen chimären Konstrukten am nächsten. Die enorme Stabilisierung ist auch für die Chaperondomäne von SurA zu beobachten. Im Vergleich zur disulfidfreien Variante ($[\text{Harnstoff}]_{1/2} = 3,19 \text{ M}$), sind erst bei 5,16 M Harnstoff die Hälfte der Moleküle entfaltet, was einer Stabilisierung um 14 kJ mol^{-1} entspricht. Selbst im Vergleich zu der isolierten Chaperondomäne konnte eine Stabilisierung erzielt werden. Erneut sind die Cysteine *per se* schon stabilisierend (Abbildung 3-30, Tabelle 3-9). Sowohl die FKBP-Domäne, als auch die Chaperondomäne sind auch im reduzierten Zustand stabiler als im Konstrukt ohne Cysteine. Die FKBP-Domäne liegt im reduzierten Zustand der SurA-Chimäre SS zwar bei 0 M Harnstoff und $15 \text{ }^\circ\text{C}$ nicht vollständig nativ vor, im Gegensatz zur SurA-Chimäre konnte jedoch das Ende des Überganges beobachtet werden. Die Chaperondomäne von SurA weist im reduzierten Zustand eine ähnliche Stabilität auf wie die isolierte Domäne. Vermutlich hat die Stabilisierung der Cysteine *per se* die Destabilisierung durch den Einbau innerhalb von hFKBP12 kompensiert. Durch die nun nativ vorliegende FKBP-Domäne konnte die Spezifitätskonstante der SurA-Chimäre SS für die Peptidisomerisierung zu $290 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt werden, was 12 % der Aktivität von hFKBP12 entspricht. Die erhöhte Prolylisomeraseaktivität bedingt auch die erhöhte Faltungshelferaktivität, die im Vergleich zu hFKBP12 mit einem Anstieg um 800 % deutlich gesteigert werden konnte (Tabelle 3-9, Abbildung 3-31a).

Tabelle 3-9: Stabilitätsdaten und katalytische Aktivität der SurA-Chimären.

Variante	Harnstoff-induzierte Entfaltung				Spezifitätskonstante $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	
	FKBP Domäne		Chaperon Domäne		Tetrapeptid- Isomerisierung	RCM-T1 Rückfaltung
	$[\text{Hst.}]_{1/2}$ (M)	m ($\text{kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	$[\text{Hst.}]_{1/2}$ (M)	m ($\text{kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$)		
hFKBP12	3,04	6,9	-	-	2400	15
Chaperondomäne SurA	-	-	4,42	7,9	-	-
SurA-Chimäre	< 0,0	-	3,19	4,7	-	50
SurA-Chimäre SS ox.	2,01	6,5	5,16	5,7	290	120
SurA-Chimäre SS red.	< 2,0	-	4,36	5,6	-	-
SurA-Chimäre SS k ox.	2,29	7,6	5,39	5,5	160	280

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte $[\text{Harnstoff}]_{1/2}$ ($[\text{Hst.}]_{1/2}$) und die Kooperativitätsparameter m ($m = \delta G_{\text{D}}/\delta[\text{Harnstoff}]$). Die Harnstoff-induzierte Entfaltung wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm (FKBP-Domäne) und bei 310, 315 oder 320 nm nach Anregung bei 280 nm (Sonde Chaperondomäne SurA) verfolgt. Die Analyse der Daten erfolgte auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells. Die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung im Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*p*Na und die Rückfaltung von RCM-T1 wurde in Abhängigkeit von der Prolylisomerasekonzentration bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ untersucht und die Fluoreszenzverläufe mit Gleichung 2-19 bzw. 2-27 analysiert. Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden als Funktion der Prolylisomerasekonzentration aufgetragen und die Spezifitätskonstante nach linearer Regression aus der Geradensteigung berechnet.

Da die FKBP-Domäne durch den Einbau der Disulfidbrücke stabilisiert werden konnte, und die Domänen damit thermodynamisch entkoppelt vorliegen, wurde wie schon in der PDI-Chimäre SS der Linker zwischen den beiden Domänen verkürzt. Dadurch sollten die

Auswirkungen des geringeren Abstandes beider Domänen zueinander auf Prolylisomerase- und Faltungsaktivität untersucht werden. Da der Linker der SurA-Chimäre SS nicht wie die PDI-Chimäre SS zwei zusätzliche Glycine enthält, wurden nur jeweils vier AS auf beiden Seiten des Linkers entfernt (SurA-Chimäre SS k, Abbildung 3-29). Wie schon für die PDI-Chimäre SS k beobachtet, führt auch in der SurA-Chimäre SS k die Verkürzung des Linkers zu einer geringen Stabilisierung beider Domänen. Der Übergangsmittelpunkt der FKBP-Domäne verschiebt sich von 2,01 (SurA-Chimäre SS) auf 2,29 M Harnstoff (SurA-Chimäre SS k), der der Chaperondomäne von 5,16 auf 5,39 M Harnstoff. Möglicherweise kommt es zu sterisch ungünstigen Wechselwirkungen der letzten vier AS mit den Termini der Chaperondomäne von SurA, die durch Entfernen dieser AS behoben werden konnten. Im Gegensatz zu PDI-Chimäre SS k ist durch die Verkürzung des Abstandes beider Domänen die Prolylisomeraseaktivität von SurA-Chimäre SS k kaum beeinflusst. Da die Tertiärstruktur der chimären Proteine nicht bekannt ist, ist es schwierig diese Unterschiede zu erklären. Es ist möglich, dass die Domänen innerhalb der PDI-Chimäre bzw. innerhalb der SurA-Chimäre unterschiedliche Ausrichtungen zueinander haben. Demzufolge kann die Linkerverkürzung unterschiedliche Folgen für die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums der Prolylisomerase haben. In der SurA-Chimäre ist die Chaperondomäne vermutlich so orientiert, dass auch wenn beide Domänen in räumlicher Nähe sind, das aktive Zentrum nicht beeinträchtigt ist.

3.2.6 Die kovalente Verknüpfung von Prolylisomerase und Chaperondomäne ist für die Faltungshelferaktivität essentiell

Die Konstruktion der drei chimären Faltungshelfer hat gezeigt, dass durch Insertion einer Chaperondomäne die Faltungshelferaktivität von hFKBP12 gesteigert werden kann. Essentiell für die erhöhte Faltungsaktivität ist anscheinend nur die Anwesenheit einer hydrophoben Bindungsdomäne unabhängig von deren Herkunft. Für die GroEL-Chimäre 7, die PDI-Chimäre SS und die SurA-Chimäre SS kommt es zu Steigerungen der Faltungshelferaktivität um das zweifache, dreifache bzw. 8fache. In Abbildung 3-31 ist für diese drei Enzyme die Auswirkung auf die Rückfaltung von RCM-T1 vergleichend dargestellt. Um zu überprüfen, ob die Domänen für ihre Faltungsaktivität kovalent verknüpft sein müssen, oder ob die Anwesenheit der beiden isolierten Domänen ausreichend ist, wurde das analoge Experiment mit einer Mischung der jeweiligen isolierten Domänen durchgeführt.

Abbildung 3-31a zeigt noch einmal, dass durch die Insertion aller drei Chaperondomänen die Faltungshelferaktivität von hFKBP12 deutlich gesteigert werden konnte. Die SurA-Chimäre SS besitzt von allen chimären Proteinen die höchste Aktivität für die prolinlimitierte Rückfaltung von RCM-T1.

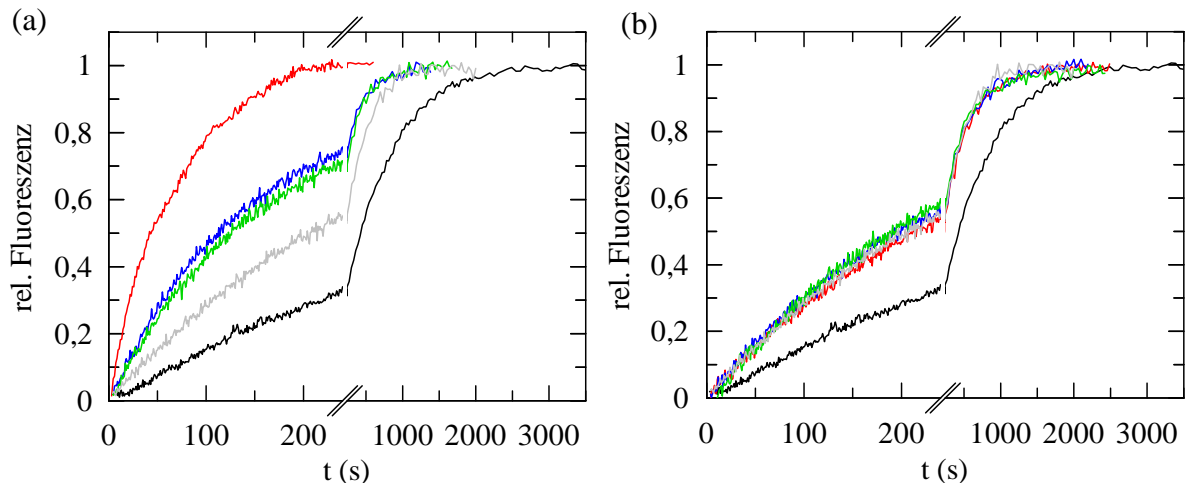


Abbildung 3-31: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1. (a) Dargestellt ist die Rückfaltung von RCM-T1 in Abwesenheit einer PPIase (schwarz) und in Anwesenheit von jeweils 200 nM hFKBP12 (grau), GroEL-Chimär 7 (grün), PDI-Chimäre SS (blau) und SurA-Chimäre SS (rot). (b) Dargestellt ist die Rückfaltung von RCM-T1 in Abwesenheit einer PPIase (schwarz) oder in Anwesenheit von 100 nM hFKBP12 (grau), einer Mischung aus 100 nM hFKBP12 und jeweils 100 nM apikaler Domäne aus GroEL (grün), 100 nM b'-Domäne aus PDI (blau) oder 100 nM SurA-Chaperondomäne (rot). Die Rückfaltung wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 320 nm (Bandbreite 5 nm) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 3 nm) in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 2 M NaCl bei 15 °C verfolgt.

Dahingegen ist das Vorhandensein beider isolierter Domänen der jeweiligen chimären Konstrukte nicht ausreichend um die Rückfaltung von RCM-T1 deutlich zu beschleunigen (Abbildung 3-31b). Die Mischung beider isolierter Domänen zeigt die gleiche niedrige Faltungsaktivität wie hFKBP12 allein. Die Verknüpfung beider Domänen ist für ein „Weiterreichen“ des Substrates von der Bindungsstelle zum aktiven Zentrum essentiell. Vermutlich kommt es durch die Anwesenheit der Chaperondomäne zu einer lokalen Substratanreicherung, wodurch die Wahrscheinlichkeit eines produktiven Substrattransfers erhöht wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine kovalente Verknüpfung der Domänen für die Aktivität von modular aufgebauten Faltungsenzymen unabdingbar ist.

3.2.7 Für Proteinsubstrate mit negativ geladenen Resten vor Prolin zeigen die Chimären eine enorme Steigerung der Faltungsaktivität

Prolylisomerasen der FKBP-Familie zeigen in kurzen Peptiden eine hohe Substratspezifität für die Aminosäure vor Prolin. Um die Substratspezifität von Prolylisomerasen für alle Xaa-Pro-Sequenzen zu untersuchen, haben Zoldak *et al.* 2009 eine Peptidbibliothek erstellt, bei der alle 20 Aminosäuren an der P1-Position (Xaa) vor dem Prolin vorkommen (Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNa). Da RCM-T1 an der P1-Position ein Tyr besitzt ist ein Vergleich der Aktivitäten bezüglich der Sequenzspezifität für die Position vor dem *cis*-Prolin für kurze Peptide und Proteinsubstrate nicht möglich. Um die Sequenzspezifität von Prolylisomerasen bezüglich Proteinsubstraten und Peptidsubstraten mit variierenden Resten vor dem Prolin zu ermöglichen, wurde die N2-Domäne des Gen-3-Proteins (G3P) des Phagen fd als Proteinsubstrat für die Faltungsexperimente verwendet (Abb 3-32) (Holliger *et al.*, 1999). Die

im Folgenden beschriebenen N2-Varianten umfassen die AS 102 bis 205 des G3P des Phagen fd, und besitzen die stabilisierende Substitution Q129H. N2 trägt eine oberflächenexponierte Schleife, in der das *cis*-Prolin161 lokalisiert ist.

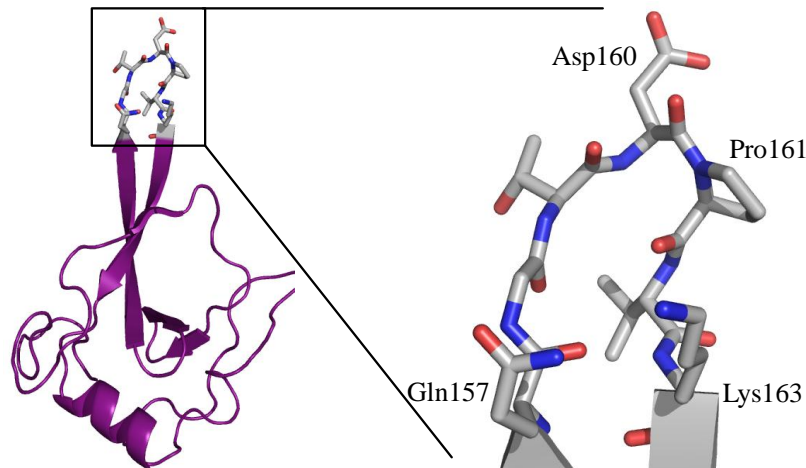


Abbildung 3-32: Tertiärstruktur der N2-Domäne von G3P (pdb-code: 2g3p, Holliger *et al.*, 1999). Die Schleife mit *cis*-Pro161 ist als Stäbchenmodell dargestellt. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Pymol (DeLano, 2003) modifiziert.

Im nativen Zustand liegt Pro161 der N2-Domäne des G3P zum größten Teil in der *cis*-Konformation vor. Für 90 % der Moleküle ist die *trans/cis*-Isomerisierung von Pro161 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Faltung (Jakob & Schmid, 2008). Es wurde gezeigt, dass sich diese Isomerisierung sehr gut durch Prolylisomerasen beschleunigen lässt, daher ist N2 ein hervorragendes Substrat für Prolylisomerasen. Um die Sequenzspezifität von Prolylisomerasen bezüglich der Position vor Prolin auch in Proteinsubstraten untersuchen zu können, wurde eine Proteinbibliothek erstellt, bei der die Aminosäure vor dem *cis*-Prolin161 zu allen 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren substituiert wurde (Jakob & Schmid, 2009; Jakob *et al.*, 2009).

Um nun die katalytische Effizienz der Chimären hinsichtlich verschiedener P1-Positionen mit unterschiedlichem chemischen Charakter innerhalb kurzer Tetrapeptide und Proteinsubstrate zu vergleichen, wurde zunächst die Peptidaktivität gegenüber dem Tetrapeptid Abz-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*Na und dem Proteinsubstrat Glu160-Pro161-N2 (Glu-Pro-N2) verglichen. Befindet sich ein hydrophober oder aromatischer Rest an der P1-Position, sind FKBP-Proteine hochaktive Enzyme für die *cis/trans*-Isomerisierung im Tetrapeptid. Handelt es sich bei der AS vor dem Prolin um eine negativ geladene AS, so ist die katalytische Aktivität der Prolylisomerase sehr gering. Gleiches lässt sich für die chimären Proteine beobachten. Durch die Insertion der apikalen Domäne und der SurA-Chaperondomäne wurde die ohnehin schon niedrige Peptidaktivität weiter verringert (Abbildung 3-33 a und c). Dies lässt sich durch die Beeinflussung des aktiven Zentrums durch die Domäneninsertion anstelle des *flap* von hFKBP12 erklären. Die Gleichgewichtsübergänge der FKBP-Domäne zeigen

zwar, dass diese vollständig gefaltet vorliegt, möglicherweise ist aber im Vergleich zu hFKBP12 die Umgebung des Faltblattstranges β_6 und damit auch das aktive Zentrum in seiner Struktur verändert. Nur die PDI-Chimäre SS weist eine geringfügig höhere Peptidaktivität auf als hFKBP12. Vermutlich besitzt die b'-Domäne eine hohe Affinität für kurze Peptide. Im Gegensatz zur Isomerisierung im Glu-Peptid, wird die Rückfaltung der Glu-Pro-N2 Variante durch alle drei Chimären wesentlich besser beschleunigt als durch hFKBP12. hFKBP12 ist im Proteinfaltungstest nahezu inaktiv (Abbildung 3-33b und d).

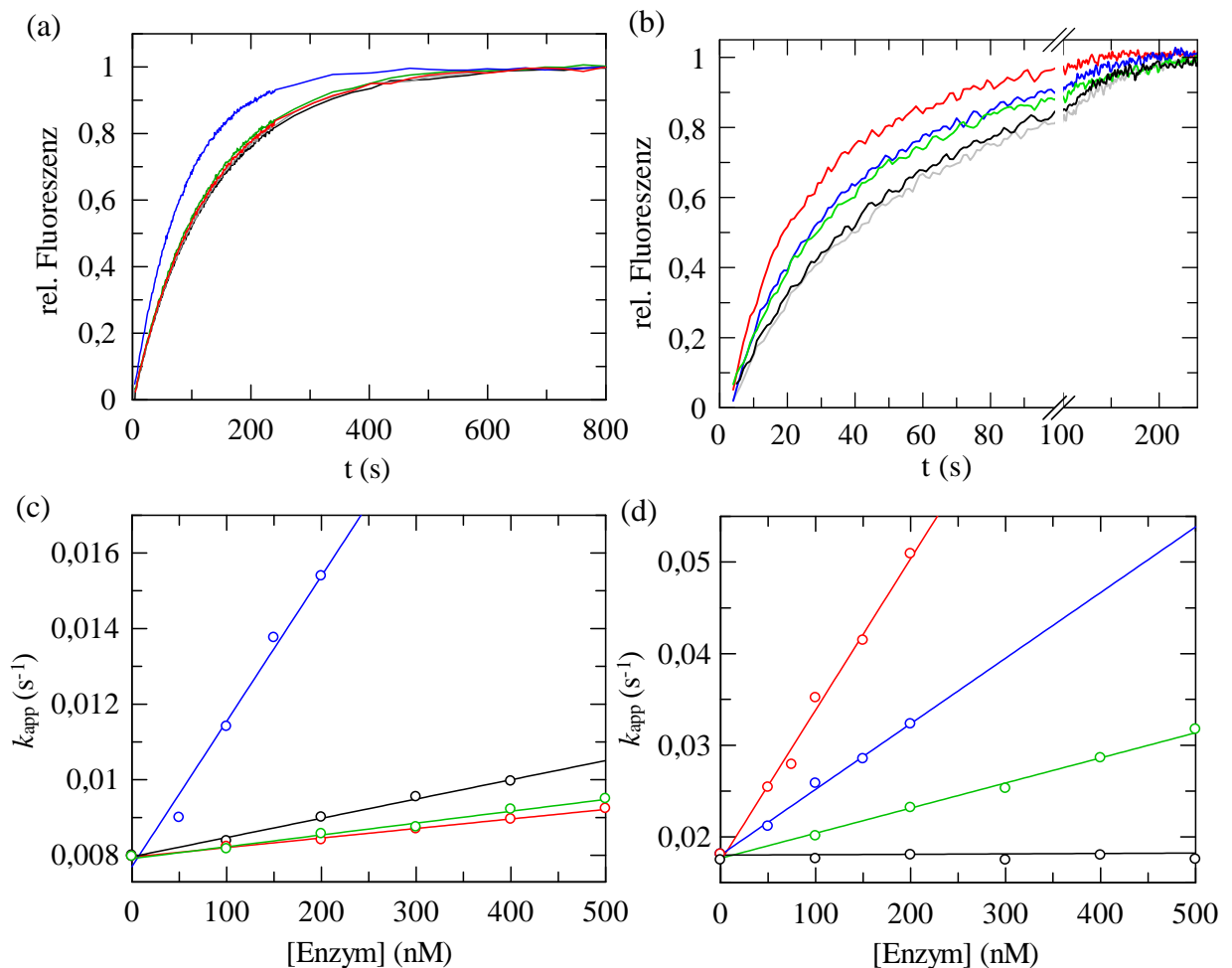


Abbildung 3-33: Katalytische Aktivität von hFKBP12 und von den Chimären für die Isomerisierung des Abz-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*Na und die Rückfaltung von Glu-Pro-N2. (a) Dargestellt ist die Isomerisierung von Abz-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*Na und (b) die Rückfaltung von Glu-Pro-N2 in Abwesenheit einer PPIase (schwarz) und in Anwesenheit von jeweils 200 nM hFKBP12 (grau), GroEL-Chimäre 7 (grün), PDI-Chimäre SS (blau) und SurA-Chimäre SS (rot). (c) Gezeigt ist die katalytische Effizienz der *cis/trans*-Isomerisierung von Abz-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*Na und (d) die katalytische Effizienz der Rückfaltung von Glu-Pro-N2 in Abhängigkeit der Prolylisomerasekonzentration von hFKBP12 (schwarz), GroEL-Chimär 7 (grün), PDI-Chimäre SS (blau) und SurA-Chimäre SS (rot). Die Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 anhand des Fluoreszenzsignals bei 416 nm nach Anregung bei 316 nm (*cis/trans*-Isomerisierung von 3 μ M Tetrapeptid) bzw. in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,0 anhand des Fluoreszenzsignals bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm (Rückfaltung von 0,33 μ M N2) durchgeführt. Die Fluoreszenzverläufe wurden mit Gleichung 2-21 bzw. 2-30 analysiert. Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten

wurden als Funktion der Prolylisomerasekonzentration aufgetragen und die Spezifitätskonstante nach linearer Regression aus der Geradensteigung berechnet.

Die Faltungsaktivität für das Substrat Glu-Pro-N2 konnte durch die Insertion der apikalen Domäne (GroEL-Chimäre 7) in hFKBP12 mehr als 50fach gesteigert werden, in der PDI-Chimäre SS war die Steigerung der Aktivität 110fach und für die SurA-Chimäre SS 360fach. Unter dem Aspekt, dass die Insertion der b'-PDI-Domäne und der SurA-Chaperondomäne die Prolylisomeraseaktivität für das Glu-Pro-Peptid 2fach bzw. 3fach erniedrigte, ist die enorme Steigerung des $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ der PDI- und der SurA-Chimäre SS für die entsprechende Glu-Pro-N2-Variante besonders bemerkenswert.

3.2.8 Die Anwesenheit einer Chaperondomäne setzt die Substratspezifität des aktiven Zentrums der Prolylisomerase herab

Da sich gezeigt hat, dass die Faltungsaktivität von hFKBP12 für Proteinsubstrate mit Glu-Pro-Sequenz durch Anwesenheit der Chaperondomänen deutlich gesteigert werden konnte, ist es nun interessant, die Spezifität der chimären Proteine hinsichtlich weiterer Xaa-Pro Sequenzen im Tetrapeptid und in Proteinsubstraten zu untersuchen. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass FKBP-Proteine mit endogenen Chaperondomänen dieselbe hohe Sequenzspezifität für die AS vor Prolin innerhalb von kurzen Peptidsubstraten aufweisen (Harrison & Stein, 1990; Park *et al.*, 1992; Stein, 1993a). Für die prolinlimitierte Faltung zeigte sich jedoch, dass die Aktivität nahezu unabhängig von der Position vor Prolin ist. Dies garantiert, dass die „wahllose“ Bindung entfalteter Proteine durch die Chaperondomänen die Substratspezifität der PPIase aufhebt und somit eine hohe katalytische Effizienz gewährleistet ist (Jakob *et al.*, 2009).

Im Folgenden wurde die katalytische Aktivität der chimären Proteine hinsichtlich ihrer Sequenzspezifität für Tetrapeptide und Proteinsubstrate analysiert. Dafür wurde zunächst die *cis/trans*-Prolylisomerisierung exemplarisch für einige ausgewählte Peptide der Bibliothek mit den Sequenzen Phe-Pro, Leu-Pro, Glu-Pro, Lys-Pro und Ala-Pro untersucht (Abbildung 3-34a).

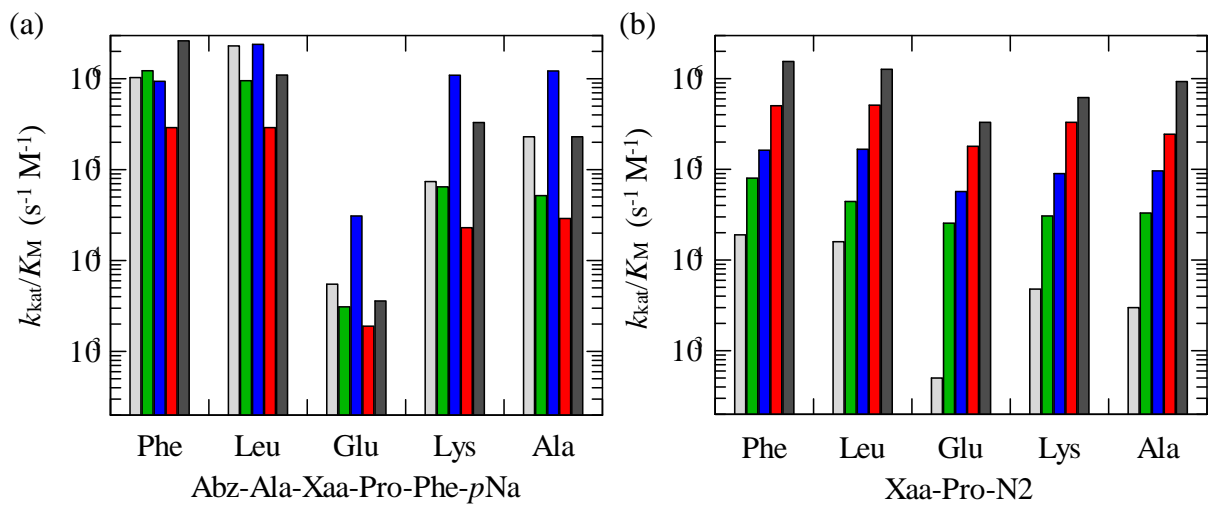


Abbildung 3-34: Katalytische Aktivität der Chimären, FKBP12 und SlyD (a) für die Prolylisomerisierung im Tetrapeptid Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-*p*Na und (b) für die prolinlimitierte Rückfaltung von Xaa-Pro-N2: FKBP12 (hellgrau), GroEL-Chimäre 7 (grün), PDI-Chimäre SS (blau), SurA-Chimäre SS (rot) und SlyD (dunkelgrau). Die Bestimmung der k_{kat}/K_M -Werte erfolgt wie in Abbildung 3-33 beschrieben. Die Daten für hFKBP12 und SlyD wurden der Arbeit Jakob *et al.* (2009) entnommen.

Abbildung 3-34a zeigt, dass für die Katalyse von kurzen Peptiden alle chimären Proteine die gleiche hohe Substratspezifität für die Position vor Prolin besitzen. Glu-Pro-Sequenzen werden mehr als 100fach schlechter katalysiert, als beispielsweise Leu-Pro-Sequenzen. Da die Peptide fast ausschließlich im aktiven Zentrum der PPIase-Domäne, also in der FKBP-Domäne binden, wird die Spezifität gegenüber Peptiden durch die Anwesenheit einer Chaperondomäne kaum beeinflusst. Für die GroEL-Chimäre liegen die Peptidaktivitäten für die verschiedenen Peptide in einem ähnlichen Bereich wie für hFKBP12. Die PDI-Chimäre zeigt für die Peptide mit den Sequenzen Glu-Pro, Lys-Pro und Ala-Pro sogar deutlich höhere Aktivität als das Ausgangsprotein. Vermutlich ist die b'-Domäne ebenfalls in der Lage die Peptide zu binden. Ähnliches konnte auch schon für andere Chaperondomänen gezeigt werden (Zoldák & Schmid, 2011). Wie bereits in Kapitel 3.2.5 vermutet, ist es möglich, dass die Bindungsstelle der b'-Domäne innerhalb der Tertiärstruktur der PDI-Chimäre SS sehr nah am aktiven Zentrum der FKBP-Domäne lokalisiert ist. Daher kommt es möglicherweise zu einer Anreicherung des Peptidsubstrates am aktiven Zentrum, so dass die Weiterleitung effizienter vonstatten gehen kann. Die Peptidaktivität der SurA-Chimäre SS war für alle Peptide mit unterschiedlichen Sequenzen vor Pro erniedrigt. Dies lässt sich durch die Beeinträchtigung der FKBP-Domäne durch die Insertion erklären. Die hohe Spezifität der Prolylisomerase hFKBP12 blieb jedoch erhalten.

In Abbildung 3-34b ist die Proteinfaltungsaktivität für N2-Varianten mit den Xaa-Pro-Sequenzen, die denen der Tetrapeptide entsprechen, gezeigt. Wie bereits für Glu-Pro-N2

gezeigt, ist die Faltungsaktivität von hFKBP12 für Proteinsubstrate sehr niedrig. Außerdem zeigt hFKBP12 die gleiche hohe Sequenzspezifität, wie für die Tetrapeptide. Die katalytische Aktivität für die N2-Rückfaltung zeigt für die verschiedenen Sequenzmotive $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte von niedriger als 0,5 (Glu-Pro) bis $19 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Phe-Pro) und variiert damit um Faktor 38. In allen chimären Proteinen konnte durch Anwesenheit der Chaperondomäne die Faltungsaktivität deutlich gesteigert werden. Besonders bemerkenswert ist, dass trotz der erniedrigten Peptidaktivität der SurAChimäre SS, die Proteinfaltungsaktivität im Bereich von 10^5 bis $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ liegt. Die artifizielle SurA-Chimäre SS erreicht sogar nahezu die Proteinfaltungsaktivität des natürlichen Faltungshelfers SlyD. Im Gegensatz zu hFKBP12 unterscheiden sich die $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte der Chimären für die verschiedenen Xaa-Pro-N2-Varianten sehr viel weniger und variieren nur um Faktor zwei bis drei. Durch Anwesenheit einer Chaperondomäne kann also die hohe Substratspezifität des aktiven Zentrums der PPIase herabgesetzt werden. Dies wurde auch schon für andere Faltungshelfer beobachtet, die jedoch von Natur aus bereits eine zusätzliche Bindedomäne besitzen (Jakob *et al.*, 2009; Drögemüller, 2011). Die chimären Enzyme zeigen, dass die Anwesenheit einer hydrophoben Chaperondomäne essentiell ist für eine hohe Faltungsaktivität. Dabei ist es nicht von Bedeutung woher diese Domänen stammen. Alle hier untersuchten Chaperondomänen sind in der Lage hFKBP12 in ein effizientes Faltungsenzym zu verwandeln.

Tabelle 3-10: Spezifitätskonstanten von hFKBP12, ausgewählten chimären Enzymen und SlyD für die Prolylisomerisierung in Tetrapeptiden und die Rückfaltung von N2-Varianten.

Variante	Spezifitätskonstante $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)									
	Tetrapeptid					Protein				
	Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe- <i>p</i> Na					Xaa-Pro-N2				
	Leu	Phe	Lys	Glu	Ala	Leu	Phe	Lys	Glu	Ala
hFKBP12	2300	1030	74	5.5	230	16	19	4.8	<0.5	3
GroEL-Chimäre 7	952	1225	65	3.1	52	44	80	31	26	33
PDI-Chimäre SS	2400	940	1093	38	1220	167	163	90	57	96
PDI-Chimäre SS k	51	110	29	1.5	12	178	205	105	85	98
SurA-Chimäre SS	290	290	23	1.9	29	510	505	330	180	240
SurA-Chimäre SS k	160	208	14	1.7	27	440	970	340	260	180
SlyD	1100	2620	330	3.6	230	1270	1550	620	330	930

Die $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ Werte wurden anhand von Experimenten wie sie in Abbildung 3-33 dargestellt sind bestimmt. Die Messungen wurde in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 (*cis/trans*-Isomerisierung im Tetrapeptid Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-*p*Na) bzw. in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,0 (Rückfaltung von Xaa-Pro-N2) mit variierender Prolylisomerasekonzentration bei 15 °C durchgeführt. Die AS in der Kopfzeile jeder Spalte entspricht der AS Xaa im Tetrapeptid Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-*p*Na oder in der jeweiligen Xaa-Pro-N2-Variante. Die Bestimmung der $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte erfolgt wie in Abbildung 3-33 beschrieben. Die Daten für hFKBP12 und SlyD wurden der Arbeit Jakob *et al.* (2009) entnommen.

In Tabelle 3-10 sind zusätzlich zu den Aktivitätsdaten von PDI-Chimäre SS und SurA-Chimäre SS auch die Daten für die Varianten mit dem verkürzten Linker zwischen den Domänen zusammengefasst (PDI-Chimäre SS k und SurA-Chimäre SS k). PDI-Chimäre SS k

ist durch die Linkerverkürzung in ihrer Peptidaktivität enorm beeinträchtigt. Dies lässt vermuten, dass die b'-Domäne innerhalb der Tertiärstruktur dieser Chimäre sehr nah am aktiven Zentrum der FKBP-Domäne lokalisiert ist und somit die Bindung der Peptide im aktiven Zentrum der PPIase behindert wird. Dass die Peptidaktivität in PDI-Chimäre SS k so stark erniedrigt ist, die Proteinfaltungsaktivität für die verschiedenen N2-Varianten jedoch im gleichen Bereich liegen wie für PDI-Chimäre SS, deutet ebenfalls darauf hin, dass das aktive Zentrum durch die b'-Domäne sterisch behindert wird. Vermutlich gelangen kurze Peptide nicht mehr zum aktiven Zentrum, wohingegen größere Proteinsubstrate in ihrer Bindung an die b'-Chaperondomäne nicht beeinflusst sind. SurA-Chimäre SS k, die ebenfalls den verkürzten Linker zwischen den Domänen besitzt, zeigt ähnliche Peptidaktivitäten wie SurA-Chimäre SS (Tabelle 3-10). Dies deutet an, dass im Gegensatz zu PDI-Chimäre SS k die SurA-Chaperondomäne im chimären Konstrukt nicht in der Nähe des aktiven Zentrums der PPIase lokalisiert ist. Die Proteinfaltungsaktivität konnte für fast alle N2-Varianten sogar gesteigert werden. Wenn die Bindungsstelle der Chaperondomäne in der SurA-Chimäre wirklich sehr weit entfernt von der PPIase ist, so ist es nicht verwunderlich, dass bei Verkürzung des Abstandes zwischen beiden Domänen die Substratweitergabe effizienter vonstatten geht, und damit die Faltungshelferaktivität erhöht werden konnte.

3.2.9 Die Substratbindung der chimären Faltungshelfer ist hochdynamisch

Die katalytische Aktivität $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ eines Enzyms beschreibt seine Effizienz bei niedrigen Substratkonzentrationen. Um die Frage zu beantworten, wodurch Enzyme zu effizienten Faltungshelfern werden, ist es notwendig die einzelnen enzymatischen Kenngrößen k_{kat} und K_{M} aus Michaelis-Menten-Experimenten zu bestimmen, oder die Affinität und Bindungsdynamik anhand von Bindungsexperimenten zu untersuchen. Im Fall von PPIasen mit zusätzlicher Chaperondomäne reflektiert der K_{M} -Wert im Wesentlichen die Affinität der Chaperondomäne für entfaltete Substrate, die Umsatzzahl k_{kat} beschreibt, wie schnell Substrate von der Chaperondomäne dissoziieren bzw. wie effizient sie zur PPIase Domäne transferiert werden. SlyD ist ein äußerst effizienter Faltungshelfer bei dem die enzymatischen Parameter durch die Chaperondomäne und nicht durch das aktive Zentrum der PPIase bestimmt werden. Die Chaperondomäne von SlyD bindet mit hoher Affinität entfaltete Substrate und die Bindung und Dissoziation der Substrate an der Chaperondomäne ist hoch dynamisch (Zoldák & Schmid, 2011). Dies scheint essentiell zu sein für eine hohe Faltungshelferaktivität.

Um die Bindungseigenschaften der Chimären genauer zu untersuchen, und somit die Ursache der unterschiedlichen Aktivitäten der Chimären im Vergleich zu SlyD zu klären, wurden Bindungsexperimente mit RNaseT1_{Cys}-AEDANS durchgeführt. Wie schon in Kapitel 3.1.5 beschrieben, liegt RNaseT1_{Cys} aufgrund der eingeführten Substitutionen (Cys2Ser, Cys6Ser, Cys10Asn, Pro39Ala, Ser54Gly, Pro55Asn und Trp59Phe) auch noch in 2 M NaCl in entfalteter Form vor. Da es kein Trp und nur noch das C-terminale Cys110 besitzt, ist es möglich, RNaseT1_{Cys} mit dem Fluorophor AEDANS zu markieren, das in FRET-

Experimenten als Akzeptor dienen kann. Da alle Chimären schon mindestens ein Trp (Trp59 der FKBP-Domäne) besitzen, ist es notwendig, dass das Akzeptormolekül im Substrat lokalisiert ist, ansonsten würde es zu intramolekularem FRET kommen.

Der Abstand zwischen den C $_{\alpha}$ -Atomen von Trp59 in der FKBP-Domäne von hFKBP12-IF zu Val99, welches sich innerhalb einer Schleife der IF-Domäne befindet, die an der Bindung beteiligt ist (Weininger *et al.*, 2009), beträgt 43,34 Å. Dieser Abstand ist zu groß, um durch das FRET-Paar Tryptophan/AEDANS, das einen Försterabstand von 22 Å besitzt (Lakowicz, 1999), aufgelöst zu werden. Da die insertierten Chaperondomänen deutlich größer sind als die IF-Domäne, sind die Bindungsstellen der Chaperondomänen möglicherweise noch weiter von Trp59 entfernt als innerhalb von hFKBP12-IF. Für die Bindungsexperimente ist es daher notwendig, dass die chimären Proteine ein Trp innerhalb der Chaperondomäne besitzen, da Trp59 der FKBP-Domäne zu weit entfernt ist, um als Energiedonor in Bindungsexperimenten zu dienen. Die SurA-Chimäre SS besitzt natürlicherweise ein Trp an Position 412 innerhalb der C-terminalen Helix und damit innerhalb der Chaperondomäne (Abbildung 3-29a). Die GroEL-Chimäre 7 und PDI-Chimäre SS besitzen natürlicherweise kein Trp. Daher wurde an den oberflächenexponierten Positionen Glu209 der apikalen Domäne in der GroEL-Chimäre 7 (Abbildung 3-21b) und Glu306 der b'-Domäne in der PDI-Chimäre SS (Abbildung 3-27a) jeweils ein Tryptophanrest als Fluoreszenzdonor eingeführt. Um zu überprüfen, ob die Substitution die Aktivität der Chimären beeinträchtigt, wurden die Peptidaktivität und die Faltungsaktivität der Varianten bestimmt. GroEL-Chimäre 7 E209W besitzt eine Peptidaktivität von 880 mM⁻¹s⁻¹ und eine Proteinfaltungsaktivität für RCM-T1 von 23 mM⁻¹s⁻¹. Die PDI-Chimäre SS E306W zeigt für die Prolylisomerisierung einen $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ von 1413 mM⁻¹s⁻¹ und für die Proteinfaltungsaktivität von RCM-T1 eine Aktivität von 41 mM⁻¹s⁻¹. Beide Chimären werden also durch die Tryptophansubstitution in ihrer Aktivität nicht beeinflusst und eignen sich somit als Fluoreszenzdonoren für FRET-Messungen. Bei der Bindung der Chimären an RNaseT1_{Cys}-AEDANS sollte Energie von dem Tryptophanrest in der Chaperondomäne auf den Farbstoff AEDANS übertragen werden. Zunächst wurden Fluoreszenzspektren der einzelnen Bindungspartner bzw. einer Mischung aus Donor und Akzeptor aufgenommen. Exemplarisch sind in Abbildung 3-35 die Fluoreszenzspektren der SurA-Chimäre SS, von RNaseT1_{Cys}-AEDANS und einer Mischung beider Bindungspartner gezeigt. Um nur den intermolekularen FRET zu detektieren, wurden die Fluoreszenzspektren nach Anregung bei 295 nm aufgenommen. Durch Anregung bei 280 nm könnte es zu intramolekularem FRET der Tyrosine auf die Tryptophane innerhalb der chimären Proteine kommen. Für die SurA-Chimäre SS kann bei Bindung an RNaseT1_{Cys}-AEDANS keine Abnahme der Donorfluoreszenz beobachtet werden. Allerdings kommt es bei der Interaktion der beiden Bindungspartner zu einer deutlichen Zunahme der Akzeptorfluoreszenz, die somit als Sonde der Komplexbildung genutzt werden kann (Abbildung 3-35).

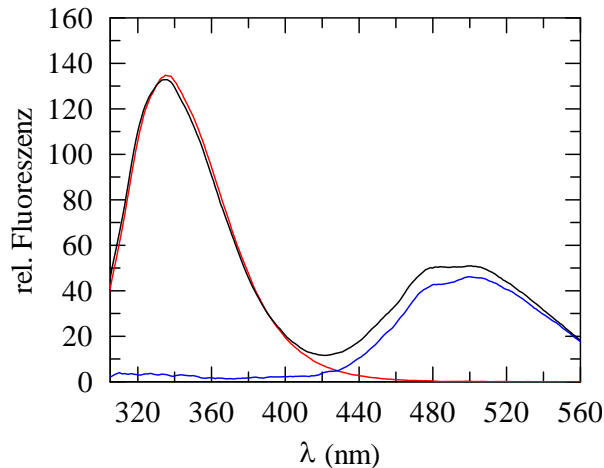


Abbildung 3-35: Fluoreszenzspektren von 5 μM SurA-Chimäre SS (rot), 5 μM RNaseT1_{Cys} (blau) und des Komplexes aus 5 μM SurA-Chimäre SS und 5 μM RNaseT1_{Cys}. Die Spektren wurde mit einer Anregung bei 295 nm, mit Bandbreiten von 3 nm (Anregungsspalt) und 5 nm (Emissionsspalt) und einer mittleren Sensitivität in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 M NaCl bei 15 °C aufgenommen.

Der in Abbildung 3-35 gezeigte Energietransfereffekt ermöglicht es, die Assoziation im Gleichgewicht zu untersuchen. Die Dissoziationskonstante wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 475 nm durch Titration von RNaseT1_{Cys}-AEDANS mit steigenden Konzentrationen an SurA-Chimäre SS bestimmt (Abbildung 3-36a). Analog dazu wurde die Affinität der isolierten SurA-Chaperondomäne für RNaseT1_{Cys}-AEDANS ermittelt. Der K_D für den Komplex aus RNaseT1_{Cys}-AEDANS und SurA-Chimäre SS bzw. der isolierten SurA-Chaperondomäne ist mit 0,89 μM bzw. 0,84 μM nahezu identisch (Abbildung 3-36a, Tabelle 3-11). Dies zeigt, dass die Chaperondomäne durch den Einbau in hFKBP12 in ihrer Affinität für entfaltete Substrate nicht beeinflusst ist. Die Bindung von RNaseT1_{Cys}-AEDANS an die isolierte SurA-Chaperondomäne oder auch im chimären Konstrukt ist sogar noch besser als die Bindung von SlyD D101W ($K_D = 1,2 \mu\text{M}$, Kapitel 3.1.5, Tabelle 11). Für die GroEL-Chimäre 7 E209W und die PDI-Chimäre SS E306W war die Fluoreszenzänderung bei den Gleichgewichtstitrationen für eine quantitative Auswertung zu gering. Um eine mögliche Ursache für die geringere Faltungsaktivität der Chimären im Vergleich zu SlyD zu finden und um eine Aussagen über die Dynamik der Substratbindung machen zu können, wurde die Kinetik der Komplexbildung zwischen RNaseT1_{Cys}-AEDANS und den chimären Proteinen untersucht. Die Komplexbildung wurde nach *stopped-flow*-Mischung anhand der Zunahme der integralen Fluoreszenz oberhalb von 450 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. In Abbildung 3-36b sind exemplarisch Zeitverläufe für die Assoziation von jeweils 4 μM SurA-Chimäre SS, SlyD D101W und hFKBP12 mit 0,5 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS gezeigt. In Anwesenheit von hFKBP12 und RNaseT1_{Cys}-AEDANS bleibt das Signal konstant. Es kommt also tatsächlich zu keinem Energietransfer von der FKBP-Domäne zum Proteinsubstrat, demzufolge ist die FKBP-Domäne allein nicht in der Lage RNaseT1 zu binden. Die Kinetiken, die in Abbildung 3-36b gezeigt sind, spiegeln daher den Verlauf der Komplexbildung zwischen den jeweiligen Chaperondomänen der Chimären und RNaseT1_{Cys}-AEDANS wider. Die Assoziation der SurA-Chimäre SS und

RNaseT1_{Cys}-AEDANS ist ein äußerst schneller Prozess der bereits nach 20 ms abgeschlossen ist. Die Assoziation von SlyD D101W und RNaseT1_{Cys}-AEDANS ist erst nach 100 ms abgelaufen und damit deutlich langsamer (Abbildung 3-36b).

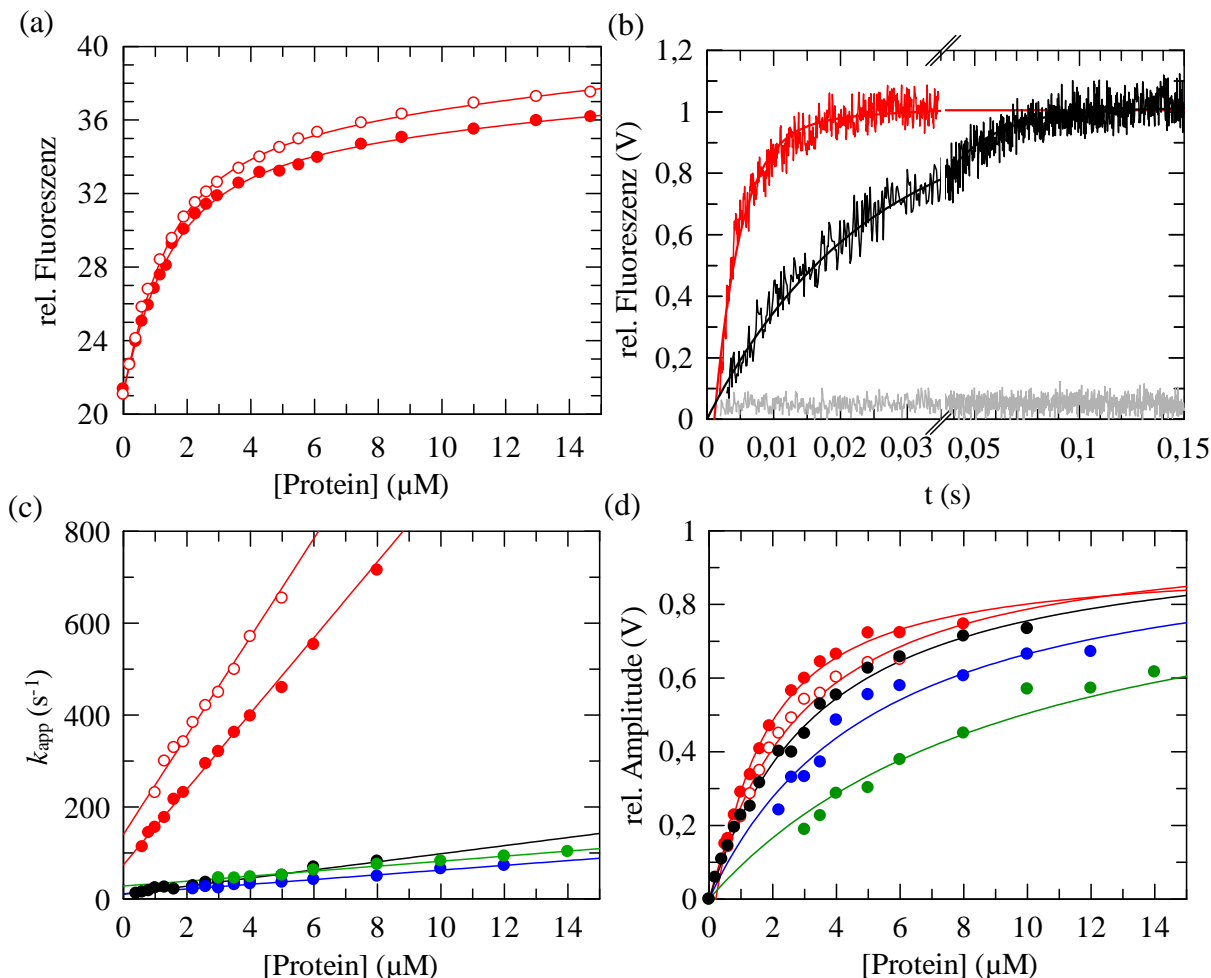


Abbildung 3-36: (a) Fluoreszenzänderung bei Assoziation von 1 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS mit steigenden Konzentrationen an SurA-Chimäre SS (●) und isolierter SurA-Chaperondomäne (○), detektiert anhand der Zunahme der Akzeptorfluoreszenz von RNaseT1_{Cys}-AEDANS bei 475 nm nach Anregung bei 295 nm. Die durchgezogenen Linien stellen den Angleich von Gleichung 2-29 an die Messpunkte dar, die daraus resultierenden K_D -Werte sind in Tabelle 3-11 zusammengefasst. Die Messungen wurden mit Bandbreiten von 3 nm (Anregung) und 5 nm (Emission) durchgeführt. (b) Assoziation der SurA-Chimäre SS und SlyD D101W mit RNaseT1_{Cys}-AEDANS. Gezeigt ist der Zeitverlauf der Komplexbildung von 0,5 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS mit 4 μM der SurA-Chimäre SS (rot), 4 μM SlyD (schwarz) und 4 μM hFKBP12 (grau). Die Daten wurden durch Angleich monoexponentieller Funktionen (durchgezogene Linien) analysiert, die daraus resultierenden apparenten Raten betragen $k_{app} = 398 \text{ s}^{-1}$ (SurA-Chimäre SS) und $k_{app} = 42,5 \text{ s}^{-1}$ (SlyD). (c) Apparente Raten und (d) Amplituden der Assoziationsreaktionen von 0,5 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS und der SurA-Chimäre SS (●), der isolierten SurA-Chaperondomäne (○), der PDI-Chimäre SS E306W (●), der GroEL-Chimäre 7 E209W (●) und SlyD D101W (●). Lineare Regression der apparenten Assoziationsraten (c, durchgezogene Linien) liefert die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} , die in Tabelle 3-11 zusammengefasst sind. Die Linien in (d) zeigen den Angleich von Gleichung 2-29 an die Messpunkte, die daraus resultierenden K_D -Werte sind in Tabelle 3-11 gezeigt. Die Assoziationsreaktionen wurden anhand der integralen Fluoreszenz oberhalb von 450 nm nach Anregung bei 280 nm an einem *sequential stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer gemessen. Alle Messungen wurden in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 M NaCl bei 15 °C durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Gleichgewichtstitrationen konnte auch für GroEL-Chimäre 7 E209W und die PDI-Chimäre SS E306W die Kinetik der Assoziation mit RNaseT1_{Cys}-AEDANS untersucht werden. Die Raten und Amplituden der Assoziationskinetiken steigen mit zunehmender Chaperonkonzentration und konnten mit Hilfe von monoexponentiellen Funktionen analysiert werden. Die aus der Analyse erhaltenen apparenten Assoziationsraten und Amplituden sind in Abbildung 3-36c und d dargestellt.

Da die chimären Faltungshelfer, die SurA-Chaperondomäne und SlyD D101W im Vergleich zu RNaseT1_{Cys}-AEDANS im Überschuss vorliegen, vereinfacht sich die Analyse der Komplexbildung von einer Reaktion zweiter Ordnung zu einer Reaktion pseudo-erster Ordnung. Die Auftragung der apparenten Assoziationsraten mit steigender Titrandkonzentration liefert einen linearen Verlauf. Durch lineare Regression und unter Voraussetzung einer 1:1 Stöchiometrie der Bindungspartner können die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_{on} und Dissoziation k_{off} bestimmt werden (Abbildung 3-36c). Aus dem Quotienten der mikroskopischen Raten kann zudem die Dissoziationskonstante K_D bestimmt werden.

Die Assoziationsraten der SurA-Chimäre SS und der isolierten SurA-Chaperondomäne sind sehr viel höher, als die der PDI-Chimäre SS E306W, der GroEL-Chimäre 7 E209W und von SlyD D101W (Tabelle 3-11). Mit einer Geschwindigkeitskonstante k_{on} von $82 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ist die Komplexbildung aus SurA-Chimäre SS und entfaltetem Protein ein extrem schneller Prozess, der wahrscheinlich diffusionslimitiert ist. Auch die Geschwindigkeitskonstante k_{off} ist mit 74s^{-1} im Vergleich zu bisher bekannten Diffusionsraten von Proteinkomplexen sehr hoch. Dieser Wert aus der Analyse der Assoziationskinetiken konnte durch direkte Dissoziationsexperimente bestätigt werden. Die elffache Verdünnung eines Komplexes aus $1 \mu\text{M}$ RNaseT1_{Cys}-AEDANS und $1 \mu\text{M}$ SurA-Chimäre SS resultiert in einer Dissoziationsreaktion mit einer Rate von 80s^{-1} (Daten nicht gezeigt). Der Komplex aus SurA-Chimäre SS und RNaseT1 hat demzufolge nur eine Lebensdauer von 13 ms. Anhand der Geschwindigkeitskonstanten zeigt sich, dass die Bindung der SurA-Chimäre SS an entfaltete Proteine ein hochdynamischer Prozess ist. Der Quotient k_{off}/k_{on} ergibt eine Dissoziationskonstante von $0,9 \mu\text{M}$, die sehr gut mit dem K_D -Wert der Gleichgewichtstitration übereinstimmt (Tabelle 3-11). Die Dissoziationskonstante kann außerdem aus der Abhängigkeit der Amplituden der Assoziationskinetiken von der Titrandkonzentration bestimmt werden (Abbildung 3-36d, Gleichung 2-29). Auch hier zeigt sich für die SurA-Chimäre SS eine ähnlich hohe Affinität für entfaltete Proteinsubstrate ($K_D = 1,7 \mu\text{M}$, Tabelle-3-11). Aufgrund des schlechten Signal/Rauschen-Verhältnisses, ist jedoch der K_D -Wert der durch die Auswertung der apparenten Raten ermittelt wurde verlässlicher.

Für die isolierte Chaperondomäne von SurA ergeben sich bei der Komplexbildung mit RNaseT1 mit $k_{on} = 107 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_{off} = 140 \text{s}^{-1}$ ähnlich hohe Geschwindigkeitskonstanten wie für die SurA-Chimäre SS (Tabelle 3-11). Die Substratbindung und -freisetzung ist ein extrem dynamischer Prozess, der anscheinend eine intrinsische Eigenschaft der Chaperondomäne von SurA ist. Aus dem Quotient der Geschwindigkeitskonstanten ergibt

sich eine Dissoziationskonstante von 0,8 μM , die dem K_D -Wert der SurA-Chimäre SS sehr ähnlich ist. Die nahezu identischen Affinitäten für entfaltete Proteine zeigen, dass die SurA-Chaperondomäne in ihren Bindungseigenschaften durch die Insertion in hFKBP12 nicht beeinflusst wurde.

Für die PDI-Chimäre SS E306W, die GroEL-Chimäre 7 E209W und SlyDD101W sind die apparenten Assoziationsraten und auch die Dissoziationsraten sehr viel niedriger, als für die SurA-Varianten. Der Komplex aus Enzym und entfaltetem Protein wird also viel langsamer gebildet und hat eine längere Lebensdauer als bei der SurA-Chimäre SS und der isolierten SurA-Chaperondomäne. Der Komplex aus GroEL-Chimäre 7 E209W und RNaseT1_{Cys} hat eine Lebensdauer von 37 ms, für SlyD D101W und die PDI-Chimäre SS E306W befindet sich die Lebensdauer des Komplexes sogar im Bereich von 100 ms. Trotz dieser Unterschiede ergibt der Quotient der Geschwindigkeitskonstanten für SlyD D101W eine ähnliche Bindungskonstante wie für die SurA-Chimäre SS und die isolierte SurA-Chaperondomäne. Im Gegensatz dazu sind die Affinitäten der PDI-Chimäre SS E306W und der GroEL-Chimäre 7 E209W niedriger (2,1 μM und 5,1 μM) als für die SurA-Chimäre SS. Insbesondere die K_D -Werte, die anhand der Amplitudenauswertung ermittelt wurden zeigen, dass die PDI-Chimäre SS E306W und die GroEL-Chimäre 7 E209W keine so hohe Affinität für entfaltete Substrate besitzen, wie es bei der SurA-Chimäre SS der Fall ist (Tabelle 3-11). Vermutlich ist dies einer der Gründe dafür, dass die SurA-Chimäre der effizienteste der konstruierten Faltungshelfer ist. Die PDI-b'-Domäne und die GroEL-apikale Domäne kommen in den jeweiligen natürlichen Proteinen PDI und GroEL nicht als einzige Substratbindungsdomäne vor. Innerhalb des GroEL-Komplexes sind 14 Chaperondomänen an der Proteinfaltung beteiligt und auch innerhalb der PDI existiert mit der b-Domäne eine weitere Proteinbindungsdomäne. Möglicherweise ist dies insbesondere im Fall der GroEL-Chimäre 7 E209W eine Erklärung für die geringere Substrataffinität im Vergleich zu den anderen Proteinen. Bemerkenswert ist jedoch, dass alle Chimären mit hoher Affinität an entfaltete Proteine binden und die Bindung hoch dynamisch ist. Dies ist essentiell für ein effizientes Faltungsenzym.

Tabelle 3-11: Parameter der Interaktion von RNaseT1_{Cys}-AEDANS mit den chimären Proteinen.

	k_{on}^{a} ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	$k_{\text{off}}^{\text{a}}$ (s^{-1})	$k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (μM)	K_D^{b} (μM)	K_D^{c} (μM)
SurA-Chimäre SS	$82,47 \pm 1,73$	$74,02 \pm 4,01$	0,90	$1,74 \pm 0,2$	$0,89 \pm 0,08$
SurA-Chaperondomäne	$107,35 \pm 3,47$	$140,16 \pm 11,40$	1,31	$2,60 \pm 0,3$	$0,84 \pm 0,06$
PDI-Chimäre SS M306W	$5,15 \pm 0,21$	$10,96 \pm 1,33$	2,13	$4,86 \pm 1,13$	-
GroEL-Chimäre 7 E209W	$5,43 \pm 0,08$	$27,61 \pm 1,11$	5,09	$9,59 \pm 1,22$	-
SlyD D101W	$8,81 \pm 0,51$	$9,95 \pm 1,82$	1,13	$2,63 \pm 0,20$	$1,16 \pm 0,05$

^a Die mikroskopischen Ratenkonstanten der Assoziation k_{on} und Dissoziation k_{off} wurden wie unter Abbildung 3-36c beschrieben, anhand der Abhängigkeit der apparenten Raten von der Enzymkonzentration ermittelt.

^b Die K_D -Werte wurden durch Angleich von Gleichung 2-29 an die Amplituden der Assoziationskinetiken, wie in Abbildung 3-36d bzw. 3-16b gezeigt, erhalten.

^c Die K_D -Werte wurden anhand von Gleichgewichtstitrationen, wie in Abbildung 3-36a bzw. 3-14b gezeigt, ebenfalls durch Angleich von Gleichung 2-29 an die Daten erhalten. Die Messungen erfolgten unter den in Abbildung 3-36a bzw. 3-14b beschriebenen Bedingungen.

3.3 Insertion einer Chaperondomäne in die Parvulindomänen der Prolylisomerase SurA

Der vorangegangene Teil dieser Arbeit hat gezeigt, dass es möglich ist, hFKBP12 durch die Insertion einer Chaperondomäne in ein effizientes Faltungsenzym zu verwandeln. Die Herkunft der Chaperondomäne spielt dabei keine Rolle. Ausschlaggebend ist anscheinend nur die Anwesenheit einer hydrophoben Bindedomäne, die aus der Prolylisomerase hFKBP12 ein aktives Faltungsenzym macht, das in der Lage ist prolinlimitierte Proteinfaltung zu katalysieren. Doch die FKBP-Proteine sind nicht die einzige Klasse von Prolylisomerasen. Falls es ein genereller Effekt ist, dass die kovalente Verknüpfung einer Chaperondomäne mit einer PPIase in einem effizienten Faltungsenzym resultiert, dann sollte dies auch mit PPIasen einer anderen Familie möglich sein.

Neben der Familie der FKBP-Proteine existiert unter anderem die Familie der Parvuline. Der erste Vertreter der Parvuline wurde erst 1994 entdeckt, das Parvulin10 (Par10) aus *E. coli* (Rahfeld *et al.*, 1994a). FKBP-Proteine und Parvuline sind sich in ihrer Faltungstopologie, nicht aber in ihrer Sequenz, ähnlich (Abbildung 3-37a). Wie auch die FKBP-Proteine, die keine zusätzliche Bindungsdomäne besitzen, zeigen die Parvuline nur eine geringe Aktivität in der prolinlimitierten Proteinfaltung (Scholz *et al.*, 1997a; Behrens *et al.*, 2001). Neben Pin1 ist das wahrscheinlich bekannteste Faltungsenzym der Parvulinfamilie die schon in Kapitel 3.2 beschriebene periplasmatische Prolylisomerase SurA. SurA besteht aus einer Chaperondomäne und zwei Prolylisomerasedomänen, die beide der Familie der Parvuline angehören. Die inaktive Parvulindomäne1 (Par1) bildet zusammen mit der Chaperondomäne die Haupteinheit des Proteins. Die Parvulindomäne2 (Par2) ist als eine Art Satellitendomäne über zwei lange Polypeptidlinker mit den beiden anderen Domänen verbunden. SurA und auch die isolierte Parvulindomäne2 sind gegenüber prolinhaltigen Peptiden katalytisch aktiv. Zudem ist das Volllängenprotein SurA in der Lage, die Rückfaltung von RCM-T1 zu beschleunigen. Im Gegensatz dazu besitzt die isolierte Parvulindomäne2, ähnlich wie hFKBP12, nur eine sehr geringe Aktivität für die prolinlimitierte Rückfaltung von Proteinen. Um zu überprüfen, ob die Insertion einer Chaperondomäne auch die Faltungshelferaktivität von Parvulinen erhöhen kann, wurde sowohl in die Parvulindomäne1, als auch in die Parvulindomäne2 die IF-Domäne von SlyD als Chaperondomäne eingebaut. Falls es ein genereller Effekt ist, dass die Verknüpfung mit einer Chaperondomäne die Faltungsaktivität von PPIasen erhöht, so sollte insbesondere für Par2 die Anwesenheit der IF-Domäne die Faltungsaktivität erhöhen.

3.3.1 Konstruktion der chimären Parvuline

Die FKBP-Chimären waren konstruiert worden, indem die Chaperondomänen anstelle einer Schleife aus 13 Aminosäuren insertiert wurden, die sich in der Nähe des C-Terminus befindet. In der Struktur der Parvuline entspricht diese Schleife einer kurzen Verbindung aus nur vier Aminosäuren (Abbildung 3-37a, am Beispiel von hPar14 gezeigt). Da sich schon im vorangegangenen Kapitel für hFKBP12 gezeigt hat, dass durch die Insertion der Chaperondomänen zahlreiche kovalente Kontakte verlorengehen, scheint dieser Insertionsort nicht geeignet zu sein. Vermutlich ist diese sehr kurze Verbindung aus nur vier Aminosäuren zu unflexibel und eine Domäneninsertion würde vermutlich die Interaktion der Faltblätter stören und somit die Parvulindomäne destabilisieren. Eine spezielle Gruppe der Parvuline, die phosphatspezifischen Parvuline, besitzen zwischen dem Faltblattstrang $\beta 1$ und der Helix $\alpha 1$ eine zusätzliche Schleife (Abbildung 3-34a) (Sekerina *et al.*, 2000). Diese Schleife ist hochkonserviert innerhalb dieser Gruppe und essentiell für die Interaktion mit phosphoryliertem Ser bzw. Thr vor dem Prolin innerhalb des Substrates. In Par1 und Par2 aus SurA fehlt diese phosphatspezifische Schleife. Daher wurde an dieser Stelle die IF-Domäne von SlyD insertiert. Um ausreichende Flexibilität zwischen den Domänen zu gewährleisten wurden als Linkerbereiche die Aminosäuren KHS (N-terminal) und TR (C-terminal), die die phosphatspezifische Schleife von hPin1 flankieren, verwendet (Abbildung 3-37b und c, blau). Die somit konstruierten Proteine Par1+IF und Par2+IF wurden exprimiert, gereinigt und hinsichtlich ihrer Stabilität, Aktivität und ihrer Chaperon- und Bindungseigenschaften untersucht. Ein Teil der Reinigung und Charakterisierung von Par2 und Par2+IF wurde unter meiner Anleitung von Marc Wehmer im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt (M. Wehmer, 2010).

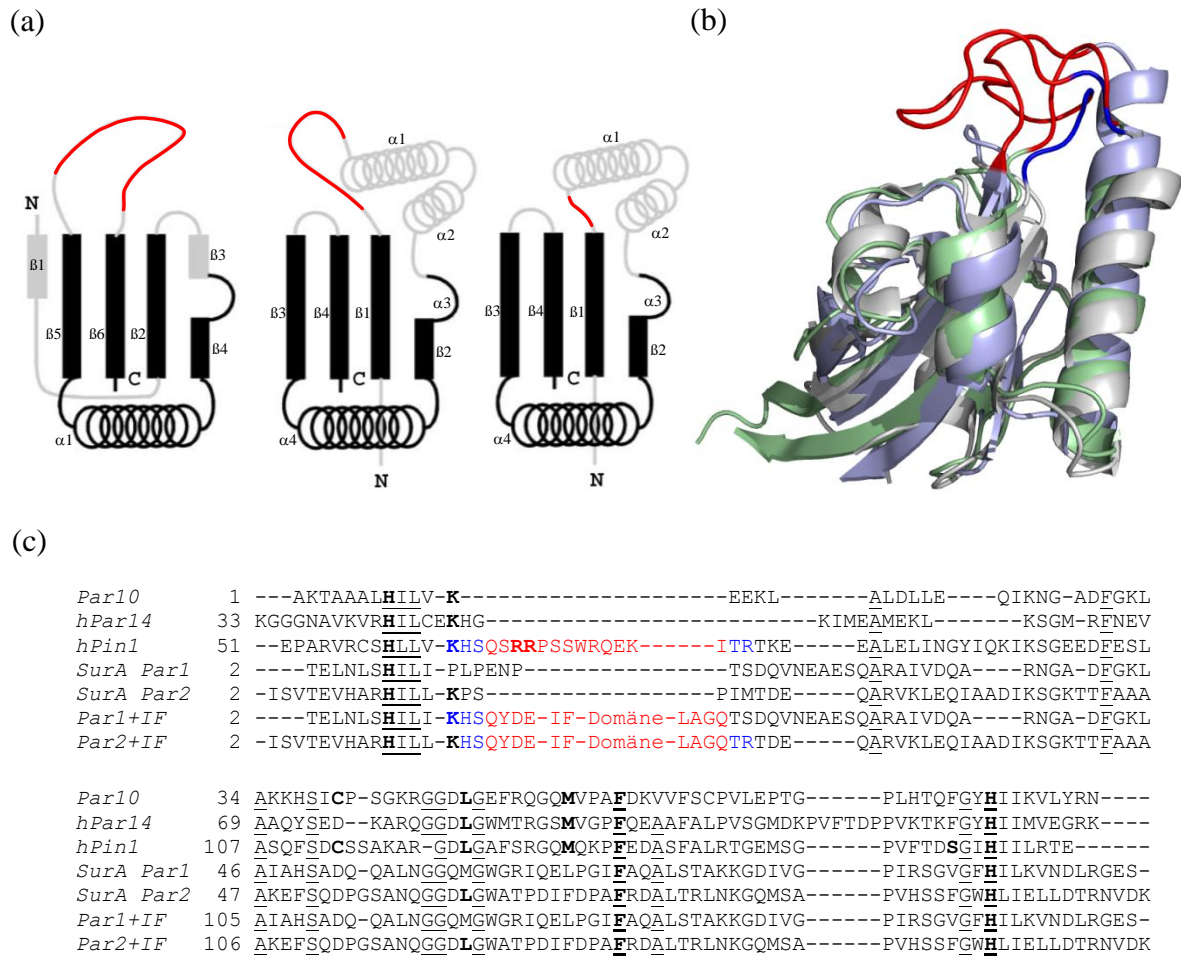


Abbildung 3-37: (a) Schematische Darstellung der Anordnung der Sekundärstrukturelemente der FKBP-Proteine und der Parvuline, von links nach rechts: hFKBP12, hPin1, hPar14. Die Abbildung wurde der Arbeit Sekerina *et al.* (2000) entnommen und nachträglich bearbeitet. Die Schleifen, die als Insertionsort für die jeweiligen Chaperondomänen dienen, sind in rot dargestellt. Strukturell ähnliche Sekundärstrukturelemente der Proteine sind in schwarz dargestellt (Rechtecke: β -Faltblattstränge, Spiralen: α -Helices, Linien: Schleifen und kurze Verbindungen), in grau gezeigte Elemente sind unterschiedlich zwischen den Proteinen. (b) Überlagerung der Tertiärstrukturen von hPin1 (grau), der Par1 (hellblau) und der Par2 (hellgrün) aus SurA. Die phosphatspezifische Schleife von hPin1 bzw. die Schleifen von Par1 und Par2 in den die IF-Domäne insertiert wurde, ist in rot dargestellt. Die AS von hPin1, die als Linker zwischen IF- und Parvulindomäne dienen sind in dunkelblau dargestellt. (c) Sequenzvergleich ausgewählter Parvuline. Das Sequenzalignment wurde mit Hilfe des Programmes BioEdit/Clustal W erstellt (Hall, 1999) und anschließend aufgrund des Strukturvergleichs der Parvuline manuell bearbeitet. Die AS von hPin1, die als Verbindung zwischen IF-Domäne und Parvulindomäne gewählt wurden, sind in dunkelblau gezeigt, die phosphatspezifische Schleife von hPin1 und die IF-Domäne von SlyD in rot. Konservierte AS innerhalb der Parvuline sind unterstrichen, für die Katalyse wichtige Reste sind fett gedruckt.

3.3.2 Die Insertion der IF-Domäne destabilisiert die Parvulin-Domänen

Wie schon für die FKBP-Chimären ist es natürlich auch für die Parvulin-Chimären notwendig, zunächst den Einfluss der Insertion auf die Stabilität der Prolylisomerase-Domäne zu untersuchen. Marc Wehmer konnte im Rahmen seiner Bachelorarbeit bereits feststellen, dass der Einbau der IF-Domäne Par2 stark destabilisiert. Außerdem wurde im Konzentrationsbereich bis zu 1 M GdmCl eine Fluoreszenzabnahme festgestellt, die nicht der konformationellen Entfaltung entspricht, sondern möglicherweise die Stabilisierung durch niedrige Konzentrationen an GdmCl widerspiegelt. Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um einen Salzeffekt handelt oder um ein Fluoreszenzsignal, das durch strukturelle Änderungen hervorgerufen wird, wurde die Stabilität gegenüber GdmCl von Par2 und Par2+IF anhand der Änderung der Elliptizität bei 222 nm gemessen. Für Par1 und Par1+IF wurde die Stabilität anhand der Fluoreszenzänderung bei 340 nm ermittelt. Die normierten Übergänge für alle Parvulin-Varianten sind in Abbildung 3-38 gezeigt.

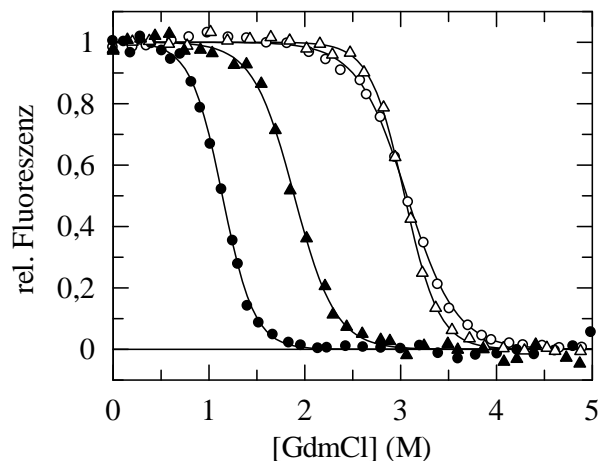


Abbildung 3-38: GdmCl-induzierte Entfaltung von Par1 (○), Par1+IF (●), Par2 (△) und Par2+IF (▲). Gezeigt sind die normierten Entfaltungsübergänge, die in Abhängigkeit der GdmCl-Konzentration gemessen wurden. Die Entfaltungsübergänge von Par1 und Par1+IF wurden mit 1 μ M Protein anhand der Fluoreszenzänderung bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Die Bandbreiten betragen 3 nm für das Anregungs- bzw. 5 nm für das Emissionslicht. Die Entfaltungsübergänge von Par2 und Par2+IF wurden mit 2 μ M Protein anhand der Änderung der Elliptizität bei 222 nm mit einer Bandbreite von 1 nm gemessen. Alle Messungen wurden mit einer Schichtdicke von 1 cm in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 bei 15 °C durchgeführt. Die Linien entsprechen der Auswertung der Daten gemäß eines Zweizustandsmodells, die daraus resultierenden thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3-12 zusammengefasst.

Beide Parvulindomänen sind in isolierter Form sehr stabil. Sie besitzen mit 3,07 M GdmCl (Par1) und 3,03 M GdmCl (Par2) nahezu identische Übergangsmittelpunkte bei 15 °C. Für die Parvulindomäne2 ist das nicht verwunderlich, da sie als Satellitendomäne relativ exponiert innerhalb des SurA-Proteins vorkommt. Par1 bildet zusammen mit der Chaperondomäne den Kern des SurA-Proteins, da aber ihre Tertiärstruktur Par2 sehr ähnlich ist, ist die hohe thermodynamische Stabilität nicht überraschend. Der für Par2 beobachtete Salzeffekt (Wehmer, 2010), der bei der mittels Fluoreszenz detektierten Entfaltung von Par2 und

Par2+IF beobachtet wurde, konnte für die Par1-Varianten nicht beobachtet werden. Da die Parvulindomänen drei α -Helices besitzen, kann die Entfaltung der Parvulindomäne2 sehr gut anhand der Änderung der Elliptizität bei 222 nm analysiert werden. Da es hier zu keiner Signaländerung im Bereich niedriger GdmCl-Konzentrationen kommt, ist anzunehmen, dass es sich bei der von M. Wehmer beobachteten Fluoreszenzabnahme wie bereits vermutet um einen Salzeffekt handelt und nicht um ein Fluoreszenzsignal, das durch strukturelle Änderungen hervorgerufen wird.

Durch den Einbau der IF-Domäne von SlyD werden beide Parvulindomänen enorm destabilisiert. Der Übergangsmittelpunkt verschiebt sich im Konstrukt Par1+IF von 3,07 M auf 1,15 M GdmCl. Für Par2+IF verschiebt sich der Übergangsmittelpunkt von 3,03 M auf 1,89 M GdmCl (Tabelle 3-12). Die Parvulindomäne1 ist durch die Insertion in ihrer Stabilität deutlicher beeinflusst als Par2. Für den Einbau der IF-Domäne wurde die N-terminale flankierende Linkersequenz KHS aus hPin1 verwendet. Die Parvulindomäne2 besitzt an der entsprechenden Position im Linker schon von Natur aus einen Lysinrest, während in Par1 an dieser Stelle ein Prolin lokalisiert ist. Dieses Prolin befindet sich am Rand des Faltblattstranges β 1. Möglicherweise ist Par1 daher durch das Entfernen der Schleife und das Einführen der Linkerbereiche aus hPin1 deutlicher beeinflusst als Par2. Bemerkenswert ist jedoch, dass beide Parvulin-Chimären trotz der Destabilisierung noch gefaltet vorliegen. Im Gegensatz zu den FKBP-Chimären, kommt es durch den Einbau der IF-Domäne nicht zur vollständigen Entfaltung der Wirtsdomäne, vermutlich weil die Parvulindomänen ursprünglich eine sehr viel höhere Stabilität besitzen als hFKBP12. Außerdem besitzt die IF-Domäne ebenfalls den schon für die FKBP-Chimären verwendeten natürlichen Linker aus SlyD, der wahrscheinlich stabilisierende Kontakte ausbildet. Anders als bei den FKBP-Chimären ist es nicht möglich eine Aussage über die Stabilität der Gast- bzw. IF-Domäne innerhalb des chimären Konstruktes zu machen. Da für die Stabilität der SlyD-IF-Domäne das Zusammenhalten der Termini notwendig ist, läuft die Entfaltung der IF-Domäne gekoppelt an die Entfaltung der Parvulindomänen ab.

Tabelle 3-12: Stabilitätsdaten der Parvulin-Varianten.

Protein	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)
Par1	3,07	9,3	28,5
Par1+IF	1,15	14,4	16,5
Par2	3,03	13,4	40,6
Par2+IF	1,89	11,1	21,0

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte $[\text{GdmCl}]_{1/2}$, die Kooperativitätsparameter m und die freie Enthalpien der Entfaltung bei 15 °C $\Delta G_D^{15^\circ\text{C}}$. Die GdmCl-induzierte Entfaltung wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm (Par1 und Par1+IF) und anhand der Änderung der Elliptizität bei 222 nm (Par2 und Par2+IF) wie unter Abb. 3-38 beschrieben verfolgt. Die Analyse der Daten erfolgte auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells.

Die Flexibilität der Schleife, die als Insertionsort dient und die Linkersequenzen zwischen Prolylisomerase und Chaperondomäne sind entscheidend für die Stabilität der chimären Proteine. Dies zeigte sich auch in einem alternativen Konstrukt aus Par10 aus *E. coli* als Prolylisomerase und der IF-Domäne von SlyD als Chaperondomäne bei dem ebenfalls die schon für Par1+IF und Par2+IF verwendeten flankierenden Aminosäuren aus hPin1 eingefügt wurden. Obwohl Par10 eine ähnlich hohe Stabilität aufweist ($T_M = 71$ °C, Daten nicht gezeigt) wie die Parvulindomänen von SurA, wurde in diesem chimären Konstrukt Par10 durch den Einbau der IF-Domäne vollständig entfaltet (Ergebnisse nicht gezeigt). Grund dafür ist möglicherweise, dass die Helix $\alpha 1$ deutlich kürzer ist, als in Par1 und Par2 von SurA und somit weniger stabilisierende Kontakte ausbilden kann. Außerdem besteht die Schleife, die Faltblattstrang $\beta 1$ und Helix $\alpha 1$ verbindet in Par10 nur aus drei Aminosäuren, während die entsprechende Schleife in Par1 bzw. Par2 aus sieben bzw. acht Aminosäuren besteht. Trotz der eingefügten Aminosäuren von hPin1 und der Linkersequenzen der IF-Domäne ist anscheinend eine ausreichende Flexibilität nicht gewährleistet. Die Konstruktion dieser Parvulin-Chimären, wie auch schon die Konstruktion der FKBP-Chimären zeigt, dass die Domäneninsertion in die Schleife eines Wirts-Proteins ein intrinsisch destabilisierender Prozess ist, da die lokalen, stabilisierenden Kontakte des Schleifenbereiches unterbrochen werden.

3.3.3 Eine aktive Prolylisomerasedomäne ist essentiell für ein effizientes Faltungsenzym

Durch die Insertion der IF-Domäne kommt es zu einer enormen Destabilisierung der beiden SurA-Parvulindomänen. Dass die Insertion verschiedener Chaperondomänen stark destabilisierend wirkt, konnte auch schon für die FKBP-Chimären gezeigt werden (Kapitel 3.2). Die Destabilisierung der FKBP-Domäne korrelierte bei den FKBP-Chimären mit deren Prolylisomeraseaktivität. Für die Parvulin-Chimären konnte dies nicht festgestellt werden. Par1 weist schon natürlicherweise keine Prolylisomeraseaktivität auf. Eine mögliche Ursache hierfür ist ein Methioninrest anstelle eines Leucinrestes an Position 61. Dieser Leucinrest ist hochkonserviert in anderen Parvulinen und an der Katalyse beteiligt (Leu122 in hPin1). Demzufolge besitzt auch das Konstrukt Par1+IF keine Aktivität für die *cis/trans*-Isomerisierung der Prolylbindung im Tetrapeptid Abz-Ala-Leu-Pro-Phe-*p*Na. Im Gegensatz zu Par1 ist Par2 eine aktive Prolylisomerase. Verglichen mit hFKBP12 ist die Prolylisomeraseaktivität der Parvulindomäne2 jedoch 20fach niedriger, außerdem zeigt Par2 bei der Untersuchung der Isomerisierung verschiedener Abz-Tetrapeptide eine erhöhte Spezifität für Glu-Pro-Sequenzen. Marc Wehmer konnte während seiner Bachelorarbeit zeigen, dass die Insertion der IF-Domäne die Peptidaktivität der Parvulindomäne nahezu unbeeinflusst lässt, lediglich die hohe Sequenzspezifität für Glu-Pro-Sequenzen war herabgesetzt. Dass innerhalb der Parvulin-Chimären der Stabilitätsverlust nicht mit einem Verlust an Prolylisomeraseaktivität einhergeht ist nicht verwunderlich, da das aktive Zentrum der Parvuline viel weiter vom Insertionsort entfernt ist, als es bei hFKBP12 der Fall ist. Die Reste des aktiven Zentrums der Parvuline bilden eine hydrophobe Tasche, an der

insbesondere die Reste Leu122, Met130 und Phe134 beteiligt sind (Nummerierung der Reste entspricht der Nummerierung innerhalb von hPin1). Zudem spielen auch His59, His157 und Ser154 für die Substratinteraktion eine wichtige Rolle. Bis auf His59 sind alle diese Reste weiter entfernt vom Insertionsort, als es bei den FKBP-Chimären der Fall ist.

Da die Prolylisomeraseaktivität von Par2 durch die Insertion der IF-Domäne nicht herabgesetzt wurde und das chimäre Protein gefaltet vorliegt, konnte untersucht werden, ob die Anwesenheit der Chaperondomäne zu einer Erhöhung der Faltungshelferaktivität führt. Auch für das Konstrukt aus Par1 und IF-Domäne wurde untersucht, ob das Vorhandensein der IF-Domäne trotz der fehlenden Prolylisomeraseaktivität die Aktivität für die prolinlimitierten Proteinfaltung verbessern kann. Die Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch die chimären Parvulin-Varianten ist in Abbildung 3-39 dargestellt.

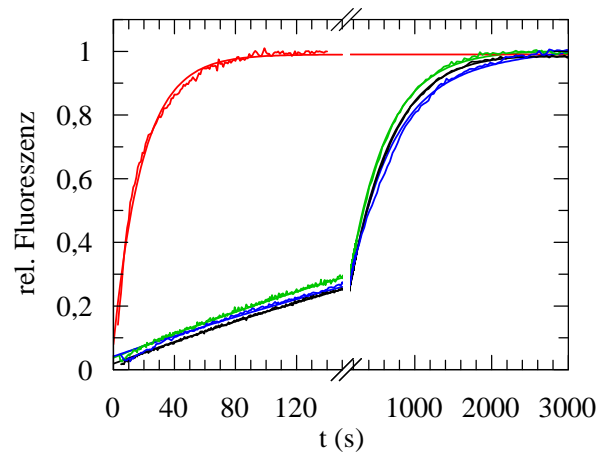


Abbildung 3-39: Katalyse der prolinlimitierten Rückfaltung von RCM-T1. Gezeigt ist die Rückfaltung von 0,1 μM RCM-T1 in Abwesenheit einer PPIase (schwarz) und in Anwesenheit von jeweils 1 μM Par2 (grün), Par2+IF (rot) und Par1+IF (blau). Die Rückfaltung wurde anhand der Fluoreszenzänderung bei 320 nm (Bandbreite 5 nm) nach Anregung bei 268 nm (Bandbreite 3 nm) in 0,1 M Tris/HCl, 2 M NaCl, pH 8,0 bei 15 °C verfolgt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass trotz der Anwesenheit der IF-Domäne, das Konstrukt Par1+IF nicht in der Lage ist, die Proteinfaltung von RCM-T1 zu katalysieren. Dies zeigt, dass das Vorhandensein einer minimalen katalytischen Aktivität innerhalb der Prolylisomerasedomäne für die prolinlimitierte Faltung notwendig ist. Ist die Isomerase vollkommen inaktiv, kann der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der prolinlimitierten Faltung nicht katalysiert werden. Par2 besitzt mit einem $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ von 0,15 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ eine sehr niedrige Faltungshelferaktivität, wie auch schon von Behrens *et al.* gezeigt werden konnte. Da bereits die Prolylisomeraseaktivität von Par2 niedriger ist als für hFKBP12, ist die um Faktor 100 niedrigere Faltungsaktivität von Par2 nicht verwunderlich. Umso bemerkenswerter ist daher, dass durch die Insertion der IF-Domäne Par2 in einen aktiven Faltungshelfer verwandelt werden konnte. Par2+IF katalysiert die Rückfaltung von RCM-T1 mit einer Spezifitätskonstante $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ von 70 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Wehmer, 2010). Die kovalente Verknüpfung mit

der IF-Domäne führt also zu einer 470fachen Steigerung der Faltungsaktivität. Eine weitere Erklärung für die erhöhte Faltungsaktivität wäre, dass es aufgrund der Destabilisierung durch die Domäneninsertion zu einem „Aufweichen“ der Prolylisomerase domäne kommt, was möglicherweise eine erhöhte Prolylisomeraseaktivität zur Folge hat. Würde dies zutreffen, wäre jedoch für das Konstrukt Par1+IF ebenfalls eine erhöhte Faltungsaktivität zu beobachten. Par1+IF zeigt jedoch keine Aktivität für prolinlimitierte Faltung. Die Erhöhung der Faltungsaktivität kann daher ausschließlich auf die Anwesenheit der IF-Domäne zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse für die chimären Parvulin-Varianten zeigen, dass die Insertion einer Chaperondomäne auch eine Prolylisomerase der Parvulin-Familie in einen effizienten Faltungshelfer verwandeln kann. Vermutlich ist dies ein genereller Effekt, der unabhängig ist von der Herkunft der jeweiligen Chaperon- bzw. Prolylisomerase domäne. Voraussetzung ist jedoch, dass die Prolylisomerase katalytische Aktivität besitzt.

3.3.3 Die Parvulin-Chimären sind in der Lage entfaltete Proteinsubstrate zu binden und besitzen *in vitro* Chaperonaktivität

Um den Einfluss der IF-Domäne auf die Substratbindung zu untersuchen, wurde die Bindung der Parvulin-Chimären an das entfaltete Substrat RNaseT1_{Cys} analysiert. Dies wurde anhand von Gleichgewichtstitrationen mit RNaseT1_{Cys}-AEDANS (Abbildung 3-40) durchgeführt. Für die isolierten Parvulindomänen konnte dabei keine Bindung an das Proteinsubstrat beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Titration der beiden chimären Parvulin-Varianten kommt es mit steigender Konzentration an Enzym zu einem Fluoreszenzanstieg, der durch den Angleich einer Bindungskurve (Gleichung 2-29) analysiert werden kann.

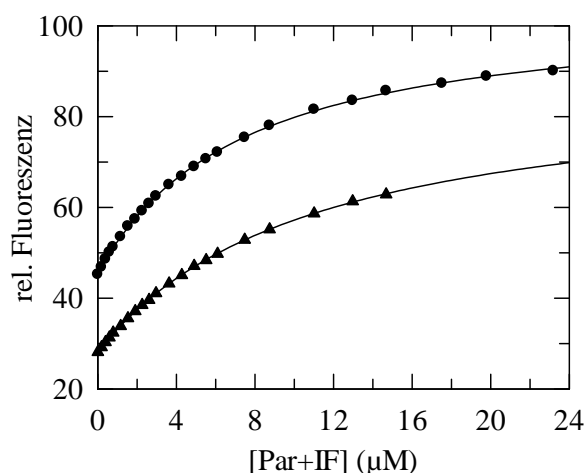


Abbildung 3-40: Fluoreszenzänderung bei Assoziation von 1 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS mit steigenden Konzentrationen an Par1+IF (●) und Par2+IF (▲) detektiert anhand der Zunahme der Akzeptorfluoreszenz von RNaseT1_{Cys}-AEDANS bei 475 nm nach Anregung bei 295 nm. Der Angleich von Gleichung 2-29 an die Messpunkte (durchgezogenen Linien) liefert K_D -Werte von 6,6 μM für Par1+IF und 10,1 μM für Par2+IF. Die Messungen wurden mit Bandbreiten von 3 nm (Anregung) und 5 nm (Emission) in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 M NaCl bei 15 °C durchgeführt.

Anhand der Analyse der Daten in Abbildung 3-40 wurden K_D -Werte von $6,6 \mu\text{M}$ für Par1+IF und $10,1 \mu\text{M}$ für Par2+IF erhalten. Par1+IF ist also aufgrund der insertierten IF-Domäne in der Lage entfaltete Proteinsubstrate zu binden, besitzt aber keine Faltungsaktivität (Kapitel 3.3.2) und ähnelt daher der Prolylisomerase SlpA (Kapitel 3-1). Die Chaperondomäne dominiert zwar die Bindungseigenschaften, die Prolylisomeraseaktivität ist jedoch notwendig um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der prolinlimitierten Faltung zu katalysieren und ist somit Voraussetzung für ein effizientes Faltungsenzym.

Der K_D -Wert für die chimären Parvulin-Varianten, insbesondere für Par2+IF, ist deutlich höher, als für vergleichbare Konstrukte, die die gleiche oder eine ähnliche IF-Domäne besitzen (SlpA, SlyD). Dies deutet darauf hin, dass die enorme Destabilisierung der Parvulin-domänen, die durch die Insertion der IF-Domäne verursacht wurde, sich auch negativ auf die Stabilität der IF-Domäne selbst auswirkt. Wie schon in Kapitel 3.1.5 kann für die isolierte IF-Domäne keine Bindung an Proteinsubstrate beobachtet werden. Möglicherweise ist ein Klammern der Enden notwendig für eine effiziente Bindung. Eventuell ist die IF-Domäne innerhalb der chimären Parvulin-Varianten in ihrer Stabilität beeinflusst, was zu einer erniedrigten Affinität für entfaltete Proteinsubstrate führt.

Um die Eigenschaften der chimären Proteine hinsichtlich ihrer Fähigkeit Proteinaggregation zu verhindern zu untersuchen, wurden Aggregationstests mit denaturierter Citratsynthase durchgeführt (Abbildung 3-41).

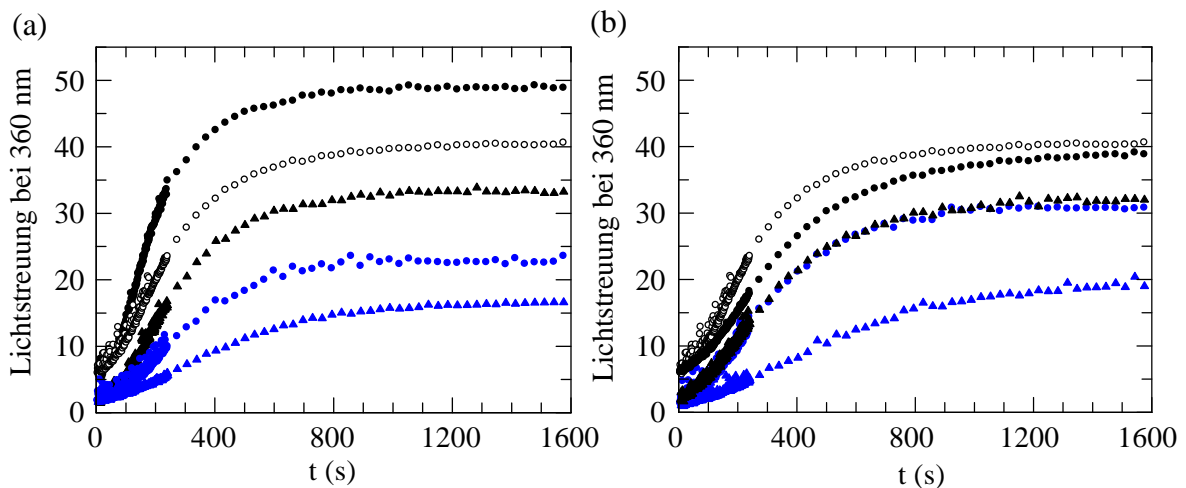


Abbildung 3-41: Citratsynthasetest zur Untersuchung der Chaperonaktivität der Parvulin-Chimären. Dargestellt ist die Aggregation von $0,15 \mu\text{M}$ chemisch denaturierter Citratsynthase in Abwesenheit (\circ) und in Anwesenheit von (a) $1 \mu\text{M}$ Par1 (\bullet), $1 \mu\text{M}$ Par1+IF (\circ), $3 \mu\text{M}$ Par1 (\blacktriangle) und $3 \mu\text{M}$ Par1+IF (\blacktriangle) und (b) $1 \mu\text{M}$ Par2 (\bullet), $1 \mu\text{M}$ Par2+IF (\circ), $3 \mu\text{M}$ Par2 (\blacktriangle) und $3 \mu\text{M}$ Par2+IF (\blacktriangle). Die Aggregation der chemisch denaturierten Citratsynthase (in 50 mM Tris/HCl, $\text{pH}^{15^\circ\text{C}}8,0$, 6 M GdmCl und 20 mM DTE) wurde durch 200fache Verdünnung in Endbedingungen von 50 mM Tris/HCl $\text{pH}^{15^\circ\text{C}}8,0$, 30 mM GdmCl und $0,1 \text{ mM}$ DTT initiiert und über die Zunahme des Streulichts bei 360 nm bei 15°C verfolgt. Die Bandbreiten betragen 1 nm für das Einstrahlungs- und 3 nm für das Streulicht.

In Abbildung 3-41 ist zu sehen, dass die Anwesenheit der isolierten Parvulin-domänen zu keiner deutlichen Abnahme der Aggregation von Citratsynthase führt. Die Zugabe von $1 \mu\text{M}$

Par1 scheint sogar zu einer erhöhten Aggregation zu führen. Die Zugabe von 3 μM isolierter Parvulindomäne führt jeweils zu verringerter Aggregation. Für die isolierten Parvulindomänen ist bekannt, dass sie nicht in der Lage sind, die Aggregation von Citratsynthase zu unterdrücken. Die Fähigkeit der isolierten Chaperondomäne von SurA die Aggregation herabzusetzen wird jedoch durch die Anwesenheit von Par1 bzw. Par2 erhöht (Behrens *et al.*, 2001). Obwohl die Auswertung dieses Aggregationstest nur qualitativ möglich ist und die Messungen sehr fehlerbehaftet sind scheint es, dass bei Anwesenheit der IF-Domäne die Aggregation von Citratsynthase stärker unterdrückt werden kann als dies für die isolierten Parvulindomänen der Fall ist. Insbesondere bei Zugabe von 3 μM der chimären Parvulin-Konstrukte kommt es zu einer deutlichen Verringerung der Proteinaggregation. Trotz der beeinträchtigten Bindungsfähigkeit ist die IF-Domäne innerhalb der chimären Parvulin-Konstrukte in der Lage *in vitro* als Chaperon zu fungieren.

3.3.4 Die IF-Domäne kann die *in vivo*-Funktion der SurA-Chaperondomäne nicht komplementieren

Im Folgenden wurde untersucht, ob die chimären Parvulinkonstrukte in der Lage sind, die *in vivo*-Funktion der Chaperondomäne von SurA zu komplementieren. Die *in vitro*-Experimente zur Proteinfaltungsaktivität zeigen, dass durch die Anwesenheit der IF-Domäne die Faltungsaktivität von Par2 enorm gesteigert werden konnte. Auch die *in vitro*-Chaperonfunktion konnte durch Insertion der IF-Domäne sowohl für Par1 als auch für Par2 erhöht werden. Besonders diese Eigenschaft vieler PPIasen als Chaperon zu fungieren ist innerhalb der Zelle besonders wichtig. Für SurA konnte gezeigt werden, dass die isolierte Chaperondomäne ausreicht, um den Phänotyp, der durch die Mutation des SurA-Gens hervorgerufen wird zu kompensieren (Behrens *et al.*, 2001).

Anhand von Deletionsstudien wurde die $\Delta\text{surA } \Delta\text{skp}$ Doppeldeletionsmutante identifiziert, die für die *E. coli* Zellen letal ist (Rizzitello *et al.*, 2001). Bei den verwendeten Stämmen steht das chromosomale SurA-Gen unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors (Matern *et al.*, 2010). Durch Anziehen der Zellen in Anwesenheit von IPTG kann die Letalität für die Zellen vermieden werden, da SurA exprimiert wird. Durch Einführen des Plasmids pASKSurA, bei dem das SurA-Gen unter Kontrolle eines Tet-induzierbaren Promotors steht, kann die $\Delta\text{surA } \Delta\text{skp}$ Doppeldeletionsmutante auch in Abwesenheit von IPTG, bei Zugabe von Tet komplementiert werden.

Um zu untersuchen, ob die IF-Domäne auch *in vivo* die Chaperonfunktion von SurA komplementieren kann, wurden Plasmide erstellt, bei denen die Konstrukte an die periplasmatische Signalsequenz von *OmpA* fusioniert wurden und bei denen die Gene für Par1+IF und Par2+IF unter Kontrolle eines Tet-induzierbaren Promotors stehen (pASKPar1+IF und pASKPar2+IF). Diese Plasmide, das Kontrollplasmid pASK75 und pASKSurA wurden jeweils in die *E. coli* $\Delta\text{surA } \Delta\text{skp}$ Doppeldeletionsmutante transformiert und bei 37 °C in Anwesenheit von IPTG 16 bis 25 h kultiviert. Die Übernachtskulturen wurden auf die gleiche OD₆₀₀ von 1 verdünnt. Anschließend wurden zehnfache Verdünnungen mit

IPTG-freiem dYT-Medium hergestellt. Jeweils 10 µl der 10^0 , 10^2 , 10^4 und 10^6 fachen Verdünnungen wurden auf dYT-Agarplatten (Km, Amp, Tet) mit und ohne 1 mM IPTG aufgetragen und bei 37 °C 16 bis 25 h inkubiert (Abbildung 3-42).

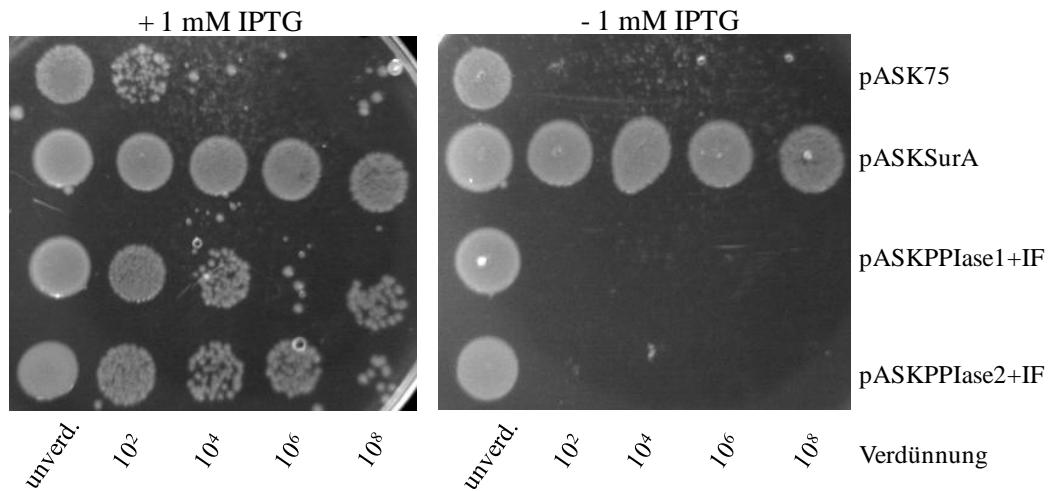


Abbildung 3-42: Konkurrenz des letalen Phänotyps der *E. coli* $\Delta surA \Delta skp$ Doppeldeletionsmutante. Gezeigt ist das Wachstum der $\Delta surA \Delta skp$ Doppeldeletionsmutante mit den jeweiligen Plasmiden pASK75, pASKSurA, pASKPar1+IF oder pASKPar2+IF. Die Zellen mit den jeweiligen Plasmiden wurden über Nacht angezogen und auf die gleiche OD_{600} von 1 verdünnt. Jeweils 10 µl einer 10^0 , 10^2 , 10^4 , 10^6 und 10^8 fachen Verdünnung wurden auf dYT-Agarplatten (100 µg/ml Amp, 50 µg/ml Km, 10 µg/ml Tet) \pm 1 mM IPTG ausplattiert und 16 h inkubiert.

In Anwesenheit von IPTG sind alle Konstrukte in der Lage auch bei hohen Verdünnungen zu wachsen. Durch IPTG wird die Synthese des chromosomalen SurA induziert und somit können die Zellen trotz des Fehlens von Skp wachsen. Die Zellen, die das leere Plasmid pASK75 besitzen zeigen das geringste Wachstum, was möglicherweise auf Abweichungen in der Verdünnung zurückzuführen ist. Für die Zellen, die das Plasmid pASKSurA tragen, konnte auch bei hohen Verdünnungen noch deutlich mehr Zellwachstum beobachtet werden, als bei den entsprechenden Zellen, die die Plasmide mit den chimären Parvulin-Varianten tragen. Möglicherweise kommt es durch gleichzeitige Induktion des chromosomalen SurA und des SurA-Gens das auf dem pASK-Plasmid codiert ist zu einem vermehrten Zellwachstum.

In Abwesenheit von IPTG sind die $\Delta surA \Delta skp$ -Zellen, die nur das leere Plasmid pASK75 tragen, bei hohen Verdünnungen nicht in der Lage zu wachsen, da weder Skp noch SurA exprimiert werden. Wie schon von Behrens *et al.* gezeigt wurde, kann in Abwesenheit von IPTG der Wachstumsdefekt der $\Delta surA \Delta skp$ Doppeldeletionsmutante durch SurA komplementiert werden. Für die Faltung und Assemblierung der Substrate im Periplasma von *E. coli* ist das Vorhandensein von einem der beiden Chaperone, Skp oder SurA, ausreichend. Par1+IF und Par2+IF besitzen zwar *in vitro* Chaperonaktivität, die chimären Konstrukte sind jedoch nicht in der Lage, die Wachstumsdefekte der Doppeldeletionsmutante zu kompensieren. Dies zeigt, dass für die Assemblierung der OMPs die Anwesenheit spezifischer periplasmatischer Chaperone notwendig ist. Es ist nicht verwunderlich, dass die

mit 69 AS sehr kleine IF-Domäne die Aufgabe der Chaperondomänen der periplasmatischen Faltungshelfer Skp und SurA nicht komplementieren kann. Auch das Vorhandensein der C-terminalen Helix der Chaperondomäne von SurA ist für die *in vivo*-Funktion von SurA notwendig. Dies zeigt, dass Eingriffe in das periplasmatische Chaperonsystem schwer zu kompensieren sind, da periplasmatische Chaperone, besonders SurA, eine hohe Spezifität für ihre Substrate aufweisen (Behrens *et al.*, 2001).

4 Zusammenfassende Diskussion

Molekulare Chaperone werden in der Biotechnologie eingesetzt um die rekombinante Herstellung viraler Antigene für immundiagnostische Anwendungen zu erleichtern. Durch die Fusion mit solchen Chaperonen, kann die Löslichkeit der Antigene erhöht werden (Scholz *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2008). Chaperone besitzen also nicht nur eine enorme Bedeutung für die Proteinfaltung innerhalb der Zelle, sondern auch für die Immundiagnostik. Daher ist es notwendig immer wieder neue Kandidaten von Chaperonen bzw. Faltungshelfern zu identifizieren und zu untersuchen, um das Spektrum an möglichen Fusionspartnern in der Immundiagnostik zu erweitern. Zudem ist es notwendig das molekulare Prinzip von Faltungshelfern besser zu verstehen, um ihr Anwendungsspektrum zu erweitern. Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben einen tieferen Einblick in die Funktion natürlich vorkommender Faltungshelfer. Zudem können anhand der Konstruktion artifiziieller Faltungshelfer aus verschiedenen nicht-verwandten Domänen genauere Erkenntnisse gewonnen werden, um das Funktionsprinzip solcher modular aufgebauter Enzyme zu verstehen.

4.1 SlpA - ineffiziente Prolylisomerase aber effizientes Chaperon

4.1.1 Hohe Chaperonaktivität und niedrige Prolylisomeraseaktivität sind konserviert innerhalb der SlpA-Familie

Ein Faltungshelfer, der in der Immundiagnostik als Fusionspartner Anwendung findet, ist die Peptidylprolylisomerase SlpA aus *E. coli*. SlpA ist aus zwei Domänen aufgebaut, der FKBP-Domäne, die für die Prolylisomeraseaktivität verantwortlich ist und der IF-Domäne, die in die FKBP-Domäne insertiert ist und Chaperonaktivität besitzt. Im Gegensatz zu anderen PPIasen wie SlyD und hFKBP12 ist SlpA eine sehr ineffiziente PPIase. Die hochaufgelöste NMR-Struktur lieferte keine konkreten Hinweise, warum die Prolylisomeraseaktivität von SlpA viel geringer ist als die der strukturell sehr ähnlichen PPIasen SlyD und hFKBP12. Die Untersuchung von homologen SlpA-Proteinen aus anderen Organismen zeigte, dass alle SlpA-Varianten eine ähnlich geringe Prolylisomeraseaktivität und Faltungshelferaktivität aufweisen wie *E. coli* SlpA. Die hohe Chaperonaktivität, die durch die IF-Domäne bedingt ist, ist jedoch in allen SlpA-Proteinen konserviert. Dies lässt vermuten, dass die Chaperonfunktion in der Zelle von größerer Bedeutung ist, als die Prolylisomeraseaktivität. Bisher konnten physiologisch bedeutsame PPIase-Funktionen nur in sehr wenigen Fällen nachgewiesen werden. hFKBP12 und Cyclophilin beispielsweise sind zwar an der Hemmung der T-Zell-Proliferation beteiligt und haben damit eine enorme Bedeutung für die Immunsuppression (Clardy, 1995; Hunter, 1998), jedoch ist ihre Prolylisomeraseaktivität für diese biologische Funktion nicht essentiell. Ähnliches wurde auch für die periplasmatische PPIase SurA beobachtet. Für die *in vivo*-Funktion von SurA ist nur das Vorhandensein der Chaperondomäne notwendig. Konstrukte, in denen die PPIasedomänen fehlen, besitzen

nahezu die gleiche *in vivo*-Aktivität wie Wildtyp-SurA (Behrens *et al.*, 2001). Auch die Prolylisomerase Trigger Faktor, der zugeschrieben wird, dass sie der erste Wechselwirkungspartner der Polypeptidkette ist, nachdem diese das Ribosom verlässt, ist in der Lage seine *in vivo*-Funktion auch ohne die PPIase-Domäne zu erfüllen (Kramer *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2010). Dies lässt vermuten, dass Chaperone, die zusätzliche PPIasedomänen besitzen, in erster Linie als Faltungshelfer für die nicht-prolinlimitierte Faltung zuständig sind bzw. ihre Hauptaufgabe darin besteht, unspezifisch die Konzentration an aggregationssensitiven ent- oder fehlgefalteten Proteinen zu erniedrigen. Somit hat die Prolylisomeraseaktivität von SlpA möglicherweise im Laufe der Evolution an Bedeutung verloren. Die physiologische Funktion von SlpA ist bisher noch ungeklärt. Die Chaperonaktivität von SlpA ist jedoch für seine Aufgaben in der Zelle anscheinend ausreichend.

4.1.2 Die Bindung von SlpA ist hochaffin und sehr dynamisch - die niedrige Faltungshelferaktivität ist somit in der Prolylisomerasedomäne begründet

Die niedrige Faltungshelferaktivität von SlpA kann in einer geringen Affinität für entfaltete Proteinsubstrate, einer niedrigen Dynamik der Bindung oder in der fehlenden Aktivität der Prolylisomerasedomäne begründet sein. Für andere Faltungshelferproteine mit einer zusätzlichen Bindungsdomäne wurde bereits gezeigt, dass eine hohe Affinität und Dynamik der Bindung durch die Chaperondomäne für ihre Funktion sehr wichtig sind. Die Bindung von SlpA an entfaltete Substrate ist mit einem K_D im Bereich von 1 μM hochaffin. Zudem ist die Bindung an die IF-Domäne ein extrem dynamischer Prozess. Der Komplex aus SlpA und dem Substrat RNaseT1_{Cys}-AEDANS bildet sich innerhalb von 26 ms und hat eine Lebensdauer von 57 ms. Damit läuft die Komplexbildung sogar noch schneller ab, als es für SlyD beobachtet wurde. Eine sehr schnelle Assoziation und eine kurze Lebensdauer solcher Enzym-Substrat-Komplexe sind für effiziente Faltungsenzyme essentiell. Eine ähnlich hohe Bindungsdynamik wurde beispielsweise schon für Triggerfaktor gezeigt (Maier *et al.*, 2001). Die Chimäre aus SlyD-FKBP-Domäne und SlpA-IF-Domäne zeigt ebenfalls, dass bei Anwesenheit einer effizienten PPIasedomäne, die Faltungshelferaktivität des resultierenden Enzyms sehr viel höher ist, als bei SlpA selbst. Dies zeigt unmittelbar, dass die Ursache der niedrigen Faltungshelferaktivität von SlpA in der FKBP-Domäne begründet ist. Die Chimäre katalysiert die Rückfaltung von RCM-T1 mit einer Umsatzzahl, die ähnlich hoch ist wie bei anderen modular aufgebauten Faltungsenzymen, wie SlyD, FKBP12-IF oder Trigger Faktor (Scholz *et al.*, 1997b; Scholz *et al.*, 2006; Knappe *et al.*, 2007). Für die Isomerisierung von Tetrapeptiden durch die PPIase hFKBP12, die keine Chaperondomäne besitzt, ist die Umsatzzahl ca. 800fach höher. Bei hFKBP12 wird die Umsatzzahl allein durch den Umsatz im aktiven Zentrum und damit ausschließlich durch die *cis/trans*-Isomerisierung bestimmt. Im Fall von PPIasen mit zusätzlicher Chaperondomäne wird die Umsatzzahl zum größeren Teil durch das Abdissoziieren von der Chaperondomäne und das Weiterreichen zum aktiven Zentrum bestimmt. Dabei kann es dazu kommen, dass erst fehlgefaltete Proteine die

Bindungsstelle verlassen müssen, um dann den effizienten Transfer faltender Substrate zum aktiven Zentrum zu ermöglichen, wodurch die niedrigere Umsatzzahl erklärt werden kann. Der K_M -Wert der SlyD-SlpA-Chimäre ist mit $4,35 \mu\text{M}$ höher als der K_D -Wert der für SlpA ermittelt wurde. Da die Dissoziationskonstante durch die IF-Domäne bestimmt wird, ist davon auszugehen, dass der K_D der SlyD-SlpA-Chimäre wahrscheinlich ebenfalls niedriger ist, als ihr K_M -Wert. Der K_M -Wert ist eine komplexere Größe als die Dissoziationskonstante und wird durch zahlreiche Prozesse beeinflusst, beispielsweise durch den Verlust des Substrates bei der Weitergabe von der Chaperondomäne zum aktiven Zentrum oder durch unproduktive Bindung innerhalb des PPIase-Zentrums, wodurch sich die Unterschiede zwischen K_D - und K_M -Wert möglicherweise erklären lassen.

4.1.2 Aufgrund der unterschiedlichen Stabilitäten ihrer IF-Domänen unterscheiden sich SlyD und SlpA grundlegend in ihren Faltungsmechanismen

In ihrer Domänenorganisation sind die Prolyliserasen SlyD und SlpA nahezu identisch. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihres Faltungsmechanismus.

Die SlpA-IF-Domäne ist in isolierter Form stabil, die SlyD-IF-Domäne hingegen nicht. Für ihre Stabilität ist das Klammern der Termini durch die FKBP-Domäne essentiell (Zoldák *et al.*, 2009b). Die SlpA-IF-Domäne ist somit intrinsisch sehr viel stabiler als die SlyD-IF-Domäne, die in isolierter Form entfaltet vorliegt. Die FKBP-Domänen von SlpA und SlyD hingegen besitzen eine nahezu identische Stabilität, die allerdings durch den Einbau der IF-Domänen unterschiedlich beeinflusst wird. Im Fall von SlpA wirkt die für sich stabile IF-Domäne stabilisierend auf die FKBP-Domäne, wodurch der Übergangsmittelpunkt von 3,5 auf 4,3 M Harnstoff erhöht wird. Bei SlyD hingegen destabilisiert die inhärent instabile IF-Domäne von SlyD ihre Wirtsdomäne, was in einer Verschiebung des Übergangsmittelpunktes von 3,4 auf 2,5 M Harnstoff resultiert. Dieser stabilisierende Effekt der SlpA-IF-Domäne wird bei der Analyse der SlyD-SlpA-Chimäre besonders deutlich. Während die SlyD-IF-Domäne die SlyD-FKBP-Domäne destabilisiert, wird diese durch die Insertion der SlpA-IF-Domäne enorm stabilisiert.

Aufgrund ihrer hohen Stabilität ist die IF-Domäne von SlpA in der Lage sowohl isoliert also auch innerhalb des Gesamtproteins unabhängig von der FKBP-Domäne zu falten. Ihre Faltung ist extrem schnell und läuft autonom ab. Für die Faltung der SlpA-IF-Domäne ist es nicht notwendig, dass die Termini durch die FKBP-Domäne zusammengehalten werden, wie es bei der SlyD-IF-Domäne der Fall ist. Wenn die Stabilität der SlpA-IF-Domäne oberhalb von 3 M Harnstoff nicht mehr ausreicht, wird ihre Faltung jedoch abhängig von der FKBP-Domäne und sie kann dann nur gekoppelt an die FKBP-Domäne falten. Die Entfaltung der IF-Domäne wird im Vergleich zur Entfaltung der isolierten IF-Domäne durch die noch gefaltete FKBP-Domäne stark verlangsamt. Die IF-Domäne entfaltet erst im Bereich oberhalb von 5 M Harnstoff, solange die FKBP-Domäne noch gefaltet vorliegt. Die IF-Domäne stabilisiert also nicht nur die FKBP-Domäne, sondern wird selbst durch die gefaltete FKBP-Domäne stabilisiert. Beide Domänen wirken wechselseitig stabilisierend. Somit unterscheiden

sich SlpA und SlyD trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit deutlich in ihren Faltungsmechanismen.

4.2 Substratanreicherung und Katalyse innerhalb verschiedener Domänen ist ein allgemeines Prinzip von Faltungshelferenzymen

Faltungshelferenzyme sind häufig aus mehreren Domänen aufgebaut, die bestimmte Aufgaben für ihre Aktivität übernehmen. Zusätzlich zur katalytischen Domäne, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung katalysiert (Bildung von Disulfidbrücken oder Prolylisomerisierung der Peptidbindung) besitzen viele Faltungshelferenzyme eine zusätzliche Chaperondomäne, die die Bindung an entfaltete oder teilgefaltete Substrate vermittelt. Die Ergebnisse mit den chimären Faltungshelferenzymen zeigen, dass eine zusätzliche Chaperondomäne die Faltungshelferaktivität von Prolylisomerasen erhöht. Die Kombination von Domänen aus nicht homologen Enzymen ermöglicht die Konstruktion aktiver Faltungsenzyme. Die verschiedenen Konstrukte zeigten, dass das allgemeine Prinzip von Faltungshelferenzymen von Substratanreicherung und -umsatz unabhängig ist von der Herkunft der Substratbindungsdomäne.

4.2.1 Domäneninsertionen sind kritisch für Stabilität und Aktivität der Wirtsdomäne

Sowohl die Konstruktion der FKBP-Chimären als auch die der Parvulin-Chimären zeigt, dass die Domäneninsertion in die Schleife eines Wirtsproteins ein intrinsisch destabilisierender Prozess ist, da die lokalen, stabilisierenden Kontakte der Schleife zerstört werden. Es kommt wahrscheinlich zu einem „Auseinanderdrücken“ der beiden Faltblattstränge $\beta 5$ und $\beta 6$, die diese Schleife verbindet. Da bei den FKBP-Chimären der Insertionsort der Chaperondomänen in der Nähe des aktiven Zentrums von hFKBP12 lokalisiert ist, korrelierte die daraus resultierende Destabilisierung mit einem Verlust an Prolylisomeraseaktivität. Im Fall der Parvulin-Chimären ist der Insertionsort der Chaperondomäne entfernt vom aktiven Zentrum. Die Prolylisomeraseaktivität von Par2+IF war daher nahezu unbeeinflusst durch die Insertion der IF-Domäne. Wie auch schon bei den FKBP-Chimären kam es jedoch durch den Einbau der Chaperondomäne zu einer enormen Destabilisierung der Parvulindomäne. Die Insertion der homologen IF-Domäne von SlyD in hFKBP12 führte ebenfalls zu einer Destabilisierung von hFKBP12 (Knappe *et al.*, 2007). Wie schon ausgeführt ist die IF-Domäne von SlyD in Isolation nicht gefaltet. Daher ist der Grund der Destabilisierung bei hFKBP12-IF und somit auch bei den Parvulin-Chimären nicht nur der Verlust der stabilisierenden Kontakte der Schleife, die als Insertionsort dient, sondern auch der *per se* destabilisierende Einfluss der IF-Domäne von SlyD. Ähnliche Destabilisierungen der Wirtsdomäne wurden auch schon bei anderen Domäneninsertionsexperimenten beobachtet (Betton *et al.*, 1997; Ay *et al.*, 1998; Collinet *et al.*, 2000). Wie das Konstrukt aus SlyD-FKBP-Domäne und SlpA-IF-Domäne zeigte, kann es jedoch auch sein, dass die Insertion einer Domäne einen stabilisierenden Effekt auf die Wirtsdomäne hat. Möglicherweise wären Konstrukte aus den Parvulindomänen als Wirtsdomänen und der eingefügten SlpA-IF-Domäne besser geeignet um stabile und

faltungsaktive Chimären zu generieren. Insbesondere in der Hinsicht, da für Anwendungen in der Immundiagnostik ebenfalls eine hohe Stabilität der Faltungshelferenzyme notwendig ist.

4.2.2 Die Stabilität der Wirtsdomäne kann durch Optimierung des Linkerbereiches und durch kovalente Verknüpfung durch Disulfidbrücken verbessert werden

Obwohl die Chaperondomänen, die für die FKBP-Chimären verwendet wurden, in Isolation stabil sind, kommt es bei den chimären Proteinen zu einer enormen Destabilisierung der Wirtsdomäne, die vor allem durch den Verlust der kovalenten Kontakte innerhalb der Schleife von hFKBP12 bedingt ist. Diese Destabilisierung konnte durch Optimierung des Linkers zwischen den Domänen und durch Einführen einer Disulfidbrücke, die die Domänen entkoppelt und somit den destabilisierenden Einfluss verringert, deutlich erniedrigt werden. Der Übergangsmittelpunkt der Harnstoff-induzierten Entfaltung von isoliertem hFKBP12 liegt bei 3,0 M Harnstoff. Die Insertion der apikalen Domäne von GroEL entfaltet die FKBP-Domäne, wohingegen die apikale Domäne nur wenig in ihrer Stabilität beeinträchtigt wurde. Im Falle der FKBP-Domäne kam es damit zu einer Verschiebung des Übergangsmittelpunktes um mehr als 3 M Harnstoff. Durch Einführen eines natürlich vorkommenden Linkers, der die IF-Domäne in SlyD mit der PPIase-Domäne verbindet, und der schrittweisen Verlängerung des Linkers konnte die FKBP-Domäne sukzessive stabilisiert werden. Dies führte bis zu der GroEL-Chimäre 7 bei der ein Übergangsmittelpunkt von 1,6 M Harnstoff erreicht werden konnte, was einer Verschiebung des Übergangsmittelpunktes der FKBP-Domäne um nur noch 1,4 M Harnstoff entspricht. Die Wechselwirkungen des Linkers stabilisieren somit insbesondere die FKBP-Domäne. Verglichen mit hFKBP12-IF, wo die Insertion der homologen SlyD-IF-Domäne eine Verschiebung des Übergangsmittelpunktes um lediglich 0,7 M Harnstoff hervorrief, ist die Destabilisierung immer noch sehr groß. Vermutlich wirkt der größere Abstand der Termini der apikalen Domäne ebenfalls destabilisierend auf die Faltblattstränge $\beta 5$ und $\beta 6$, die als Insertionsort dienen.

Trotz der optimierten Linkerbereiche, führte der Einbau der b'-Domäne aus PDI und der Chaperondomäne aus SurA erneut zu einer deutlichen Destabilisierung der FKBP-Domäne. Dies zeigt wiederum, dass nicht nur der Verlust der stabilisierenden Kontakte der Schleife von hFKBP12 Grund für die Destabilisierung ist, sondern auch die destabilisierenden Effekte durch die Termini der Chaperondomänen, oder mögliche destabilisierende Ladungen die in die Nähe des Insertionsortes gebracht werden. Die PDI- und die SurA-Chimäre konnten durch Einführen einer Disulfidbrücke im Linkerbereich weiter stabilisiert werden. Die Disulfidbrücke führte jedoch zu keiner vollständigen Entkopplung der Domänen. Wäre dies der Fall, so sollte die FKBP-Domäne in diesen Chimären dieselbe Stabilität aufweisen, wie als isolierte Domäne. Durch eine nicht optimal positioniert Disulfidbrücke und dadurch resultierende Spannungen, könnte der stabilisierende Effekt verringert sein. Um eventuelle Spannungen zu unterdrücken wurden Varianten der Chimären konstruiert, bei denen die Disulfidbrücke hin zur Chaperondomäne verschoben worden war. Dies führte jedoch nicht zu einer Erhöhung der Stabilität der FKBP-Domäne (Varga, 2011). Die Chaperondomänen

konnten innerhalb der chimären Konstrukte durch die Disulfidbrücke enorm stabilisiert werden. Durch die kovalente Verknüpfung der Termini besitzt die entfaltete Kette weniger Anordnungsmöglichkeiten, was zu einer entropischen Stabilisierung führt.

Die Konstruktion der chimären Proteine hat gezeigt, dass durch Optimierung der Linkersequenzen zwischen den Domänen nach dem Vorbild einer natürlich vorkommenden Sequenz und durch den *de novo* Einbau von Disulfidbrücken die Stabilität artifizierender Proteine erhöht werden kann.

4.2.3 Durch die kovalente Verknüpfung von PPIase und Chaperondomäne kann die Faltungshelferfunktion der PPIase enorm gesteigert werden

Die Insertion einer Chaperondomäne in eine Prolylisomerase-domäne führte in fast allen Fällen zu einer Verringerung der Prolylisomeraseaktivität. Umso erstaunlicher ist es, dass für alle konstruierten chimären Proteine die Faltungshelferaktivität im Vergleich zur isolierten Prolylisomerase-domäne gesteigert werden konnte. Trotz der verringerten Peptidaktivitäten der GroEL-Chimäre 7 und der SurA-Chimäre SS um das 3fache bzw. 8fache konnte die Faltungshelferaktivität gegenüber dem Substrat RCM-T1 verdoppelt bzw. um das 8fache gesteigert werden. Auch für die PDI-Chimäre SS, bei der die Insertion der b'-Domäne in einer erhöhten Peptidaktivität resultierte, wurde die Faltungshelferaktivität gegenüber RCM-T1 um das 3fache erhöht. Der Grund für die hohe Peptidaktivität der PDI-Chimäre, die sogar höher ist als die von hFKBP12 allein ist unklar. Für PDI liegt der K_M -Wert für Peptide im Bereich $< 3 \mu\text{M}$ (Darby *et al.*, 1994). Für die isolierte b'-Domäne ist die Affinität für Peptide möglicherweise noch höher, wodurch vermutlich die Substratkonzentration auch am Prolylisomerasezentrum der PDI-hFKBP-Chimäre erhöht wird. Die besonders hohe Affinität der b'-Domäne für Peptide ist möglicherweise im Fehlen der x-Region begründet, die innerhalb von PDI mit der Ligandenbindungsstelle der b'-Domäne wechselwirkt und somit als Regulator der Affinität der PDI dient (Byrne *et al.*, 2009).

Die gesteigerte Faltungshelferaktivität der FKBP-Chimären zeigt sich besonders deutlich gegenüber Substraten, die eine negativ geladene Aminosäure an der Position vor Prolin besitzen. Gegenüber Peptiden die eine Glu-Pro-Sequenz enthalten ist die Aktivität der GroEL-Chimäre 7 und der SurA-Chimäre SS ebenfalls sehr niedrig. Die GroEL-Chimäre 7 zeigt jedoch für die entsprechenden Proteinsubstrate eine Faltungsaktivität die 50fach höher ist als die von isoliertem hFKBP12, die PDI-Chimäre SS weist eine 110fach und die SurA-Chimäre SS eine 360fach erhöhte Faltungsaktivität auf. Die Faltungshelferaktivität der optimierten chimären Proteine ist in allen Fällen höher als die der entsprechenden Prolylisomerase ohne Chaperondomäne.

Neben der Chaperondomäne besitzt SurA noch zwei zusätzliche Parvulindomänen, Par2 ist eine katalytisch aktive Prolylisomerase wohingegen Par1 inaktiv ist. Demzufolge konnte im Fall der Chimäre Par1+IF allein durch die Anwesenheit der Chaperondomäne kein effizientes Faltungsenzym konstruiert werden. Da durch das Fehlen der Prolylisomeraseaktivität von Par1 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Faltung nicht katalysiert wird, kann es zu

keiner beschleunigten Faltung von Proteinsubstraten kommen. Par1+IF ist also vergleichbar mit der Prolylisomerase SlpA, die zwar auch Chaperoneigenschaften aufweist und mit hoher Affinität an entfaltete Substrate bindet, aber nur eine sehr geringe Faltungshelferaktivität besitzt. Ist die Parvulindomäne jedoch eine aktive PPIase, wie im Fall von Par2, so kommt es durch die Insertion der IF-Domäne von SlyD zu einer 470fachen Steigerung der Faltungshelferaktivität (Wehmer, 2010). Dass es sich dabei um ein allgemeines Prinzip handelt, zeigt auch die Arbeit von E. Varga, die die IF-Domäne von SlyD auch innerhalb des Volllängenproteins SurA in die Par2-Domäne eingebaut hat. Somit besitzt das artifizielle SurA-Protein zwei Chaperondomänen. In diesem Fall konnte eine 6fache Steigerung der Faltungsaktivität im Vergleich zum Wildtyp-SurA erzielt werden (Varga, 2011), was erneut darauf hinweist, dass die lokale Substratanreicherung durch eine oder mehrere hydrophobe Bindedomänen in der Nähe des aktiven Zentrums ein allgemeiner Effekt von Faltungsenzymen ist. Da der Abstand zwischen Substratbindedomäne und dem katalytischen Zentrum scheinbar von Bedeutung ist, so wäre die Verkürzung des langen Linkers zwischen Par2 und der natürlichen Chaperondomäne von SurA ein weiterer Ansatz um die Faltungshelferaktivität im Vergleich zu Wildtyp-SurA zu erhöhen.

Für die Verbesserung der Faltungsaktivität ist eine kovalente Verknüpfung beider Domänen essentiell. Vermutlich kommt es durch die Anwesenheit der Chaperondomäne zu einer lokalen Anreicherung des Substrates in der Nähe des aktiven Zentrums. Das Chaperon muß also durch die kovalente Verknüpfung in die Nähe seines Wirkungsortes gebracht werden. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich auch für die Fusionsproteine aus verschiedenen Chaperonen und gp41. Eine Inkubation von gp41 mit SlyD oder FkpA führt zur Aggregation der HIV-Ektodomäne. Um gp41 löslich und in großen Mengen herzustellen ist eine kovalente Verknüpfung mit einem Chaperon notwendig. Bei der Interaktion zwischen Chaperon und gp41 kommt es genau wie mit der PPIase-Domäne zu einer intramolekularen Wechselwirkung, für die eine kovalente Verknüpfung essentiell ist. Die Herkunft der Chaperondomäne ist, wie auch in den konstruierten chimären Enzymen, von untergeordneter Bedeutung.

4.2.4 Die Erniedrigung der Substratspezifität durch Anwesenheit einer Chaperondomäne ist ein generischer Effekt

Die Affinität von hFKBP12 für Peptidsubstrate mit hydrophoben Resten an der P1-Position ist 1000fach höher als für negativ geladene Reste. Da hFKBP12 keine zusätzliche Chaperondomäne besitzt, zeigt es nur eine sehr geringe Faltungshelferaktivität für Proteinsubstrate, jedoch dieselbe hohe Sequenzspezifität für die Aminosäure vor Prolin wie gegenüber Peptiden. Die Peptidaktivität der FKBP-Chimären ist in gleichem Maße abhängig von der Aminosäure vor Prolin wie es bei hFKBP12 der Fall ist. Durch die Insertion einer Chaperondomäne wird nicht nur die niedrige Faltungshelferaktivität enorm gesteigert, darüberhinaus wird die Faltung verschiedener Proteinsubstrate mit unterschiedlichen Xaa-Pro-Sequenzen ähnlich gut katalysiert. Für hFKBP12 variiert die katalytische Aktivität

für die Katalyse von Glu-Pro-N2 und Phe-Pro-N2 um das 38fache, für die FKBP-Chimären variiert diese Aktivität nur noch um das 2 bis 3fache. Die Anwesenheit einer fremden Chaperondomäne setzt also die hohe Substratspezifität der Prolylisomerase hFKBP12 ähnlich herab, wie bei Prolylisomerasen, die natürlicherweise eine Chaperondomäne aufweisen (Jakob *et al.*, 2009). Diese hohe Substratspezifität der Prolylisomerasen ist inkonsistent mit ihrer Funktion in der Zelle. Durch die zusätzlichen Chaperondomänen wird das Spektrum an möglichen Substraten erweitert. Dies ist essentiell, da Faltungshelferenzyme viele mögliche Substrate erkennen und somit eine hohe Aktivität gegenüber Peptidylprolylbindungen in variierenden Sequenzmotiven aufweisen müssen.

4.2.5 Eine hohe Affinität und Dynamik der Bindung sind essentiell für effiziente Faltungshelferenzyme

Für die meisten Faltungshelferenzyme deren Bindungseigenschaften bisher untersucht wurden, konnte festgestellt werden, dass sie eine hohe Affinität gegenüber entfalteten Proteinsubstraten besitzen und die Bindung sehr dynamisch ist. Auch die FKBP-Chimären weisen eine hohe Affinität gegenüber dem entfalteten Proteinsubstrat RNaseT1_{Cys}-AEDANS auf. Mit einem K_D von 0,9 μM zeigt die SurA-Chimäre SS von allen Chimären die höchste Affinität. Die Affinitäten der PDI-Chimäre SS und der GroEL-Chimäre 7 sind etwas niedriger als die der SurA-Chimäre SS. Möglicherweise besitzen die b'-Domäne und die apikale Domäne eine geringere Affinität für entfaltete Proteine, da sie in PDI bzw. GroEL nicht als einzige Bindungsmodule aktiv sind. Innerhalb der PDI-Chimäre ist zusätzlich zur b'-Domäne die b-Domäne an der Substratbindung beteiligt. Für die Assemblierung eines aktiven Prolyl-1,4-Hydroxylase-Tetramers ist das a'b'-Framgmentes von PDI ausreichend, die zusätzliche Anwesenheit der b-Domäne führt jedoch zu einer erhöhten Produktion des Tetramers (Pirneskoski *et al.*, 2001). Bei GroEL sind innerhalb eines Hohlraumes der sich beim Faltungsprozess um das Substrat bildet insgesamt sieben apikale Domänen an der Faltung beteiligt.

Auch für die chimären Parvulin-Varianten konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, entfaltete Proteine zu binden. Zwar ist ihre Affinität ebenfalls geringer als die der SurA-Chimäre SS, jedoch reicht dies aus um eine 470fache Steigerung der Faltungshelferaktivität von Par2+IF im Vergleich zu Par2 zu bewirken. Eine gut ausbalancierte Affinität ist für ein effektives Faltungsenzym essentiell. Ist die Affinität zu niedrig, so kann keine gute Substraterkennung stattfinden, ist die Affinität zu hoch, würde diese mit der Weitergabe zum aktiven Zentrum interferieren.

Wie auch schon für andere Faltungsenzyme gezeigt (Maier *et al.*, 2001; Zoldák & Schmid, 2011), ist die Substratassoziation und -dissoziation der FKBP-Chimären mit entfalten Proteinen sehr dynamisch. Insbesondere die Assoziation von Proteinsubstrat und SurA-Chimäre ist ein sehr schneller, fast diffusionslimitierter Prozess. Der Komplex aus 1 μM SurA-Chimäre SS und 0,5 μM RNaseT1_{Cys}-AEDANS bildet sich innerhalb von 12 ms und hat eine Lebenszeit von nur 13 ms. Für eine optimale Faltungskatalyse, ist ein schneller

Transfer des Substrates zum aktiven Zentrum essentiell. Zudem ermöglicht die kurze Lebenszeit des Komplexes ein schnelles Entfernen fehlgefalteter Substrate von der Bindungsstelle.

Im Gegensatz zu GroEL oder DnaK handelt es sich im Fall der FKBP-Chimären um sehr dynamische Bindungssysteme, dessen Substratdissoziation unabhängig ist von Cochaperonen oder Energie. Im Fall von GroEL und DnaK ist die Bindung eines Cochaperons (GroES bzw. DnaJ) und die Hydrolyse von ATP notwendig um eine hohe Bindungsdynamik zu gewährleisten. Ist kein ATP vorhanden so besitzt der Komplex aus Chaperon und Substrat eine sehr viel längere Lebenszeit als bei Anwesenheit von ATP. Dies ist von enormer Bedeutung, da die Expression von GroEL und DnaK und damit ihre Chaperonfunktion besonders unter Stressbedingungen hochreguliert wird (Weissman *et al.*, 1994; Farr & Witt, 1999).

Die Ergebnisse mit den chimären Faltungshelfern unterstreichen, dass die Bindung an unstrukturierte Proteinsubstrate eine generische Funktion von Enzymen ist, die langsame Faltungsschritte katalysieren. Die entsprechenden Substratbindungs- oder Chaperondomänen sind zwischen Faltungsenzymen und Spezies austauschbar. Gleichzeitig ist eine gut aubalancierte Substratffinität und hohe Bindungsdynamik essentiell um einen effizienten Transfer der faltenden Kette an das Katalysezentrum zu gewährleisten und um eine permanente Inhibition der Faltungsenzyme durch geschädigte, nicht faltende Substrate zu vermeiden.

5 Publikationsliste

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits zur Publikation eingereicht.

Anne-Juliane Geitner and Franz Xaver Schmid. "Combination of the human prolyl isomerase FKBP12 with unrelated chaperone domains leads to chimeric folding enzymes with high activity".

eingereicht

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden weiterhin folgende Publikationen, die nicht Teil der Dissertation sind.

Schmidpeter, P.A., Jahreis, G., Geitner, A.-J. and Schmid F.-X. (2011). "Prolyl isomerases show low sequence specificity toward the residue following the proline", *Biochemistry*, 50 (21), 4796-803.

Jakob, R.P., Geitner, A.-J., Weininger, U., Balbach, J., Dobbek, H. and Schmid F.-X. (2012). "Structural and energetic basis of infection by the filamentous bacteriophage IKE",

eingereicht

6 Zusammenfassung

In der Zelle existieren eine Vielzahl von Faltungshelferenzymen: die molekularen Chaperone, die an aggregationssensitive Oberflächen binden und damit die Konzentration aggregationssensitiver Intermediate herabsetzen und die Peptidylprolylisomerasen und Thioldisulfidoxidoreduktasen, die geschwindigkeitsbestimmende Schritte während der Proteinfaltung katalysieren. Viele Faltungshelferenzyme kombinieren katalytische Funktion und Chaperonfunktion, die häufig innerhalb verschiedener Domänen lokalisiert sind.

Ein solches Beispiel ist die Peptidylprolylisomerase SlpA, die aus einer FKBP-Domäne und einer Chaperondomäne aufgebaut ist. Die FKBP-Domäne besitzt Prolylisomeraseaktivität, während die IF-Domäne, die in eine Schleife der FKBP-Domäne eingefügt ist, für die Chaperoneigenschaften von SlpA verantwortlich ist. Anders als viele andere Prolylisomerasen mit einer zusätzlichen Chaperondomäne besitzt SlpA eine sehr geringe Prolylisomerase- und Faltungshelferaktivität. SlpA ist jedoch ein äußerst effizientes Chaperon.

Die NMR-Struktur von SlpA und ein Vergleich mit der Struktur der homologen Prolylisomerase SlyD liefert keine Erklärung für die sehr geringe Prolylisomeraseaktivität. Die beiden Prolylisomerasen weisen große strukturelle Ähnlichkeit auf. Die Untersuchung von homologen SlpA-Proteinen aus verschiedenen anderen Organismen zeigt, dass die niedrige Prolylisomeraseaktivität und die hohe Chaperonaktivität in der Familie der SlpA-Proteine konserviert sind.

SlpA bindet mit hoher Affinität und sehr hoher Dynamik an permanent entfaltete RNaseT1. Es ähnelt damit anderen Faltungsenzymen mit zusätzlicher Chaperondomäne. Dynamische Substratbindung ist für Faltungshelferenzyme, die ohne Energieverbrauch arbeiten, essentiell. Die geringe Faltungshelferaktivität von SlpA ist also auf die geringe Prolylisomeraseaktivität der FKBP-Domäne zurückzuführen, und nicht auf eine gestörte Substratbindung oder Dynamik der IF-Domäne. Die Konstruktion einer Chimäre aus der FKBP-Domäne von SlyD und der IF-Domäne von SlpA bestätigt dies. Da in diesem chimären Protein die effiziente Prolylisomerasedomäne von SlyD vorhanden ist, ist es ein hochaktiver Faltungshelfer.

SlpA gehört zu den Zwei-Domänen-Proteinen, bei denen eine Domäne in die Schleife einer anderen Domäne inseriert ist. Die Stabilitäten der einzelnen Domänen zeigen, dass die IF-Domäne in isolierter Form gefaltet vorliegt. Die Insertion der IF-Domäne innerhalb des Gesamtproteins stabilisiert die FKBP-Domäne von SlpA. Die Faltung der IF-Domäne ist sehr schnell und läuft zum größten Teil autonom von der FKBP-Domäne ab. Bei höheren Konzentrationen an Denaturierungsmittel ist die Stabilität der IF-Domäne nicht mehr ausreichend um selbstständig zu falten. Daher wird sie von der FKBP-Domäne abhängig und beide Domänen bilden eine Faltungseinheit. Die FKBP-Domäne wird nicht nur durch die IF-Domäne stabilisiert, sondern stabilisiert auch ihrerseits die IF-Domäne. Die Analyse der Stabilität und der Faltung der SlyD-SlpA-Chimäre zeigt ebenfalls, dass die SlpA-IF-Domäne einen enormen stabilisierenden Einfluss auf die Wirtsdomäne, in dem Fall die SlyD-FKBP-Domäne, besitzt. Damit unterscheidet sich SlpA in seinem Faltungsmechanismus grundlegend von seinem Homolog SlyD. Die Ursache dafür sind die unterschiedlichen

Stabilitäten ihrer IF-Domänen. Während die instabile SlyD-IF-Domäne destabilisierend auf die SlyD-FKBP-Domäne wirkt, stabilisiert die SlpA-IF-Domäne die jeweilige Wirtsdomäne.

Um solche modular aufgebauten Faltungsenzyme genauer zu untersuchen, wurden artifizielle Proteine konstruiert, bei denen nicht-homologe Chaperondomänen, die apikale Domäne aus GroEL aus *E. coli*, die b'-Domäne der PDI aus *S. cerevisiae* und die Chaperondomäne des periplamatischen Faltungshelfers SurA aus *E. coli*, in die Prolylisomerase hFKBP12 inseriert wurden.

Die Insertion dieser Domänen in eine Schleife von hFKBP12 wirkt stark destabilisierend, da durch den Einbau die lokalen Kontakte der Schleife zerstört werden. Durch das Einführen natürlich vorkommender Linkerbereiche und ihre schrittweise Verlängerung konnte die Wirtsdomäne hFKBP12 stabilisiert werden und ihre Prolylisomeraseaktivität, die durch die Destabilisierung stark beeinträchtigt war, wiederhergestellt werden. Zudem zeigte sich, dass auch durch das Einführen einer Disulfidbrücke im Linkerbereich sowohl hFKBP12 als auch die Gastdomänen enorm stabilisiert werden konnten.

Die nicht-verwandten Chaperondomänen steigerten in allen Fällen die Faltungshelferaktivität von hFKBP12. Insbesondere der Einbau der SurA-Chaperondomäne führte zu einem effizienten Faltungsenzym, dessen Aktivität nahezu der des natürlich vorkommenden Faltungshelfers SlyD entspricht. Wie auch schon für natürlich vorkommende Faltungshelferenzyme beobachtet, verringert die Anwesenheit der Chaperondomänen die hohe Substratspezifität der Prolylisomerase gegenüber Proteinsubstraten. Demzufolge ist dies ein generischer Effekt, der unabhängig ist von der Herkunft der Chaperondomäne.

Die chimären Faltungshelferenzyme binden mit hoher Affinität an entfaltete Proteinsubstrate. Die höchste Affinität konnte für die SurA-Chimäre festgestellt werden. Zudem ist die Substratbindung für alle Chimären hoch dynamisch. Dies zeigt, dass eine hohe Substrataffinität und Bindungsdynamik für effektive Faltungsenzyme essentiell ist.

Neben seiner Chaperondomäne besitzt SurA zudem zwei Parvulindomänen, von denen nur eine als Prolylisomerase aktiv ist. Der Einbau der IF-Domäne von SlyD als Chaperondomäne in die beiden Parvulindomänen bestätigte, dass solche Domäneninsertionen häufig destabilisierend wirken. Die Faltungshelferaktivität der katalytisch aktiven Parvulindomäne konnte durch den Einbau der IF-Domäne enorm gesteigert werden. Für die katalytisch inaktive Parvulindomäne hingegen war auch nach Fusion mit der IF-Domäne keine Faltungshelferaktivität nachweisbar. Die Anwesenheit einer katalytisch aktiven Prolylisomerase ist für ein effizientes Faltungshelferenzym essentiell. Durch die Anwesenheit der IF-Domäne sind jedoch beide chimären Parvulinkonstrukte in der Lage entfaltete Protein zu binden und als Chaperon zu wirken. In *in vivo* Experimenten zeigt sich jedoch, dass die IF-Domäne, aufgrund der hohen Substratspezifität der SurA-Chaperondomäne für seine Substrate, die biologische Funktion von SurA nicht komplementieren kann.

Diese Arbeit zeigt, dass separate Bindungsstellen für generische Substratbindung und spezifische Katalyse Voraussetzung sind für die Konstruktion von aktiven, artifiziellen Faltungsenzymen aus nicht-verwandten Domänen.

7 Summary

A wide variety of folding helper enzymes is present in the cell. Molecular chaperones bind to aggregation sensitive surfaces and thus decrease the concentration of aggregation prone folding intermediates and peptidyl prolyl isomerases and thiol-disulfide oxido reductases accelerate rate limiting steps in protein folding. Binding of unfolded or partially folded substrates and the catalysis of slow folding steps are often mediated by dedicated domains of folding helper enzymes.

The prolyl isomerase SlpA from *E. coli* shows such a construction principle. It consists of a FKBP domain, that harbors the prolyl isomerase site and the IF domain that is inserted into a loop of the FKBP domain and is responsible for the chaperone properties of SlpA. SlpA is an excellent chaperone but a poor prolyl isomerase and folding helper when compared with other prolyl isomerases harboring an additional chaperone domain.

The NMR structures of SlyD and SlpA provide no obvious explanation for the poor folding helper activity of SlpA. The comparison of homologous SlpA proteins from different organisms indicates that the weak prolyl isomerase and folding activity and the good chaperone properties are a conserved feature of the SlpA family.

In the affinity and dynamics of substrate binding to its chaperone domain, SlpA resembles other folding enzymes like trigger factor and SlyD. A high affinity and dynamic binding is characteristic for folding helper enzymes working in an energy-independent manner. The combination of the active FKBP domain of SlyD and the IF domain of SlpA yielded a highly active folding catalyst. Accordingly, the low folding helper activity of SlpA originates from its very low prolyl isomerase activity and not from an impaired function of the chaperone (IF) domain.

SlpA is a two domain protein, in which the IF domain is inserted internally as a guest into a loop of the host domain FKBP. While the IF domain of SlpA is stable in isolated form, the isolated IF domain of SlyD is unfolded. As a consequence the unstable IF domain of SlyD destabilizes its FKBP domain whereas the SlpA IF domain strongly stabilizes the SlpA FKBP domain. In a chimeric form of SlyD that hosts the SlpA IF domain the stability of the FKBP domain is in fact increased as well.

Refolding of the SlpA IF domain is very fast and independent of the FKBP domain. At higher denaturant concentrations, when the IF domain loses stability, it becomes dependent on the FKBP domain and both domains form a common folding unit. The unfolding of the IF domain is decelerated by the presence of the folded FKBP domain because it stabilizes the IF domain in its folded form. In SlpA both domains stabilize each other and accordingly the folding mechanisms of SlpA and its homolog SlyD strongly differ from each other.

To improve the understanding of the mechanism of folding helper enzymes consisting of different domains, artificial enzymes were created by insertion of non-homologous domains into the prolyl isomerase hFKBP12. The apical domain of the chaperonin GroEL from *E. coli*, the chaperone domain of protein disulfide isomerase from *S. cerevisiae* and the chaperone

domain of SurA from the periplasm of *E. coli* served as unrelated chaperone domains in these experiments.

The insertion of the chaperone domains into the loop of hFKBP12 is intrinsically destabilizing in particular for the host domain because the chaperone domain interrupts the local chain connectivity between two β strands. The stability of the chimeric enzymes could be improved by introducing linker sequences occurring naturally in SlyD between the IF domain and the FKBP domain and by introducing a disulfide bond within the linker region. Besides the increase in the stabilities of hFKBP12 and the guest domains, also the prolyl isomerase activity which was impaired by the domain insertion was reestablished by the optimization of the linker.

In all chimeric proteins the folding helper activity of hFKBP12 was strongly improved. The strongest increase was observed for the SurA chimera. In its folding activity it rivalled the naturally occurring folding helper enzyme SlyD. The chaperone domains abolish the high substrate specificity of the prolyl isomerase site and thus convert hFKBP12 into a generic folding enzyme. This was generally observed irrespective of the origin of the substrate binding domain.

All three chaperone domains conveyed FKBP12 with a high affinity for unfolded proteins and dynamic binding properties. The highest substrate affinity combined with highly dynamic substrate binding and release was observed for the SurA chimera. For the function of modular folding enzymes working in an energy independent manner a well balanced substrate affinity and highly dynamic substrate binding are generally important.

Further artificial folding enzymes were created by insertion of the IF domain of SlyD into the parvulin domains of SurA. Only one of these parvulin domains is a catalytically active prolyl isomerase. In this case, the insertion of the chaperone domain led to an enormously improved folding helper activity. In case of the inactive parvulin domain the fusion with the IF domain could not improve the activity, because the presence of an active prolyl isomerase is a prerequisite for an efficient folding enzyme. The presence of the IF domain conveyed both parvulin domains with an affinity for unfolded proteins and chaperone properties but *in vivo* experiments revealed that the IF domain cannot substitute for the biological function of the chaperone domain of SurA.

The combination of prolyl isomerase domains and chaperone domains yields active chimeric folding helper enzymes. Separate sites for generic protein binding and for specific catalysis seem to be a general principle for highly active folding helpers.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abz	Aminobenzoyl
AEDANS	5-(((Acetylamino)ethyl)amino)-naphthalin-1-sulfonsäure
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CD	Circulardichroismus
Cm	Chloramphenicol
ΔC_p	Änderung der Wärmekapazität im Verlauf der Entfaltung bei konstantem Druck
d	Schichtdicke
D	Denaturierungsmittel
$[D]_M$	Mittelpunkt des Denaturierungsmittel-induzierten Gleichgewichtsübergangs
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleotide
<i>DpnI</i>	Restriktionsendonuklease I aus <i>Diplococcus pneumoniae</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
dYT	<i>double Yeast-Tryptone</i> Medium
ΔG_D	freie Enthalpie der Entfaltung
ΔH_{vH}	van't Hoff Enthalpie der Entfaltung
ϵ_λ	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
EDTA	<i>N,N,N',N'</i> -Ethyldiamintetraacetat-Dinatriumsalz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Es</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
FKBP	FK506 Bindeprotein
<i>flap</i>	Schleife aus 20 AS von hFKBP12 die Faltblattstrang $\beta 5$ und $\beta 6$ verbindet
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
G3P	Gen-3-Protein des Phagen fd
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
GroEL-Chimäre	hFKBP12 mit insertierter apikaler Domäne von GroEL
GSH	reduziertes Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly)
GSSG	oxidiertes Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) ₂ ^{SS}
ΔH_D	van't Hoff Enthalpie der Denaturierung
hFKBP12	humanes, 12 kDa großes FK506 Bindeprotein mit der Mutation C22A
hFKBP12-IF	hFKBP12 mit insertierter IF-Domäne von SlyD anstelle des <i>flap</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
IAEDANS	(5-(((2-Iodacetyl)amino)ethyl)amino)-naphthalin-1-sulfonsäure)
<i>Ib</i>	<i>Idiomarina baltica</i>
IF	<i>insertion in flap</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k	Verkürzter Linker innerhalb der FKBP-Chimären
k_{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion
k_0	Geschwindigkeitskonstante einer unkatalysierten Reaktion
k_{kat}	Geschwindigkeitskonstante einer enzymatisch katalysierten Reaktion
k_{kat}	Umsatzzahl einer enzymatischen Reaktion
k_{kat}/K_M	Spezifitätskonstante eines Enzyms
K_D	Dissoziationskonstante
K_m	Kanamycin
K_M	Michaelis-Menten-Konstante, Enzymkonzentration bei halbmaximaler Konzentration
k_{EF}	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Entfaltungsreaktion
k_{off}	mikroskopischen Rate der Dissoziation

k_{on}	mikroskopischen Rate der Assoziation
<i>Kp</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
k_{RF}	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Rückfaltungsreaktion
K_u	Gleichgewichtskonstante der Entfaltung
λ	apparente Ratenkonstante ($k_{EF} + k_{RF}$)
m	Kooperativitätsparameter bei Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltung
m_{EF}	kinetischer m -Wert der Entfaltungsreaktion ($\delta \ln k_{EF} / \delta \Delta[D]$)
m_{RF}	kinetischer m -Wert der Rückfaltungsreaktion ($\delta \ln k_{RF} / \delta \Delta[D]$)
n	Brechungsindex
N	nativer Zustand eines Proteins
$N2$	N2-Domäne des Gen-3-Proteins (AS 102-205 + Tyr-Gln-Gly-(His) ₆) mit der stabilisierenden Mutation Q129H
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OMP	<i>Outer membrane porine</i> , Porine in der äußeren Membran
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Par	Parvulin
Par1	Parvulindomäne 1 aus SurA
Par1+IF	Parvulindomäne 1 aus SurA mit insertierter IF-Domäne von SlyD
Par2	Parvulindomäne 2 aus SurA
Par2+IF	Parvulindomäne 2 aus SurA mit insertierter IF-Domäne von SlyD
Par10	Parvulin 10 aus <i>E. coli</i>
Par14	humanes Parvulin 14
Pin 1	<i>peptidylprolyl cis/trans-isomerase NIMA-interacting 1</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDI	Proteindisulfidisomerase aus <i>S. cerevisiae</i>
PDI-Chimäre	hFKBP12 mit insertierter b'-Domäne aus <i>S. cerevisiae</i> PDI
pET	<i>plasmid for expression by T7-polymerase</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>pNa</i>	<i>para</i> -Nitroanilin
PNK	Polynukleotid-Kinase
PPIase	Peptidylprolylisomerase
[Θ] _{MRW}	molare Elliptizität pro Aminosäurerest
R	allgemeine Gaskonstante
R_0	Förster-Abstand bei dem 50 % der Strahlungsenergie eines Chromophors (Donor) auf einen anderen Chromophor (Akzeptor) übertragen wird
RCM-T1	reduzierte und carboxymethylierte RnaseT1 mit den Mutationen S54G, P55N
RNaseT1	Ribonuklease T1
RNaseT1 _{Cys}	permanent entfaltete Form von RNaseT1 aus <i>Aspergillus oryzae</i> mit den Mutationen C2S, C6S, C10N, P39A, S54G, P55N und W59F
RNaseT1 _{Cys} AEDANS	AEDANS markierte RNaseT1 _{Cys}
rpm	<i>revolution per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Senp2	Sentrin-specific protease 2
<i>Sf</i>	<i>Shewanella frigidimarina</i>
SlpA	<i>SlyD like protein</i> , PPIase aus <i>E. coli</i>
SlyD	<i>sensitivity to lysis D</i> , PPIase aus <i>E. coli</i> (verkürzte Variante: AS 1-165+(His) ₆)
SS	Disulfidbrücke
SurA	<i>survival protein A</i> , periplasmatische PPIase aus <i>E. coli</i>
SurA-Chimäre	hFKBP12 mit insertierter Chaperondomäne von SurA aus <i>E. coli</i>
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i>
τ	Zeitkonstante einer Reaktion
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
T_M	Übergangsmittelpunkt thermisch induzierter Entfaltung
T4-PNK	Polynukleotidkinase des Bakteriophagen T4
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	entfalteter Zustand eines Proteins
U	Unit (Enzymmenge, die unter Standardbedingungen einen Umsatz von 1 μmol Substrat pro min erzeugt)
Ulp1	<i>Ubiquitin-like-specific protease 1</i>
ÜNK	Übernachtkultur
V_c	<i>Vibrio cholerae</i>
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
y_N, y_U	Signal des nativen bzw. des denaturierten Zustandes
$y[D]:$	gemessenes Signal
<i>Yp</i>	<i>Yersinia pestis</i>

Aminosäuren wurden mit dem üblichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

9 Literaturverzeichnis

- Agashe, V. R. and F. U. Hartl (2000). "Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding." *Semin Cell Dev Biol* **11**(1): 15-25.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, et al. (1996). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." *Science* **272**(5270): 1955-1958.
- Andreotti, A. H. (2003). "Native state proline isomerization: An intrinsic molecular switch." *Biochemistry* **42**(32): 9515-9524.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." *Science* **181**(4096): 223-230.
- Ay, J., F. Gotz, et al. (1998). "Structure and function of the Bacillus hybrid enzyme GluXyn-1: Native-like jellyroll fold preserved after insertion of autonomous globular domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(12): 6613-6618.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-871.
- Beasty, A. M., M. R. Hurler, et al. (1986). "Effects of the phenylalanine-22-leucine, glutamic acid-49-methionine, glycine-234-aspartic acid, and glycine-234-lysine mutations on the folding and stability of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*." *Biochemistry* **25**(10): 2965-2974.
- Behrens, S., R. Maier, et al. (2001). "The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions *in vivo* and has chaperone activity." *EMBO J.* **20**: 285-294.
- Bernhardt, T. G., W. D. Roof, et al. (2002). "The *Escherichia coli* FKBP-type PPIase SlyD is required for the stabilization of the E lysis protein of bacteriophage phi X174." *Mol Microbiol* **45**(1): 99-108.
- Betton, J. M., J. P. Jacob, et al. (1997). "Creating a bifunctional protein by insertion of beta-lactamase into the maltodextrin-binding protein." *Nat Biotechnol* **15**(12): 1276-1279.
- Bitto, E. and D. B. McKay (2002). "Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins." *Structure* **10**(11): 1489-1498.
- Bosch, M. L., P. L. Earl, et al. (1989). "Identification of the fusion peptide of primate immunodeficiency viruses." *Science* **244**(4905): 694-697.
- Braig, K., Z. Otwinowski, et al. (1994). "The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 angstrom." *Nature* **371**: 578-586.
- Buchner, J. (1996). "Supervising the fold: Functional principles of molecular chaperones." *FASEB J.* **10**(1): 10-19.
- Buchner, J., H. Grallert, et al. (1998). "Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein." *Methods Enzymol* **290**: 323-338.
- Byrne, L. J., A. Sidhu, et al. (2009). "Mapping of the ligand-binding site on the b' domain of human PDI: interaction with peptide ligands and the x-linker region." *Biochem J* **423**(2): 209-217.
- Carstensen, L. (2008). *Energietransfermessungen zur Analyse der Funktion und Stabilität des Faltungsenzyms SlyD aus Escherichia coli*. Diplomarbeit.
- Chazin, W. J., J. Kördel, et al. (1989). "Proline isomerism leads to multiple folded conformations of calbindin D9k: direct evidence from two-dimensional NMR spectroscopy." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2195-2198.
- Chen, B., M. Retzlaff, et al. (2011). "Cellular strategies of protein quality control." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(8): a004374.
- Cheng, H. N. and F. A. Bovey (1977). "Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycy-L-proline." *Biopolymers* **16**: 1465-1472.
- Cheng, M.-Y., F.-U. Hartl, et al. (1989). "Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria." *Nature* **337**: 620-625.
- Cheng, M. Y., F. U. Hartl, et al. (1990). "The Mitochondrial Chaperonin Hsp60 Is Required for Its Own Assembly." *Nature* **348**(6300): 455-458.
- Chiti, F. and C. M. Dobson (2006). "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease." *Annu Rev Biochem* **75**: 333-366.
- Clardy, J. (1995). "The chemistry of signal transduction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(1): 56-61.
- Cohen, F. E. and J. W. Kelly (2003). "Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases." *Nature* **426**(6968): 905-909.
- Collinet, B., M. Herve, et al. (2000). "Functionally accepted insertions of proteins within protein domains." *J Biol Chem* **275**(23): 17428-17433.
- Dalglish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." *Nature* **312**(5996): 763-767.
- Darby, N. J., R. B. Freedman, et al. (1994). "Dissecting the mechanism of protein disulfide isomerase: Catalysis of disulfide bond formation in a model peptide." *Biochemistry* **33**: 7937-7947.

- DeCenzo, M. T., S. T. Park, et al. (1996). "FK506-binding protein mutational analysis: defining the active-site residue contributions to catalysis and the stability of ligand complexes." *Protein Eng* **9**(2): 173-180.
- DeLano, W. L. (2003). The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific LLC. San Carlos, CA, USA, DeLano Scientific.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." *Nature* **381**(6584): 661-666.
- Denisov, A. Y., P. Maattanen, et al. (2009). "Solution structure of the bb' domains of human protein disulfide isomerase." *FEBS J* **276**(5): 1440-1449.
- Dill, K. A. and H. S. Chan (1996). "From Levinthal to pathways to funnels." *Nature Structural Biology* **4**: 10-19.
- Dobson, C. M. (2004). "Principles of protein folding, misfolding and aggregation." *Semin Cell Dev Biol* **15**(1): 3-16.
- Dragic, T., V. Litwin, et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." *Nature* **381**(6584): 667-673.
- Drögemüller, J. (2009). Mutationsanalyse der Prolylisomerase hFKBP12 Bachelorarbeit.
- Drögemüller, J. (2011). Verbesserung der Faltungshelferaktivität der Prolylisomerase AtFKBP13 aus *Arabidopsis thaliana* durch Einbau einer Chaperondomäne. Praktikumsprotokoll zum Forschungsmodul.
- Eckert, B., A. Martin, et al. (2005). "Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection." *Nature Structural & Molecular Biology* **12**(7): 619-623.
- Egan, D. A., T. M. Logan, et al. (1993). "Equilibrium Denaturation of Recombinant Human FK Binding Protein in Urea." *Biochemistry* **32**(8): 1920-1927.
- Eisenstark, A., C. Miller, et al. (1992). "Escherichia coli genes involved in cell survival during dormancy: role of oxidative stress." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **188**(3): 1054-1059.
- Ellis, R. J. (1994). "Molecular chaperones. Opening and closing the Anfinsen cage." *Curr Biol* **4**(7): 633-635.
- Ellis, R. J. and A. P. Minton (2003). "Cell biology: join the crowd." *Nature* **425**(6953): 27-28.
- Ellis, R. J. and S. M. van der Vies (1991). "Molecular chaperones." *Annu Rev Biochem* **60**: 321-347.
- Evans, P. A., C. M. Dobson, et al. (1987). "Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis." *Nature* **329**: 266-268.
- Fanghänel, J. and G. Fischer (2004). "Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases." *Front. Biosci.* **9**: 3453-3478.
- Farr, C. D. and S. N. Witt (1999). "ATP lowers the activation enthalpy barriers to DnaK-peptide complex formation and dissociation." *Cell Stress Chaperones* **4**(2): 77-85.
- Feldman, D. E. and J. Frydman (2000). "Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones." *Curr Opin Struct Biol* **10**(1): 26-33.
- Feltham, J. L. and L. M. Gierasch (2000). "GroEL-substrate interactions: molding the fold, or folding the mold?" *Cell* **100**(2): 193-196.
- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." *Science* **272**(5263): 872-877.
- Ferbitz, L., T. Maier, et al. (2004). "Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins." *Nature* **431**(7008): 590-596.
- Fischer, G. and T. Aumüller (2003). "Regulation of peptide bond *cis/trans* isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **148**: 105-150.
- Fischer, G., H. Bang, et al. (1984a). "[Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]." *Biomed Biochim Acta* **43**(10): 1101-1111.
- Fischer, G., H. Bang, et al. (1984b). "Nachweis einer Enzymkatalyse für die *cis-trans*-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden." *Biomed.Biochim.Acta* **43**: 1101-1111.
- Fischer, G., B. Wittmann-Liebold, et al. (1989). "Cyclophilin and peptidyl-prolyl-*cis/trans*-isomerase are probably identical proteins." *Nature* **337**: 476-478.
- Freedman, R. B., T. R. Hirst, et al. (1994). "Protein disulfide isomerase: building bridges in protein folding." *Trends in Biochemical Sciences* **19**: 331-336.
- Galat, A. and S. M. Metcalfe (1995). "Peptidylproline *cis/trans* isomerases." *Prog.Biophys.molec.Biol.* **63**: 67-118.
- Gallagher, W. R. (1987). "Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus." *Cell* **50**(3): 327-328.
- Garcia-Echeverria, C., J. L. Kofron, et al. (1992). "Continuous Fluorimetric Direct (Uncoupled) Assay for Peptidyl Prolyl *Cis-Trans*-Isomerases." *J.Am.Chem.Soc.* **114**(7): 2758-2759.
- Garcia-Echeverria, C., J. L. Kofron, et al. (1993). "A Continuous Spectrophotometric Direct Assay for Peptidyl Prolyl *Cis-Trans*-Isomerases." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **191**(1): 70-75.
- Golbik, R., R. Zahn, et al. (1998). "Thermodynamic stability and folding of GroEL minichaperones." *J Mol Biol* **276**(2): 505-515.

- Grathwohl, C. and K. Wüthrich (1981). "NMR studies of the rates of proline cis-trans isomerization in oligopeptides." *Biopolymers* **20**: 2623-2633.
- Gruber, C. W., M. Cemazar, et al. (2006). "Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding." *Trends Biochem Sci* **31**(8): 455-464.
- Gueux, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." *Electrophoresis* **18**(15): 2714-2723.
- Gupta, R., S. K. Lakshminpathy, et al. (2010). "Trigger factor lacking the PPIase domain can enhance the folding of eukaryotic multi-domain proteins in *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **584**(16): 3620-3624.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. ." *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hani, J., G. Stumpf, et al. (1995). "PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases." *FEBS Lett.* **365**(2-3): 198-202.
- Harding, M. W., A. Galat, et al. (1989). "A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase." *Nature* **341**: 758-760.
- Harrison, R. K. and R. L. Stein (1990). "Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes." *Biochemistry* **29**: 3813-3816.
- Hartl, F. U., A. Bracher, et al. (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." *Nature* **475**(7356): 324-332.
- Heinemann, U. and W. Saenger (1982). "Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex: an x-ray structure." *Nature* **299**: 27-31.
- Hesterkamp, T. and B. Bukau (1998). "Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in *E.coli*." *EMBO J* **17**(16): 4818-4828.
- Höll-Neugebauer, B., R. Rudolph, et al. (1991). "Reconstitution of a Heat Shock Effect In vitro - Influence of GroE on the Thermal Aggregation of alpha-Glucosidase from Yeast." *Biochemistry* **30**(50): 11609-11614.
- Holliger, P., L. Riechmann, et al. (1999). "Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Angström: evidence for conformational lability." *J Mol Biol* **288**(4): 649-657.
- Hottenrott, S., T. Schumann, et al. (1997). "The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase." *Journal of Biological Chemistry* **272**(25): 15697-15701.
- Hunter, T. (1998). "Prolyl isomerase and nuclear function." *Cell* **92**(2): 141-143.
- Jabs, A., M. S. Weiss, et al. (1999). "Non-proline cis peptide bonds in proteins." *Journal of Molecular Biology* **286**(1): 291-304.
- Jakob, R. P. and F. X. Schmid (2008). "Energetic coupling between native-state prolyl isomerization and conformational protein folding." *J Mol Biol* **377**(5): 1560-1575.
- Jakob, R. P. and F. X. Schmid (2009). "Molecular determinants of a native-state prolyl isomerization." *J Mol Biol* **387**(4): 1017-1031.
- Jakob, R. P., G. Zoldák, et al. (2009). "Chaperone domains convert prolyl isomerases into generic catalysts of protein folding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48): 20282-20287.
- Janowski, B., S. Wöllner, et al. (1997). "A protease-free assay for peptidyl-prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates." *Anal. Biochem.* **252**: 293-307.
- Kallen, J., C. Spitzfaden, et al. (1991). "Structure of Human Cyclophilin and Its Binding Site for Cyclosporin-A Determined by X-Ray Crystallography and NMR Spectroscopy." *Nature* **353**(6341): 276-279.
- Kallen, J. and M. D. Walkinshaw (1992). "The X-Ray Structure of a Tetrapeptide Bound to the Active Site of Human Cyclophilin-A." *FEBS Lett.* **300**(3): 286-290.
- Ke, H. M. (1992). "Similarities and Differences Between Human Cyclophilin-A and Other beta-Barrel Structures - Structural Refinement at 1.63 Angstrom Resolution." *Journal of Molecular Biology* **228**(2): 539-550.
- Kiefhaber, T. (1995). "Protein folding kinetics." *Methods Mol. Biol.* **40**: 313-341.
- Kiefhaber, T., H. P. Grunert, et al. (1990a). "Replacement of a cis proline simplifies the mechanism of ribonuclease T1 folding." *Biochemistry* **29**: 6475-6480.
- Kiefhaber, T., H. H. Kohler, et al. (1992a). "Kinetic Coupling Between Protein Folding and Prolyl Isomerization .1. Theoretical Models." *Journal of Molecular Biology* **224**(1): 217-229.
- Kiefhaber, T., R. Quaas, et al. (1990b). "Folding of Ribonuclease T₁. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization." *Biochemistry* **29**: 3053-3061.
- Kiefhaber, T., R. Quaas, et al. (1990c). "Folding of ribonuclease T1. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions." *Biochemistry* **29**: 3061-3070.
- Kiefhaber, T., F. X. Schmid, et al. (1992b). "Structure of a Rapidly Formed Intermediate in Ribonuclease- T1 Folding." *Protein Science* **1**(9): 1162-1172.
- Klappa, P., L. W. Ruddock, et al. (1998). "The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins." *EMBO J* **17**(4): 927-935.

- Knappe, T. A., B. Eckert, et al. (2007). "Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding." *J Mol Biol* **368**(5): 1458-1468.
- Kofron, J. L., P. Kuzmic, et al. (1991). "Determination of Kinetic Constants for Peptidyl Prolyl Cis- Trans Isomerases by an Improved Spectrophotometric Assay." *Biochemistry* **30**(25): 6127-6134.
- Kramer, G., H. Patzelt, et al. (2004). "Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **279**(14): 14165-14170.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York, Kluwer/Plenum Publishers.
- Landry, S. J. and L. M. Gierasch (1994). "Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to in vivo protein folding." *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struc.* **23**: 645-669.
- Lang, K., F. X. Schmid, et al. (1987). "Catalysis of protein folding by prolyl isomerase." *Nature* **329**: 268-270.
- Lazar, S. W. and R. Kolter (1996). "SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins." *J.Bacteriol.* **178**(6): 1770-1773.
- Levinthal, C. J. (1968). "Are there pathways for protein folding?" *J. Chim. Phys.* **65**: 44-45.
- Lorenz, S. H. (2010). *Von der Faltung zur Funktion: Steuerung des Infektionsmechanismus filamentöser Phagen durch Faltungsprozesse und Beschleunigung oxidativer Faltung durch Thioloxygenasen* Dissertation.
- Löw, C., P. Neumann, et al. (2010). "Crystal structure determination and functional characterization of the metallochaperone SlyD from *Thermus thermophilus*." *J Mol Biol* **398**(3): 375-390.
- Lu, K. P., S. D. Hanes, et al. (1996). "A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis." *Nature* **380**(6574): 544-547.
- Lu, P. J., X. Z. Zhou, et al. (1999b). "Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules [see comments]." *Science* **283**(5406): 1325-1328.
- Lutz, R. and H. Bujard (1997). "Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements." *Nucleic Acids Res* **25**(6): 1203-1210.
- Macarthur, M. W. and J. M. Thornton (1991). "Influence of proline residues on protein conformation." *Journal of Molecular Biology* **218**: 397-412.
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, et al. (1986). "The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain." *Cell* **47**(3): 333-348.
- Maier, R., C. Scholz, et al. (2001). "Dynamic association of trigger factor with protein substrates." *Journal of Molecular Biology* **314**(5): 1181-1190.
- Mallis, R. J., K. N. Brazin, et al. (2002). "Structural characterization of a proline-driven conformational switch within the Itk SH2 domain." *Nat Struct Biol* **9**(12): 900-905.
- Martensson, L. G., M. Karlsson, et al. (2002). "Dramatic stabilization of the native state of human carbonic anhydrase II by an engineered disulfide bond." *Biochemistry* **41**(52): 15867-15875.
- Maruyama, T., R. Suzuki, et al. (2004). "Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases) update 2004." *Front Biosci* **9**: 1680-1720.
- Matern, Y., B. Barion, et al. (2010). "PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in *Escherichia coli*." *BMC Microbiol* **10**: 251.
- Matsumura, M., W. J. Becktel, et al. (1989). "Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(17): 6562-6566.
- Mayr, L. M., C. Odefey, et al. (1996). "Kinetic analysis of the unfolding and refolding of ribonuclease T1 by a stopped-flow double-mixing technique." *Biochemistry* **35**: 5550-5561.
- McDougal, J. S., M. S. Kennedy, et al. (1986). "Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule." *Science* **231**(4736): 382-385.
- Michnick, S. W., M. K. Rosen, et al. (1991). "Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin." *Science* **252**: 836-842.
- Mikol, V., J. Kallen, et al. (1994). "X-ray structure of a cyclophilin B cyclosporin complex: Comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain." *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**(11): 5183-5186.
- Missiakas, D., J. M. Betton, et al. (1996). "New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH." *Mol.Microbiol.* **21**(4): 871-884.
- Moore, J. M., D. A. Peattie, et al. (1991). "Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506." *Nature* **351**: 248-250.
- Muchowski, P. J. (2002). "Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones?" *Neuron* **35**(1): 9-12.
- Mücke, M. and F. X. Schmid (1992). "Enzymatic catalysis of prolyl isomerization in an unfolding protein." *Biochemistry* **31**: 7848-7854.
- Mücke, M. and F. X. Schmid (1994). "Folding mechanism of ribonuclease T1 in the absence of the disulfide bonds." *Biochemistry* **33**(48): 14608-14619.
- Myers, J. K. (1988). "Expression of ribonuclease T1 in *Escherichia coli* and rapid purification of the enzyme." *Nucleosides & Nucleotides* **7**: 619-623.
- Myers, J. K., C. N. Pace, et al. (1995). "Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding." *Protein Science* **4**: 2138-2148.

- Nguyen, V. D., K. Wallis, et al. (2008). "Alternative conformations of the x region of human protein disulphide-isomerase modulate exposure of the substrate binding b' domain." *J Mol Biol* **383**(5): 1144-1155.
- Oobatake, M., S. Takahashi, et al. (1979). "Conformational stability of ribonuclease T1. I. Thermal denaturation and effects of salts." *Journal of Biochemistry* **86**: 55-63.
- Pace, C. N. (1986). "Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves." *Methods in Enzymology* **131**: 266-280.
- Pace, C. N. and G. R. Grimsley (1988). "Ribonuclease T1 is stabilized by cation and anion binding." *Biochemistry* **27**(9): 3242-3246.
- Pace, C. N., G. R. Grimsley, et al. (1988). "Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds." *Journal of Biological Chemistry* **263**: 11820-11825.
- Pal, D. and P. Chakrabarti (1999). "Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations." *J Mol Biol* **294**(1): 271-288.
- Park, S. T., R. A. Aldape, et al. (1992). "PPIase catalysis by human FK506-binding protein proceeds through a conformational twist mechanism." *J Biol Chem* **267**(5): 3316-3324.
- Pecher, P. and U. Arnold (2009). "The effect of additional disulfide bonds on the stability and folding of ribonuclease A." *Biophys Chem* **141**(1): 21-28.
- Pirneskoski, A., P. Klappa, et al. (2004). "Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase." *J Biol Chem* **279**(11): 10374-10381.
- Pirneskoski, A., L. W. Ruddock, et al. (2001). "Domains b' and a' of protein disulfide isomerase fulfill the minimum requirement for function as a subunit of prolyl 4-hydroxylase. The N-terminal domains a and b enhances this function and can be substituted in part by those of ERp57." *J Biol Chem* **276**(14): 11287-11293.
- Popp, M. (2011). Stabilität und Funktion von SlyD-Varianten aus verschiedenen Mikroorganismen.
- Privalov, P. L. (1993). Physical basis of the stability of the folded conformations of Proteins. . In *Protein folding* T. E. Creighton. New York, Freeman.
- Rahfeld, J. U., K. P. Rucknagel, et al. (1994a). "Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases - Amino acid sequence and recombinant production of parvulin." *FEBS Letters* **352**: 180-184.
- Rahfeld, J. U., A. Schierhorn, et al. (1994b). "A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from Escherichia coli." *FEBS Lett* **343**(1): 65-69.
- Ramachandran, G. N. and A. K. Mitra (1976). "An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides." *J. Mol. Biol.* **107**: 85-92.
- Reimer, U., G. Scherer, et al. (1998). "Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation." *J Mol Biol* **279**(2): 449-460.
- Rizzitello, A. E., J. R. Harper, et al. (2001). "Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of Escherichia coli." *J Bacteriol* **183**(23): 6794-6800.
- Roof, W. D., H. Q. Fang, et al. (1997). "Mutational analysis of slyD, an Escherichia coli gene encoding a protein of the FKBP immunophilin family." *Mol Microbiol* **25**(6): 1031-1046.
- Roof, W. D., S. M. Horne, et al. (1994). "slyD, a host gene required for phi X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerases." *J Biol Chem* **269**(4): 2902-2910.
- Rouviere, P. E. and C. A. Gross (1996). "SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins." *Gene Develop.* **10**(24): 3170-3182.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). *Molecular Cloning - A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Sanders, S. L., K. M. Whitfield, et al. (1992). "Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER." *Cell* **69**(2): 353-365.
- Santoro, M. M. and D. W. Bolen (1988). "Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl α -chymotrypsin using different denaturants." *Biochemistry* **27**: 8063-8068.
- Schägger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Analytical Biochemistry* **166**: 368-379.
- Scherer, G., M. L. Kramer, et al. (1998). "Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds." *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 5568-5574.
- Schmid, F. X. (2002). "Prolyl isomerases." *Adv. Protein Chem.* **59**: 243-282.
- Schmidpeter, P. A., G. Jahreis, et al. (2011). "Prolyl isomerases show low sequence specificity toward the residue following the proline." *Biochemistry* **50**(21): 4796-4803.
- Scholz, C., B. Eckert, et al. (2006). "SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities." *Biochemistry* **45**(1): 20-33.
- Scholz, C., M. Mücke, et al. (1998). "Recognition of protein substrates by the prolyl isomerase trigger factor is independent of proline residues." *J. Mol. Biol.* **277**: 723-732.
- Scholz, C., J. Rahfeld, et al. (1997a). "Catalysis of protein folding by parvulin." *J. Mol. Biol.* **273**: 752-762.

- Scholz, C., P. Schaarschmidt, et al. (2005). "Functional solubilization of aggregation-prone HIV envelope proteins by covalent fusion with chaperone modules." *J Mol Biol* **345**(5): 1229-1241.
- Scholz, C., G. Stoller, et al. (1997b). "Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding." *EMBO Journal* **16**: 54-58.
- Scholz, C., L. Thirault, et al. (2008). "Chaperone-aided in vitro renaturation of an engineered E1 envelope protein for detection of anti-Rubella virus IgG antibodies." *Biochemistry* **47**(14): 4276-4287.
- Schönbrunner, E. R., S. Mayer, et al. (1991). "Catalysis of Protein Folding by Cyclophilins from Different Species." *Journal of Biological Chemistry* **266**(6): 3630-3635.
- Schreiber, S. L. (1991). "Chemistry and Biology of the Immunophilins and Their Immunosuppressive Ligands." *Science* **251**(4991): 283-287.
- Sekerina, E., J. U. Rahfeld, et al. (2000). "NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein [In Process Citation]." *J Mol Biol* **301**(4): 1021-1035.
- Stein, R. L. (1993a). "Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis- trans isomerization." *Advances in Protein Chemistry* **44**: 1-24.
- Stein, R. L. (1993b). "Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis-trans isomerization." *Adv Protein Chem* **44**: 1-24.
- Stewart, D. E., A. Sarkar, et al. (1990). "Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures." *Journal of Molecular Biology* **214**: 253-260.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, et al. (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods in Enzymology* **185**: 60-89.
- Takahashi, N., T. Hayano, et al. (1989). "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin." *Nature* **337**: 473-475.
- Tanford, C. (1968). "Protein denaturation, part A." *Advances in Protein Chemistry* **23**: 121-217.
- Thornton, J. M. (1981). "Disulphide bridges in globular proteins." *J Mol Biol* **151**(2): 261-287.
- Tian, G., S. Xiang, et al. (2006). "The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites." *Cell* **124**(1): 61-73.
- Tormo, A., M. Almiron, et al. (1990). "surA, an Escherichia coli gene essential for survival in stationary phase." *J Bacteriol* **172**(8): 4339-4347.
- Tradler, T., G. Stoller, et al. (1997). "Comparative mutational analysis of peptidyl prolyl cis/trans isomerases: active sites of Escherichia coli trigger factor and human FKBP12." *FEBS Lett* **407**(2): 184-190.
- Van Duyne, G. D., R. F. Standaert, et al. (1993). "Atomic Structures of the Human Immunophilin FKBP-12 Complexes with FK506 and Rapamycin." *Journal of Molecular Biology* **229**(1): 105-124.
- Varga, E. (2011). Effiziente Faltungsenzyme aus nicht verwandten Domänen: Optimierung bestehender und Konstruktion neuer chimärer Prolylisomerasen Master Thesis.
- Walter, S., G. H. Lorimer, et al. (1996). "A thermodynamic coupling mechanism for GroEL-mediated unfolding." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(18): 9425-9430.
- Webb, H. M., L. W. Ruddock, et al. (2001). "Interaction of the periplasmic peptidylprolyl cis-trans isomerase SurA with model peptides. The N-terminal region of SurA is essential and sufficient for peptide binding." *J Biol Chem* **276**(49): 45622-45627.
- Wehmer, M. (2010). Verbesserung der Faltungshelferfunktion der Prolylisomerasedomäne2 von SurA durch den Einbau einer Chaperondomäne.
- Weininger, U., C. Haupt, et al. (2009). "NMR solution structure of SlyD from Escherichia coli: spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function." *J Mol Biol* **387**(2): 295-305.
- Weininger, U., R. P. Jakob, et al. (2010). "The prolyl isomerase domain of PpiD from Escherichia coli shows a parvulin fold but is devoid of catalytic activity." *Protein Sci* **19**(1): 6-18.
- Weissman, J. S., Y. Kashi, et al. (1994). "GroEL-mediated protein folding proceeds by multiple rounds of binding and release of nonnative forms." *Cell* **78**: 693-702.
- Weissman, J. S., H. S. Rye, et al. (1996). "Characterization of the active intermediate of a GroEL- GroES-mediated protein folding reaction." *Cell* **84**(3): 481-490.
- Wickner, S., M. R. Maurizi, et al. (1999). "Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins." *Science* **286**(5446): 1888-1893.
- Wolynes, P. G. (1997). "Folding funnels and energy landscapes of larger proteins within the capillarity approximation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12): 6170-6175.
- Wulf, G., G. Finn, et al. (2005). "Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme?" *Nat Cell Biol* **7**(5): 435-441.
- Wülfing, C., J. Lombardero, et al. (1994). "An Escherichia coli protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif." *J Biol Chem* **269**(4): 2895-2901.
- Wülfing, C. and A. Plückthun (1994). "Protein folding in the periplasm of Escherichia coli." *Molecular Microbiology* **12**: 685-692.
- Xu, Z., A. L. Horwich, et al. (1997). "The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex." *Nature* **388**(6644): 741-750.

- Yaffe, M. B., M. Schutkowski, et al. (1997). "Sequence-Specific and Phosphorylation-Dependent Proline Isomerization - a Potential Mitotic Regulatory Mechanism." *Science* **278**(5345): 1957-1960.
- Zahn, R., A. M. Buckle, et al. (1996). "Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15024-15029.
- Zarnt, T., T. Tradler, et al. (1997). "Modular structure of the trigger factor required for high activity in protein folding." *J. Mol. Biol.* **271**: 827-837.
- Zhang, J. W., M. R. Leach, et al. (2007). "The peptidyl-prolyl isomerase activity of SlyD is not required for maturation of *Escherichia coli* hydrogenase." *J Bacteriol* **189**(21): 7942-7944.
- Zoldák, G., T. Aumuller, et al. (2009a). "A library of fluorescent peptides for exploring the substrate specificities of prolyl isomerases." *Biochemistry* **48**(43): 10423-10436.
- Zoldák, G., L. Carstensen, et al. (2009b). "Consequences of domain insertion on the stability and folding mechanism of a protein." *J Mol Biol* **386**(4): 1138-1152.
- Zoldák, G. and F. X. Schmid (2011). "Cooperation of the prolyl isomerase and chaperone activities of the protein folding catalyst SlyD." *J Mol Biol* **406**(1): 176-194.

10 Anhang

Die in dieser Arbeit zur Klonierung und Mutagenese von verschiedenen SlpA-Varianten, hFKBP12, chimären Varianten aus hFKBP12 und den Chaperon-Domänen von SlyD, yPDI, GroEL und SurA und RNaseT1_{Cys} verwendeten Oligodesoxyribonukleotide sind in Tabelle 10-1 aufgeführt.

Tabelle 10-1: Auflistung aller verwendeter Oligonukleotide.

Name	Basensequenz in 5'→3'Richtung	Verwendung
Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung und Mutagenese von SlpA-Varianten		
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Kolonie-PCR, Sequenzierung
T7-Terminator	GTTATGCTAGTTATTGCTCA	Kolonie-PCR, Sequenzierung
SlpA_N_NdeI_+	GGGAATTCCATATGTCTGAATCTGT ACAG AGCAATAGCGCC	Klonierung SlpAwt, NdeI-Schnittstelle
SlpA_CHisBamHI_-	CGCGGATCCTTAGTGATGGTGATGG TGATGCTCCAGTGCCGGATCGATTT CC	Klonierung SlpAwt, BamHI-Schnittstelle
SlpA_deltaIF_BE_+	ATC ATC CCG CCA CAT GCG ACC GTT CAT TTT GAT ATT GAA G	BluntEnd, Deletion der IF- Domäne in SlpA
SlpA_deltaIF_BE_-	GCC CGG ATG GCC GGT CGC GCC AAA CGC CGC ATC TGG CTC C	BluntEnd, Deletion der IF- Domäne in SlpA
IF_N_NdeI_+	GGG AATTC CAT ATG GTG CCG TCA CCG GAC CTG ATT CAG	Klonierung IF-Domäne von SlpA, NdeI-Schnittstelle
IF_CHis_BamHI_-	CGC GGA TCC TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG CTC CAA GGT CTG CCC GGC CAG CGG	Klonierung IF-Domäne von SlpA, BamHI-Schnittstelle
SlpA_L48W_+	TGG GAG CAA CAC CTG TTG GGG GCT G	Mutation L48W in SlpA
SlpA_L48W_-	CCC TTC AGA AAG AGA AGC ATC	Mutation L48W in SlpA
SlpA_Y81W_+	TGG TTC TCC CGC CGT GAA TTT ATG G	Mutation Y81W in SlpA
SlpA_Y81W_-	CTG AAT CAG GTC CGG TGA CGG	Mutation Y81W in SlpA
SlpA_M104W_+	TGG GAT GGC AGT GAG ATG CCT GGC	Mutation M104W in SlpA
SlpA_M104W_-	TGC GGT AAA AAG CAT GAT TGC	Mutation M104W in SlpA
SlpA_D119W_+	TGG TCC ATT ACC GTT GAT TTC AAC C	Mutation D119W in SlpA
SlpA_D119W_-	GCC GTT AAT TTC GCG GAT CAC	Mutation D119W in SlpA
Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung der chimären Konstrukte		
IF_HgaI_+	GACGC NNNNN GTCAG GTG CCG TCA CCG GAC CTG ATT	Insertion der IF-Domäne von SlpA in SlyD
IF_AlwNI_-	CAG NNN CTG GGT CTG CCC GGC CAG CGG ATG	Insertion der IF-Domäne von SlpA in SlyD
IF1_IFraus_KpnI_-	CGG GGT ACC TCC ATA CGC GTA GTC CGG AGA AAT	Aus hFKBP12-IF IF-Domäne rausklonieren
IF1_IFraus_SpeI_+	GG ACT AGT CTG GTG TTT GAT GTA GAA CTA TTG	Aus hFKBP12-IF IF-Domäne rausklonieren
apDo191NTGGSE_KpnI_+	CGG GGT ACC GGT GGT AGT GAA GAA GGT ATG CAG TTC GAC CGT GGC TAC	apikale Domäne AS 191-345 in hFKBP12 reinklonieren
apDo345CT1L_SpeI_-	GGA CTA GTT TCA CTA CCA CCA CGG CCC TGG ATT GCA GCT TCT TC	apikale Domäne AS 191-345 in hFKBP12 reinklonieren

	ACC	
apDoiso191NTHis_NdeI_+	GGAATTC CATATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GGT AGT AGT GGT GAA GGT ATG CAG TTC GAC CGT GGC TAC CTG	Klonierung der isolierten apikale Domäne, NdeI-Schnittstelle
apDoiso345CT_BamHI_-	CGC GGA TCC CTA ACG GCC CTG GAT TGC AGC TTC TTC ACC	Klonierung der isolierten apikale Domäne, BamHI-Schnittstelle
SlyDflap_nachAYG_+	GAA AAC CTG GAA GGT ATG CAG TTC GAC CGT GGC TAC	Einführen des linkers von SlyD in die GroEL-Chimäre
SlyDflap_nachAYG_-	GTC GTA CTG TCC ATA CGC GTA GTC CGG AGA AAT GGT	Einführen des linkers von SlyD in die GroEL-Chimäre
SlyDflap_vorLKF_+	GGTCAGAACCTG GTG TTT GAT GTA GAA CTA TTG	Einführen des linkers von SlyD in die GroEL-Chimäre
SlyDflap_vorLKF_-	GGC CAG CAT ACG GCC CTG GAT TGC AGC TTC TTC ACC	Einführen des linkers von SlyD in die GroEL-Chimäre
Var4_Hisraus_+	TGA GAT CCG GCT GCT AAC AAA GCC	Entfernen des His-tags
Var4_Hisraus_-	CTC GAG TTT CAA TAG TTC TAC ATC	Entfernen des His-tags
Var5_G135_+	GGT AAC CAC ATG CTG GCC GGT CAG AAC CTG GTG	Verlängerung des linkers der GroEL-Chimäre
Var5/6/7LVF loop_-	ACG GCC CTG GAT TGC AGC TTC TTC	Verlängerung des linkers der GroEL-Chimäre
Var6_Q91_+	GTG CAA GAA GGT ATG CAG TTC GAC CGT GGC	Verlängerung des linkers der GroEL-Chimäre
Var6/7_AYGloop_-	CAG GTT TTC GTC GTA CTG TCC ATA	Verlängerung des linkers der GroEL-Chimäre
Var6_V133_+	GTT GAT GGT AAC CAC ATG CTG GCC GGT CAG AAC CTG GTG TTT	Verlängerung des linkers der GroEL-Chimäre
Var7_R92_+	GTG CAA CGT GAA GGT ATG CAG TTC GAC CGT GGC	Verlängerung des linkers der GroEL-Chimäre
Var7_V134_+	GTG GTT GAT GGT AAC CAC ATG CTG GCC GGT CAG AAC CTG GTG TTT	Verlängerung des linkers der GroEL-Chimäre
V7AYG_SacII_-	TCC CCG CGG ACG TTG CAC CAG GTT TTC GTC GTA	Klonierung der SurA-Chimäre, SacII-Schnittstelle
V7LVF_SpeI_+	GG ACT AGT GTG GTT GAT GGT AAC CAC ATG CTG	Klonierung der SurA-Chimäre, SpeI-Schnittstelle
SurACD1_StuI_-	AAG GCC TCA GCT CAG TGC TGG CGT CGT TTT G	Klonierung der SurA-Chimäre, StuI-Schnittstelle
SurACD2_StuI_+	A AGG CCT CGT AAT GTC GAT AAA ACC GAC GCT	Klonierung der SurA-Chimäre, StuI-Schnittstelle
SurACD_SacII_+	TCC CCGCGG GTA GTC GAT AAA GTC GCA GCC GTC	Klonierung der SurA-Chimäre, SacII-Schnittstelle
SurACD_SpeI_-	GGA CTA GTG TTG CTC AGG ATT TTA ACG TAG GC	Klonierung der SurA-Chimäre, SpeI-Schnittstelle
SurA_NdeI_+	GGAATTC CAT ATG GCC CCC CAG GTA GTC GAT AAA GTC	Klonierung SurAwt, NdeI-Schnittstelle
SurA_XhoICtermHis_-	CCG CTC GAG TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTT GCT CAG GAT TTT AAC GTA GGC	Klonierung SurAwt, BamHI-Schnittstelle
FKBP12Nterm_b'_-	GAT TTC ACC AAA GTA GGG CAA GGC ACC GCC ACG TTG CAC CAG GTT TTC GTC GTA	Klonierung der PDI-Chimäre, über SOE
yPDib'_+	TAC GAC GAA AAC CTG GTG CAA CGT GGC GGT GCC TTG CCC TAC TTT GGT GAA ATC	Klonierung der PDI-Chimäre, über SOE
yPDib'_-	CAG CAT GTG GTT ACC ATC AAC CAC ACC GCC GGA GGC ATC ACC TTT CAA GAA GTC	Klonierung der PDI-Chimäre, über SOE

FKBP12Cterm_b' _+	GAC TTC TTG AAA GGT GAT GCC TCC GGC GGT GTG GTT GAT GGT AAC CAC ATG CTG	Klonierung der PDI-Chimäre, über SOE
b'_BsaI_+	AT GGT CTCT TGGT ATG GCC TTG CCC TAC TTT GGT GAA ATC	Klonierung der isolierten b'- Domäne, BsaI-Schnittstelle
b'_BamHI_-	CGG GAT CCC TAG GAG GCA TCA CCT TTC AAG AAG TC	Klonierung der isolierten b'- Domäne, BsaI-Schnittstelle
ChimSSF1_-	ACG TTG CAC CAG GTT TTC GTC GTA GCA TCC ATA CGC GTA GTC CGG AGA AAT	Einführen 1.Disulfidbrücke in die Chimären mittels SOE
ChimSSF2_+	ATT TCT CCG GAC TAC GCG TAT GGA TGC TAC GAC GAA AAC CTG GTG CAA CGT	Einführen 1.Disulfidbrücke in die Chimären mittels SOE
ChimSSF2_-	TTC TAC ATC AAA CAC CAG GTT CTG ACA GGC CAG CAT GTG GTT ACC ATC AAC	Einführen 1.Disulfidbrücke in die Chimären mittels SOE
ChimSSF3_+	GTT GAT GGT AAC CAC ATG CTG GCC TGT CAG AAC CTG GTG TTT GAT GTA GAA	Einführen 1.Disulfidbrücke in die Chimären mittels SOE
SurAChimLK_F1_-	GAC GGC TGC GAC TTT ATC GAC TAC GTT TTC GTC GTA GCA TCC ATA CGC	Verkürzung des Linkers in der SurA-Chimäre mittels SOE
SurAChimLK_F2_+	GCG TAT GGA TGC TAC GAC GAA AAC GTA GTC GAT AAA GTC GCA GCC GTC	Verkürzung des Linkers in der SurA-Chimäre mittels SOE
SurAChimLK_F2_-	GTT CTG ACA GGC CAG CAT GTG GTT GTT GCT CAG GAT TTT AAC GTA GGC	Verkürzung des Linkers in der SurA-Chimäre mittels SOE
SurAChimLK_F3_+	GCC TAC GTT AAA ATC CTG AGC AAC AAC CAC ATG CTG GCC TGT CAG AAC	Verkürzung des Linkers in der SurA-Chimäre mittels SOE
bChimLK_F1_-	GAT TTC ACC AAA GTA GGG CAA GGC GTT TTC GTC GTA GCA TCC ATA CGC	Verkürzung des Linkers in der PDI-Chimäre mittels SOE
bChimLK_F2_+	GCG TAT GGA TGC TAC GAC GAA AAC GCC TTG CCC TAC TTT GGT GAA ATC	Verkürzung des Linkers in der PDI-Chimäre mittels SOE
bChimLK_F2_-	GTT CTG ACA GGC CAG CAT GTG GTT GGA GGC ATC ACC TTT CAA GAA GTC	Verkürzung des Linkers in der PDI-Chimäre mittels SOE
bChimLK_F3_+	GAC TTC TTG AAA GGT GAT GCC TCC AAC CAC ATG CTG GCC TGT CAG AAC	Verkürzung des Linkers in der PDI-Chimäre mittels SOE
SurA_PPIase1_BsaI_+	AT GGT CTCT TGGT ATG ACT GAG CTG AAC CTG AGC CAC ATC	Klonierung der PPIase1-Domäne von SurA
SurA_PPIase1_BamHI_-	CGG GAT CCT TAG CTT TCG CCG CGC AGG TCG TTA AC	Klonierung der PPIase1-Domäne von SurA
SurA_PPIase2_BsaI_+	AT GGT CTCT TGGT ATG ATC TCG GTG ACC GAA GTT CAT GCT	Klonierung der PPIase2-Domäne von SurA
SurA_PPIase2_XhoI_-	CCG CTC GAG TTA TTT ATC GAC ATT ACG GGT ATC CAG	Klonierung der PPIase2-Domäne von SurA
PPI2_IF_F1_-	TTG CAC CAG GTT TTC GTC GTA CTG TGA ATG TTT CAG CAG AAT ATG GCG AGC ATG	Insertion der IF-Domäne von SlyD in die PPIase2-Domäne
PPI2_IF_F2_+	CAT GCT CGC CAT ATT CTG CTG AAA CAT TCA CAG TAC GAC GAA AAC CTG GTG CAA	Insertion der IF-Domäne von SlyD in die PPIase2-Domäne
PPI2_IF_F2_-	TTT CAC ACG GGC CTG TTC GTC AGT ACG AGT CTG ACC GGC CAG CAT GTG GTT ACC	Insertion der IF-Domäne von SlyD in die PPIase2-Domäne
PPI2_IF_F3_+	GGT AAC CAC ATG CTG GCC GGT CAG ACT CGT ACT GAC	Insertion der IF-Domäne von SlyD in die PPIase2-Domäne

	GAA CAG GCC CGT GTG AAA	
PPI1_IF_F1_-	TTG CAC CAG GTT TTC GTC GTA CTG TGA ATG TTT GAT CAG GAT GTG GCT CAG GTT	Insertion der IF-Domäne von SlyD in die PPIase1-Domäne
PPI1_IF_F2_+	AAC CTG AGC CAC ATC CTG ATC AAA CAT TCA CAG TAC GAC GAA AAC CTG GTG CAA	Insertion der IF-Domäne von SlyD in die PPIase1-Domäne
PPI1_IF_F2_-	CGC TTC GTT CAC CTG ATC AGA GGT CTG ACC GGC CAG CAT GTG GTT ACC	Insertion der IF-Domäne von SlyD in die PPIase1-Domäne
PPI1_IF_F3_+	GGT AAC CAC ATG CTG GCC GGT CAG ACC TCT GAT CAG GTG AAC GAA GCG	Insertion der IF-Domäne von SlyD in die PPIase1-Domäne

Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung von RNaseT1

T1C2SC10SC6S_BsaI_+	AT GGT CTCT TGGT GCA AGC GAC TAC ACT AGC GGT TCT AAC AGC	Klonierung einer entfalteten RNaseT1-Variante
T1_BamHI_-	CGG GAT CCT TAT GTA CAT TCA ACG AAG TTG TTA CC	Klonierung einer entfalteten RNaseT1-Variante
W59F_SOE_-	ACC GCT CGA GAG GAT AGG AAA TTC GTA GTA GTT ACC GCT CAC	Klonierung einer entfalteten RNaseT1-Variante
W59F_SOE_+	GTG AGC GGT AAC TAC TAC GAA TTT CCT ATC CTC TCG AGC GGT	Klonierung einer entfalteten RNaseT1-Variante
T1P39A_SOE_F2-	TTC GTA GTT GTT GTA TTT GTG TGC GTA AGA ATT GGA ACC AAC AGT	Klonierung einer entfalteten RNaseT1-Variante
T1P39A_SOE_F3+	ACT GTT GGT TCC AAT TCT TAC GCA CAC AAA TAC AAC AAC TAC GAA	Klonierung einer RNaseT1-Variante

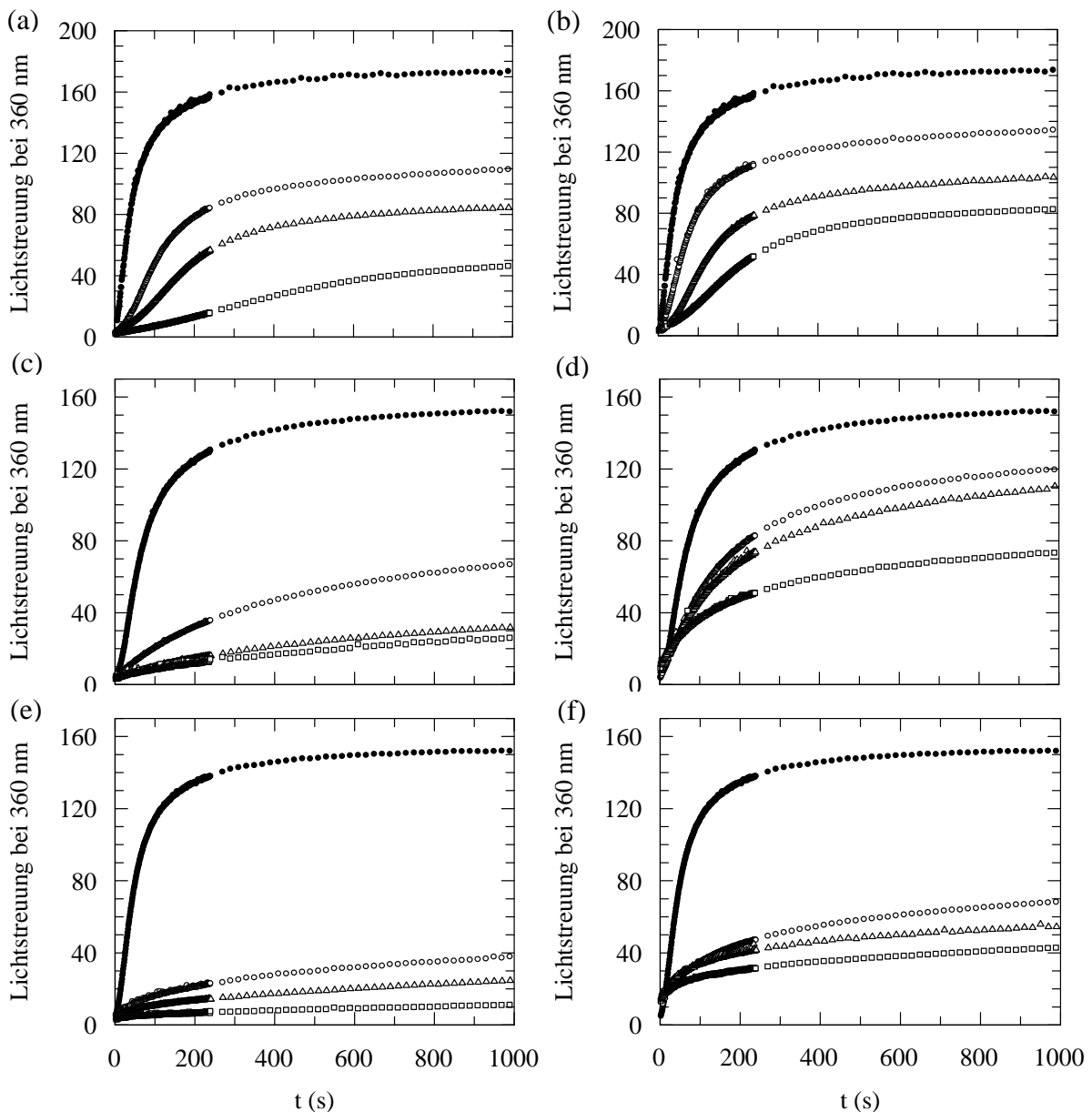


Abbildung 10-1: Citratsynthasetest zur Untersuchung der Chaperonaktivität der SlpA-Varianten. Dargestellt ist die Aggregation von $0,15 \mu\text{M}$ chemisch denaturierter Citratsynthase in Abwesenheit (\bullet) und in Anwesenheit von jeweils 3 (\circ), 6 (Δ) und $12 \mu\text{M}$ (\square) (a) *Klebsiella pneumoniae* SlpA, (b) *Enterobacter sakazakii* SlpA, (c) *Vibrio cholerae* SlpA, (d) *Shewanella frigidimarina* SlpA, (e) *Yesinia pestis* SlpA und (f) *Idiomarina baltica* SlpA. Die Aggregation der chemisch denaturierten Citratsynthase (in 50 mM Tris/HCl, $\text{pH}^{15^\circ\text{C}} 8,0$, 6 M GdmCl und 20 mM DTT) wurde durch 200 fache Verdünnung in Endbedingungen von 50 mM Tris/HCl $\text{pH}^{15^\circ\text{C}} 8,0$, 30 mM GdmCl und $0,1 \text{ mM}$ DTT. Die Aggregation wurde über die Zunahme des Streulichts bei 360 nm (Spaltbreite 3 nm) bei 15°C verfolgt. Die Bandbreiten betragen 3 nm für das Anregungs- und das Emissionslicht.

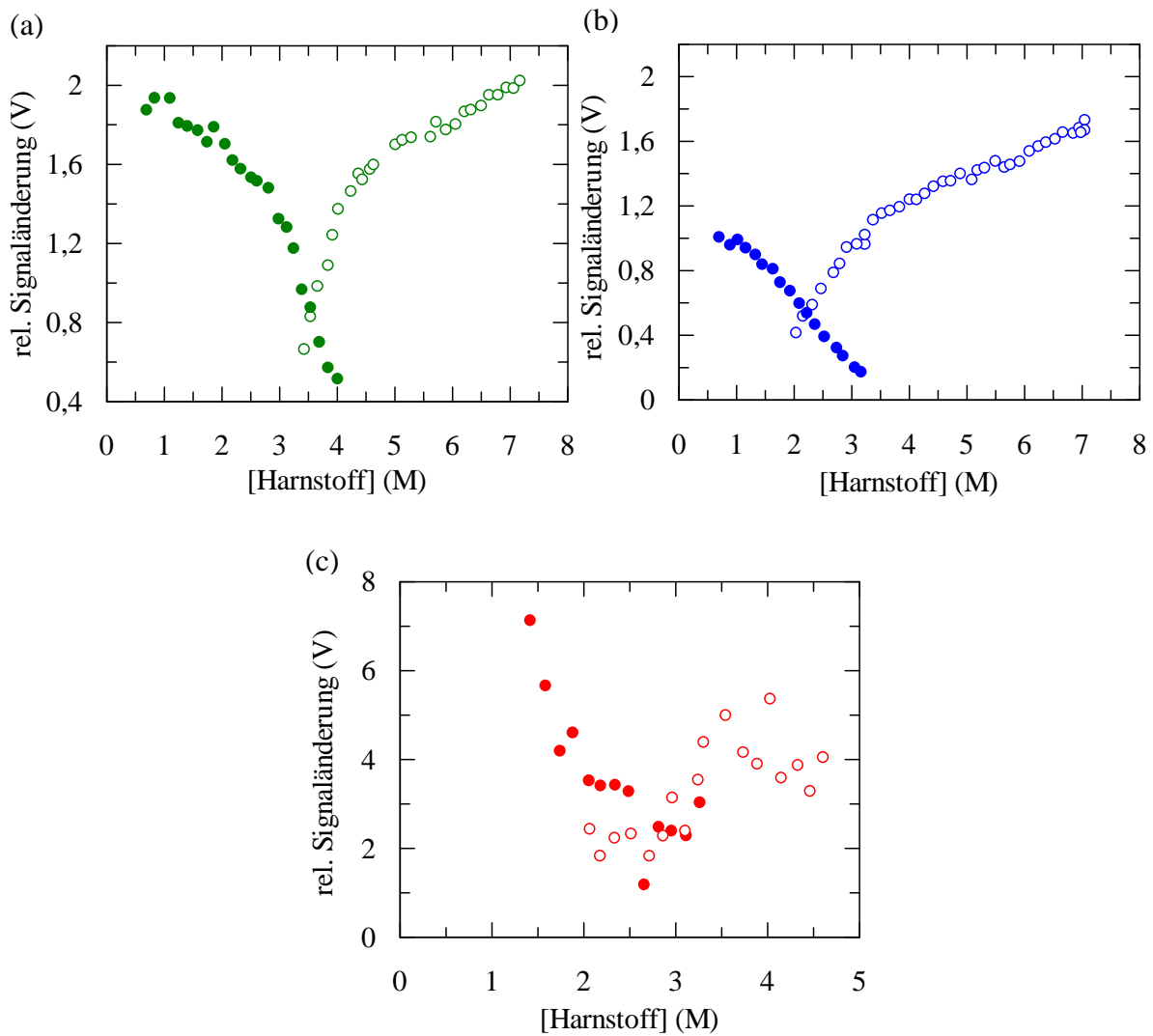


Abbildung 10-2: Amplituden der Entfaltungsreaktionen (offene Symbole) und Rückfaltungsreaktionen (geschlossene Symbole) von SlpA L48W (\circ, \bullet), SlpA Δ IF L48W (\circ, \bullet) und IF Y81W (Δ, \blacktriangle) in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration. Die Faltungskinetiken wurden mit einer Proteinkonzentration von 1 μ M anhand der integralen Fluoreszenz oberhalb von 330 nm nach Anregung bei 280 nm in 0,1 M Kaliumphosphat pH 7,5 bei 15 °C an einem *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer bei 15 °C gemessen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2007 bis April 2012 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Franz X. Schmid angefertigt.

Bei ihm möchte ich mich für die Möglichkeit dieses spannende Thema in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten, für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die gewährten Freiheiten bei der Projektauswahl bedanken. Sein stets offenes Ohr bei Problemen, die Bereitschaft zu Diskussionen und die zahlreichen wertvollen Ratschläge trugen wesentlich zum Fortschritt der Arbeit bei.

Vielen Dank an meine derzeitigen und ehemaligen Laborkolleginnen und -kollegen Roman Jakob, Gabriel Zoldak, Stefan Lorenz, Stephanie Hoffmann-Thoms, Johanna Koch und Philipp Schmidpeter für ihren fachlichen Rat, ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit im Labor. Dabei möchte ich besonders Roman Jakob danken, der mich bei meinen ersten wissenschaftlichen Gehversuchen mit viel Geduld unterstützt hat. Ein besonderer Dank gilt Edina Varga, Johanna Drögemüller, Monika Popp, Philipp Schmidpeter und Marc Wehmer für ihre Mitarbeit im Rahmen ihrer Projektpraktika, Bachelor- und Masterarbeiten.

Mein herzlicher Dank gilt Johanna Koch, Philipp Schmidpeter und Stephanie Thoms für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für die schöne und immer lustige Zeit im Labor.

Mein besonderer Dank auch an Dr. Christian Scholz für die Bereitstellung der homologen SlpA-Varianten und die vielen hilfreichen Diskussionen. Vielen Dank auch an Prof. Dr. J. Balbach und Michael Kovermann, für die gute Zusammenarbeit und das Lösen der SlpA-Struktur.

Danken möchte ich natürlich auch meinen "Bayreuther Mädels", Kirsten, Katrin, Anja und Sabine, Sandra, meinen "Labor Mädels", Steffi und Johanna und ganz besonders Johannes. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich habt und mir die Zeit neben der Wissenschaft so viel schöner macht.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Danke, dass ihr an mich glaubt, mich immer unterstützt und immer für mich da seid.

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 11. April 2012

Anne-Juliane Seitner

