

Lokale Änderungen der Struktur und ihr Einfluss auf die Stabilität und Faltung von Ribonuklease A

Dissertation
zum Erlangen des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
vorgelegt der
Mathematisch-naturwissenschaftlich-technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie

von Jens Köditz
geb. am 27. Juni 1973 in Ilmenau

Gutachter:

1. Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann
2. Prof. Dr. Wolfgang Pfeil
3. Prof. Dr. Thomas Kiefhaber

Halle (Saale), den 11.02.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006337

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006337>]

Symbole und Abkürzungen

$[\text{Denaturans}]_{1/2}$	Denaturanskonzentration, bei der unter Denaturans-induzierter Entfaltung $[\text{N}] = [\text{D}]$ ist
$[\text{GdnHCl}]_{1/2}$	GdnHCl-Konzentration, bei der unter GdnHCl-induzierter Entfaltung $[\text{N}] = [\text{D}]$ ist
$[\text{TFE}]_{1/2}$	TFE-Konzentration, bei der unter TFE-induzierter Entfaltung $[\text{N}] = [\text{D}]$ ist
$[\Theta]_{\text{MRW}}$	molare Elliptizität bezogen auf die Aminosäurereste
Å	Ångström (0,1 nm)
A	Peakfläche
Amp ^r	Ampicillinresistenz
B	Konstante der proteolytischen Abbaukinetik
c	Proteinkonzentration
cCMP	2',3'-zyklisches Cytidinmonophosphat
CD	Circulardichroismus
D	denaturierter Zustand
d	Schichtdicke der Küvette
Da	Dalton, Molmasseneinheit für Proteine und Peptide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-P	Enzym-Substrat-Komplex
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPL	<i>expressed protein ligation</i>
F	Fragmente
f_{N}	Anteil an nativem Protein
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Plancksches Wirkungsquantum
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
I	Intermediat
IDT2	6-Carboxyfluoreszein-dArUdAdA-6-Carboxytetramethylrhodamin

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
K	Boltzmann-Konstante
K_{an}^r	Kanamycinresistenz
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante der Katalyse
K_D	Gleichgewichtskonstante des N-D-Gleichgewichts
KE	Kunitz-Einheit
k_f	Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
k_p	Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse
k_u	Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung
MALDI-MS	<i>matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
m_k, m_{ku}, m_{kf}	Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten im Chevron-Plot in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration
m_N, m_D	Anstieg des Signals des nativen bzw. denaturierten Zustands in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration
M_r	molare Masse des Proteins
$m_{\Delta G}$	Anstieg von ΔG in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration
$m_{\Delta G}^\#, m_u, m_f$	Anstieg von $\Delta G^\#$ in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration
N	nativer Zustand
N^*	nativ-ähnlicher Zustand
N_A	Anzahl der Aminosäuren eines Proteins
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	optische Dichte
P	Protease
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prom	Promotor
R	Gaskonstante
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	<i>reversed phase</i>
S	beobachtetes Signal

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
S_N, S_D	Signale des nativen bzw. denaturierten Zustands
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Term	Terminator
TFE	Trifluorethanol
T_m	Übergangstemperatur, bei der unter thermischer Entfaltung $[N] = [D]$ ist
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	denaturierter/entfalteter Zustand
$U > v$	2',3'-zyklisches Uridinmonovanadat
UV	Ultraviolett
ÜZ	Übergangszustand
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>
ΔC_p	Wärmekapazität
ΔG	freie Enthalpie
$\Delta G^\#, \Delta G_u^\#, \Delta G_f^\#$	freie Aktivierungsenthalpie
ΔH	Reaktionsenthalpie
ΔH_m	Reaktionsenthalpie bei der Übergangstemperatur T_m
ΔS	Entropie
ΔS_m	Entropie bei der Übergangstemperatur T_m
Θ	Elliptizität
ε	molarer Extinktionskoeffizient

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Aufgabenstellung.....	9
2.	Theoretischer Teil.....	11
2.1.	Stabilität von Proteinen	11
2.1.1.	Bestimmung von Stabilitätsparametern.....	13
2.1.1.1.	Thermodynamische Parameter	14
2.1.1.2.	Kinetische Parameter.....	18
2.1.1.3.	Methode der limitierten Proteolyse zur Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeiten	22
2.1.2.	Das Modell der Entfaltungsregion	24
2.2.	TFE als Denaturans - Eigenschaften und Wirkung.....	26
2.2.1.	Wirkungsweise von TFE	27
2.2.2.	Untersuchungen der Struktur und Faltung von Proteinen in TFE.....	29
2.3.	RNase A aus Rinderpankreas als Modellprotein	32
2.3.1.	Struktur und Funktion von RNase A.....	32
2.3.2.	Stabilität und Faltung von RNase A.....	36
2.3.3.	Proteolysestudien zur RNase A.....	41
2.4.	Proteinase K.....	42
3.	Materialien und Methoden.....	43
3.1.	Materialien	43
3.1.1.	Chemikalien.....	43
3.1.2.	Proteine.....	43
3.1.3.	Oligonukleotide	44
3.1.4.	Plasmide	46
3.1.5.	<i>E. coli</i> -Stämme	46
3.1.6.	Kulturmedien.....	46
3.2.	Methoden.....	47
3.2.1.	Ortsgerichtete Mutagenese des <i>rnase A</i> -Gens.....	47
3.2.2.	Klonierung des <i>A20P-rnase A</i> -Gens in das pET 26b(+)-Plasmid.....	47
3.2.3.	Molekularbiologische Standardmethoden.....	48
3.2.3.1.	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	48

3.2.3.2.	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	49
3.2.3.3.	Größen- und Konzentrationsbestimmung von Plasmiden und DNA-Fragmenten	49
3.2.3.4.	Agarosegelelektrophorese	49
3.2.3.5.	DNA-Reinigung aus Agarosegelen	49
3.2.3.6.	Restriktionsverdau	49
3.2.3.7.	Dephosphorylierung des pET 26b(+) Plasmids	50
3.2.3.8.	Ligation des A20P-rnase A-Gens in das pET 26b(+)-Plasmid	50
3.2.3.9.	DNA-Sequenzierung	50
3.2.3.10.	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	50
3.2.4.	Expression und Reinigung von RNase A und ihren Varianten	51
3.2.4.1.	Expression der RNase A-Varianten	51
3.2.4.2.	Isolierung von <i>inclusion bodies</i>	51
3.2.4.3.	Renaturierung der RNase A-Varianten	52
3.2.4.4.	Reinigung von RNase A und ihren Varianten	52
3.2.5.	Bestimmung der RNase A-Konzentration	53
3.2.5.1.	Spektroskopische Konzentrationsbestimmung	53
3.2.5.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test	53
3.2.6.	TFE-induzierte Denaturierung und Proteolyse	53
3.2.7.	SDS-PAGE und densitometrische Evaluierung	54
3.2.8.	Bestimmung von Proteolysekonstanten, der relativen proteolytischen Angreif- barkeit und von Entfaltungskonstanten durch limitierte Proteolyse	54
3.2.8.1.	Bestimmung der Proteolysekonstante	54
3.2.8.2.	Relative proteolytische Angreifbarkeit	55
3.2.8.3.	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung	55
3.2.9.	Bestimmung der RNase A-Aktivität	55
3.2.9.1.	Bestimmung der RNase A-Aktivität gegenüber cCMP	55
3.2.9.2.	Bestimmung der RNase A-Aktivität gegenüber IDT2	56
3.2.10.	Bestimmung der Proteinase K-Aktivität	56
3.2.10.1.	Bestimmung der Proteinase K-Aktivität gegenüber <i>N</i> -Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilid	56
3.2.10.2.	Bestimmung der Proteinase K-Aktivität gegenüber Casein	57
3.2.11.	CD-Spektroskopie	57
3.2.11.1.	CD-Spektroskopie in TFE	58
3.2.11.2.	CD-Spektroskopie der RNase A-Varianten unter nativen Bedingungen	58
3.2.12.	Fluoreszenzspektroskopie	59
3.2.12.1.	Fluoreszenzspektroskopie in TFE	59
3.2.12.2.	Fluoreszenzspektroskopie in GdnHCl	59
3.2.12.3.	Bestimmung der Abhängigkeit der Tyrosinfluoreszenz von der TFE-Konzentration	59
3.2.13.	Bestimmung der Denaturans-induzierten Übergangskurven	60
3.2.14.	Analytische Ultrazentrifugation	60

3.2.15.	<i>Stopped-flow</i> Fluoreszenzspektroskopie	60
3.2.15.1.	Intrinsische Tyrosinfluoreszenz zur Detektion von Ent- und Rückfaltungsreaktionen	60
3.2.15.2.	Verfolgung von Ent- und Rückfaltungsreaktionen durch Detektion der RNase A-Aktivität gegenüber IDT2.....	61
3.2.16.	<i>Stopped-flow</i> CD-Spektroskopie	62
4.	Ergebnisse und Diskussion	63
4.1.	Stabilität und Faltung von RNase A und A20P-RNase A in TFE	63
4.1.1.	Bestimmung der Entfaltungsgeschwindigkeit mittels limitierter Proteolyse	63
4.1.2.	Qualitative Charakterisierung des proteolytischen Abbaus von RNase A und A20P-RNase A in Gegenwart von TFE	65
4.1.3.	Proteinase K-Aktivität in TFE.....	67
4.1.4.	Quantifizierung des proteolytischen Abbaus von RNase A und A20P-RNase A durch Proteinase K	68
4.1.5.	Relative proteolytische Angreifbarkeit von RNase A und Entfaltungskonstanten von A20P-RNase A in TFE.....	70
4.1.6.	Analytische Ultrazentrifugation	71
4.1.7.	CD-Spektren von RNase A und A20P-RNase A in TFE	71
4.1.8.	Fluoreszenzspektren von RNase A in TFE	73
4.1.9.	Einfluss von TFE auf die Fluoreszenz von <i>N</i> -Acetyl-Tyrosinamid.....	73
4.1.10.	TFE-induzierte Übergangskurven von RNase A und A20P-RNase A.....	74
4.1.11.	RNase A-Aktivität in TFE.....	76
4.1.12.	<i>Stopped-flow</i> Faltungskinetiken	77
4.1.12.1.	Verfolgung von Faltungsreaktionen über die Detektion der intrinsischen Tyrosinfluoreszenz.....	77
4.1.12.2.	Verfolgung von Faltungsreaktionen über die Detektion der RNase-Aktivität gegenüber IDT2 als Substrat.....	80
4.1.12.3.	Verfolgung von Faltungsreaktionen von A20P-RNase A durch CD-Spektroskopie.....	82
4.1.12.4.	Amplituden der Faltungsreaktionen von RNase A und A20P-RNase A in TFE	84
4.1.12.5.	Bestimmung der Parameter der kinetischen und thermodynamischen Stabilität aus dem Chevron-Plot	85
4.1.13.	Zusammenfassende Diskussion zur Stabilität und Faltung von RNase A und A20P-RNase A	88
4.1.13.1.	TFE-induzierte Strukturänderungen von RNase A und A20P-RNase A im Gleichgewicht.....	88
4.1.13.2.	Entfaltungskinetik von RNase A und A20P-RNase A in TFE	92
4.1.13.3.	Modell zur Entfaltung von RNase A	98
4.1.13.4.	Rückfaltungskinetik von RNase A und A20P-RNase A in TFE	99

4.1.13.5.	Energieprofil für die Faltung von A20P-RNase A	101
4.2.	Einfluss von Mutationen in proteolytisch angreifbaren Regionen von RNase A auf ihre thermodynamische Stabilität	103
4.2.1.	Auswahl der Mutationen	103
4.2.2.	CD-Spektren von RNase A und ihren Varianten	104
4.2.3.	Aktivität von RNase A und ihren Varianten	105
4.3.4.	Thermodynamische Stabilität von RNase A und ihren Varianten	106
4.2.5.	Zusammenfassende Diskussion des Einflusses von Mutationen in proteolytisch angreifbaren Regionen von RNase A auf ihre thermodynamische Stabilität.....	108
5.	Zusammenfassung.....	113
6.	Literaturverzeichnis.....	115
Anhang	129

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Obwohl die zunehmende Bedeutung von Proteinen für die Entwicklung neuer umweltfreundlicher Verfahren bei der Herstellung chemischer und pharmazeutischer Produkte, in der Analytik und in der therapeutischen Medizin heute nicht mehr angezweifelt wird, stellt die mangelnde Stabilität der biologisch aktiven Proteinstruktur unter *in vitro*-Bedingungen noch immer eine ernste Limitation für die Anwendung von Biokatalysatoren dar. So sind Proteine oft neben einer reversiblen Denaturierung irreversiblen Prozessen (Aggregation, Missfaltung, proteolytischer Abbau) ausgesetzt, was zu einer ständigen Abnahme der biologischen Aktivität führt. Daher benötigen Proteine für biotechnologische Anwendungen eine hohe Stabilität. So ist man an der Untersuchung der Mechanismen, die zur Ausbildung und zur Stabilisierung der nativen Proteinstruktur führen, interessiert, wobei die molekularen Grundlagen noch nicht so weit verstanden sind, um sie für ein rationelles Proteindesign zu nutzen (Richards 1997; Fersht 1999; Burton et al. 2002). Ein besseres Verständnis für Entfaltungs- und Rückfaltungsvorgänge ist entscheidend für die Entwicklung von Stabilisierungsstrategien.

Untersuchungen zum Mechanismus der Proteinstabilisierung hatten zu der Hypothese geführt, dass jedes Proteinmolekül eine oder mehrere labile Strukturregionen besitzt, die für den Entfaltungsprozess entscheidend sind und deren Stabilisierung zu einer Stabilisierung des Gesamtproteins führt (Ulbrich et al. 1986; Schellenberger and Ulbrich 1989; Ulbrich-Hofmann et al. 1993). Zur Verifizierung dieses Modells werden Methoden benötigt, die die Beobachtung lokaler Strukturregionen erlauben. Neben der Kombination von H/D-Austausch und NMR-Spektroskopie (Raschke and Marqusee 1998) ist hierfür die Methode der limitierten Proteolyse geeignet, die zum Studium der Entfaltung von Ribonuklease A (RNase A) und ihrer glykosylierten Form, der Ribonuklease B (RNase B), genutzt wurde, um flexible Strukturregionen vor und während der Entfaltung zu lokalisieren (Arnold et al. 1996; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997; Arnold et al. 1998; 1999).

Auf Grund der Applikation so genannter *non-conventional media* war das Ziel des 1. Teils dieser Arbeit, diese Untersuchungen auf die Stabilität und Entfaltung von RNase A und ihrer proteolyseresistenteren Variante A20P-RNase A in organischen Medien auszudehnen. Dabei wurde Trifluorethanol (TFE) als organisches Agens auf Grund seiner ausgeprägten strukturinduzierenden Eigenschaften gewählt (Buck 1998). Neben den Untersuchungen der Proteine durch spektroskopische Methoden wurde die Methode der limitierten Proteolyse zur Detektion lokaler Strukturänderungen favorisiert.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte das Modell der Entfaltungsregion mittels Mutationsstudien verifiziert werden. Dazu wurde der Einfluss von Mutationen in zwei proteolytisch sensitiven Regionen von RNase A auf die thermodynamische Stabilität des Enzyms untersucht. Bei diesen Regionen handelt es sich einerseits um die *loop*-Region um Ala20, die schon unter nativen Bedingungen für die unspezifischen Proteasen Subtilisin Carlsberg, Proteinase K und Elastase proteolytisch zugänglich ist (Richards and Vithayathil 1959; Klee 1965; Rauber et al. 1978) und andererseits um die Region Lys31–Phe46, die als so genannte Entfaltungsregion identifiziert wurde und unter denaturierenden Bedingungen als erste proteolytisch zugänglich wird (Arnold et al. 1996).

2. Theoretischer Teil

2.1. *Stabilität von Proteinen*

Die biologische Aktivität von Proteinen ist eng mit ihrer nativen, dreidimensionalen Struktur verknüpft. Durch Einwirkung denaturierender Einflüsse wie z.B. erhöhte Temperatur, chemische Denaturanzien (Guanidinhydrochlorid (GdnHCl), Harnstoff, organische Lösungsmittel) oder erhöhter Druck wird die native Struktur des Proteins zerstört und es verliert seine biologische Aktivität. Das Ausmaß der denaturierenden Wirkung hängt dabei sowohl von der Art und Intensität des Denaturans als auch von den spezifischen Eigenschaften des Proteins ab. So können Enzyme aus extremophilen Organismen stärkere Intensitäten an Denaturanzien wie z.B. erhöhte Temperatur (bei Proteinen aus thermophilen Organismen) oder höhere Salzkonzentrationen (bei Proteinen aus halophilen Organismen) im Gegensatz zu ihren mesophilen Vertretern tolerieren (Jaenicke and Böhm 1998). Interessanterweise wird die höhere Stabilität dieser Proteine nur durch geringe Änderungen der Proteinstruktur erreicht (Jaenicke and Böhm 1998). Der native Zustand, welcher von Fluktuationen abgesehen über eine gut definierte, dreidimensionale Struktur verfügt, wird sowohl durch kovalente (Disulfidbindungen) und nicht-kovalente Bindungen (Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Interaktionen, ionische Wechselwirkungen, van der Waals-Bindungen) als auch durch eine optimale Packungsdichte stabilisiert. Diese Wechselwirkungen werden während der Denaturierung teilweise (z.B. bei der Entstehung von Intermediaten wie dem *molten globule* oder im säure- und TFE-denaturierten Zustand) oder vollständig (im *random coil*) zerstört. Der denaturierte Zustand ist durch eine Vielzahl heterogener, flexibler, miteinander im Gleichgewicht stehender Zustände gekennzeichnet. Trotz der riesigen Anzahl von Wechselwirkungen im nativen Protein ist dieses nur begrenzt stabil ($20 - 60 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, Fersht 1999). Dieser geringe Stabilitätsunterschied zwischen nativem und denaturiertem Zustand ist der Tatsache zuzuschreiben, dass während der Faltung auftretende energetisch ungünstige Wechselwirkungen durch energetisch günstige Wechselwirkungen kompensiert werden müssen. Dabei sind nicht nur die intramolekularen Wechselwirkungen im nativen Zustand zu berücksichtigen, sondern das System als Ganzes ist zu analysieren. Dazu gehört die Betrachtung der Interaktionen sowohl im nativen als auch im denaturierten Zustand, wobei neben den intramolekularen den intermolekularen

Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekül und Lösungsmittel (Wasser) eine bedeutende Rolle zukommt.

Trotz guter Vorhersagen der durch Änderung der Primärstruktur auftretenden Veränderungen der nativen Struktur mittels Computermodellierung sind kaum Aussagen über die Beeinflussung der Stabilität möglich (De Filippis et al. 1994). Für Proteine bekannter Struktur stellt heute die Methode der ortsgerichteten Mutagenese, gekoppelt mit spektroskopischen Methoden und Computermodellierung, eine gute Möglichkeit zur quantitativen Analyse des Einflusses von einzelnen Aminosäureresten auf die Stabilität der Struktur dar (Fersht 1999). Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der für die Proteininstabilität verantwortlichen Mechanismen ist der Vergleich verschiedener homologer Enzyme aus unterschiedlichen Organismen. Hier ist vor allem der Vergleich von Proteinen aus psychro-, meso- und thermophilen Organismen bekannt (Jaenicke 1981; Vriend and Eijsink 1993). Neben dem Austausch von proteinogenen Aminosäuren durch ortsgerichtete Mutagenese ermöglichen neueste Methoden die Einführung nicht-proteinogener Aminosäuren und Peptidomimetika in das Protein. Hier sind die Methoden des *selective pressure* (Budisa et al. 1998; Budisa et al. 1999; Budisa et al. 2002) und der *expressed protein ligation* (EPL) (Evans et al. 1998; Muir et al. 1998) zu nennen. Bei der Methode des *selective pressure* werden auxotrophe *E. coli* Stämme genutzt, die nicht mehr in der Lage sind bestimmte Aminosäuren zu bilden. Durch Zugabe eines Aminosäureanalogons in das Nährmedium wird dieses anstatt der natürlichen Aminosäure in die Proteine eingebaut. Bei der *expressed protein ligation* wird ein chemisch synthetisiertes Peptid, welches das Analogon enthält, mit dem unmodifizierten Rest des gewünschten Proteins, welches als Inteinusionsprotein durch Fermentation hergestellt wird, fusioniert. Während durch die erste Methode das Einführen der nicht-proteinogenen Aminosäuren an jeder Position mit entsprechendem Codon erfolgt, kann durch EPL eine Position des Proteins selektiv ohne Veränderung anderer Positionen des gleichen Aminosäurerests ausgetauscht werden. Durch Kombination von chemischer Synthese und EPL kann zudem die Einführung von Verbindungen auf eine Vielzahl von nicht-proteinogenen Modulen ausgedehnt werden (Muir 2003).

Zur Stabilisierung von Proteinen unbekannter Struktur eignen sich vor allem die Methode der gerichteten Evolution (Strausberg et al. 1995; Zhao and Arnold 1999) und das *consensus*-Konzept (Lehmann et al. 2000). Neben diesen gentechnischen Methoden bieten die chemische Modifizierung von Seitenketten (Mozhaev 1993), das intra- und intermolekulare Verknüpfen durch bifunktionelle Reagenzien (Wong and Wong 1992), die kovalente und nicht-kovalente Immobilisierung von Proteinmolekülen (Ulbrich et al. 1986; Schellenberger

and Ulbrich 1989) und die Veränderung des Reaktionsmediums, z.B. durch Zusatz organischer Lösungsmittel (Klibanov 1989; Ulbrich-Hofmann and Selisko 1993; Fagain 1995), weitere Möglichkeiten der Proteinstabilisierung, die sich aber auf Grund der geringen Spezifität nur bedingt für die Untersuchung von Stabilisierungsmechanismen eignen.

Zur Aufklärung der Mechanismen der Stabilisierung von Proteinen werden sowohl Gleichgewichts- als auch kinetische Untersuchungen durchgeführt. Während Gleichgewichtsuntersuchungen auf reversibel denaturierende Proteine beschränkt sind, können durch kinetische Untersuchungen auch Aussagen über die Stabilität irreversibel denaturierender Proteine erhalten werden. Studien zur Gleichgewichtslage zwischen nativem und denaturiertem Zustand von Proteinen konzentrierten sich sowohl auf die Bestimmung und den Vergleich von Übergangstemperaturen (T_m) bzw. der Denaturationskonzentration ($[Denaturans]_{1/2}$), bei der bei einem Zweizustandsmodell die Konzentration beider Zustände identisch ist, als auch auf die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität, die durch die freie Enthalpie des Denaturierungsgleichgewichts (ΔG) beschrieben wird. Kinetische Untersuchungen fokussierten vor allem auf die Aufklärung von Faltungswegen, d. h. die Bestimmung der sequenziellen Schritte und deren Aktivierungsenthalpien (ΔG^\ddagger_f), die ausgehend von der ungefalteten Polypeptidkette zum nativ gefalteten Protein führen. Dazu wurden bereits verschiedene Modelle für den Faltungsweg von Proteinen entwickelt (Fersht 1999). Neben diesen Faltungsstudien besitzen kinetische Entfaltungsuntersuchungen bei der Bestimmung der Lebensdauer von Proteinen in der Zelle und bei der Anwendung in biotechnologischen Prozessen eine große Bedeutung. Nach der Denaturierung von Proteinen können irreversible Prozesse wie Aggregation, Missfaltung, proteolytischer Abbau oder chemische Modifizierungen auftreten, die zur ständigen Abnahme an nativem Protein führen. Dementsprechend wird die Entfaltungsgeschwindigkeit des Proteins und die damit verbundene kinetische Stabilität, die durch die freie Aktivierungsenthalpie (ΔG^\ddagger_u) beschrieben wird, als Maß für die Stabilität genutzt. Zur Untersuchung des Einflusses von Modifizierungen der Proteinstruktur (z.B. durch Mutationen) auf die thermodynamische und kinetische Stabilität des Proteins hat sich die Bestimmung der Stabilitätsdifferenzen $\Delta\Delta G$ und $\Delta\Delta G^\ddagger$ bewährt.

2.1.1. Bestimmung von Stabilitätsparametern

Die thermodynamische Stabilität ΔG (Abb. 1) beschreibt die Differenz der freien Enthalpie des nativen (N) und des denaturierten Zustands (D). Die Differenz zwischen dem nativen

bzw. dem denaturierten Zustand und dem Übergangszustand stellt die freie Aktivierungsenthalpie $\Delta G_u^\#$ bzw. $\Delta G_f^\#$ dar, wobei erstere die kinetische Stabilität repräsentiert (Abb. 1). Es gilt:

$$\Delta G = \Delta G_u^\# - \Delta G_f^\# \quad (1)$$

Dabei setzt sich ΔG aus einem enthalpischen (ΔH - Reaktionsenthalpie) und einem entropischen Term (ΔS - Entropie) entsprechend der Gibbs-Gleichung (2) zusammen.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (2)$$

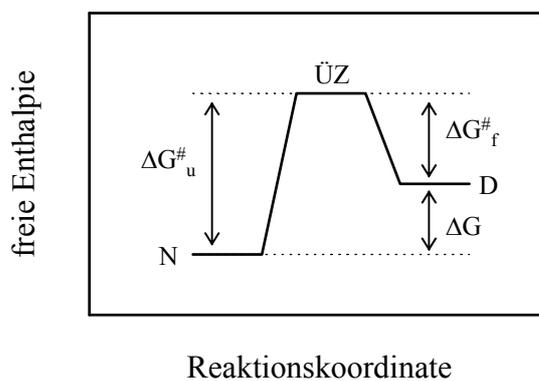


Abb. 1: Schematische Darstellung des Energieprofils eines Proteins unter nativen Bedingungen.

Energieprofil gilt für die Faltung nach einem Zweizustandsmodell. N - nativer Zustand, ÜZ - Übergangszustand, D - denaturierter Zustand, ΔG - freie Enthalpie, $\Delta G_u^\#$ bzw. $\Delta G_f^\#$ - freie Aktivierungsenthalpie der Entfaltung bzw. Rückfaltung.

2.1.1.1. Thermodynamische Parameter

Thermodynamische Parameter sind nur für vollständig reversibel denaturierende Proteine bestimmbar. Im einfachsten Fall, einem Zweizustandsmodell, wird ΔG durch die Lage des Gleichgewichts zwischen den Zuständen N und D bestimmt (3), welches unmittelbar mit den Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (*unfolding*) k_u bzw. der Rückfaltung (*folding*) k_f verknüpft ist. Mit steigender Denaturansintensität wird das Gleichgewicht zugunsten von D verschoben und ΔG sinkt. Die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen N und D lässt sich mittels spektroskopischer Methoden verfolgen, wobei N-D-Übergangskurven erhalten werden. Aus der Änderung der Signalintensität kann der jeweilige Anteil von N und D ermittelt werden (Fersht 1999). In der Praxis ändern sich die Signale von N und D in den prä- und posttransitionalen Bereichen mit steigender Denaturanskonzentration näherungsweise

linear (Abb. 2), was bei der Bestimmung des relativen Anteils an nativem Protein (f_N) berücksichtigt werden muss (Santoro and Bolen 1988). Durch Berücksichtigung der linearen Anstiege im prä- und posttransitionalen Bereich (4) erhält man zur Bestimmung von f_N Gleichung (5), wobei S_N und S_D das Signal des nativen bzw. des denaturierten Proteins und S das beobachtete Signal sind.



$$S_N = S_N^0 + m_N \cdot [\text{Denaturans}] \quad S_D = S_D^0 + m_D \cdot [\text{Denaturans}] \quad (4)$$

S_N^0, S_D^0 – Signal des nativen bzw. denaturierten Zustands in Abwesenheit von Denaturans

m_N, m_D – Anstieg des Signals des nativen bzw. denaturierten Zustands in Abhängigkeit von der Denaturanskonzentration

$$f_N = \frac{[N]}{[N] + [D]} = \frac{S - S_D}{S_N - S_D} \quad (5)$$

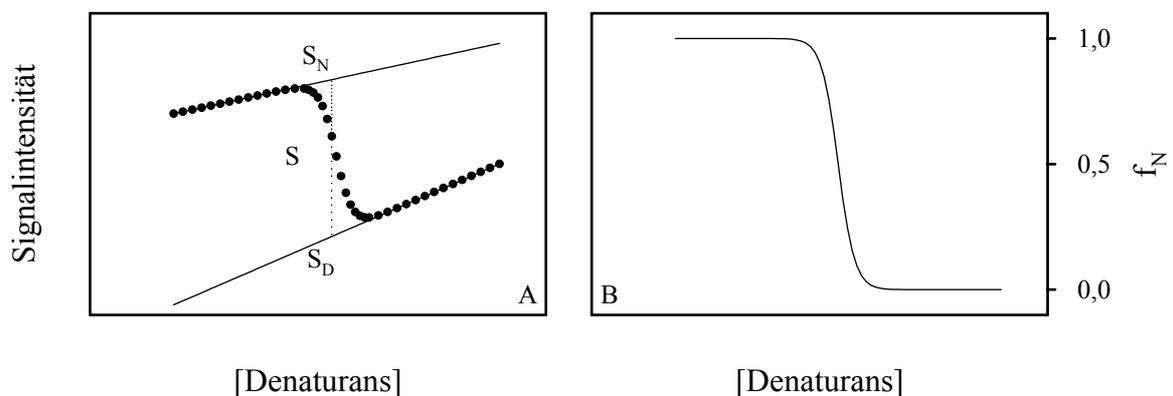


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Übergangskurve (A) und des mittels Gleichung (5) ermittelten relativen Anteils an nativem Protein f_N (B).

Aus der Gleichgewichtskonstante K_D , die nach Gleichung (6) ermittelt werden kann, und der Beziehung (7) kann die freie Enthalpie des Systems für die jeweilige Denaturanskonzentration berechnet werden.

$$K_D = \frac{[D]}{[N]} = \frac{k_u}{k_f} = \frac{1 - f_N}{f_N} = \frac{S_N - S}{S - S_D} \quad (6)$$

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_D \quad (R - \text{Gaskonstante}) \quad (7)$$

Zur Bestimmung der freien Enthalpie in Abwesenheit von Denaturanzien (ΔG^0) wurden verschiedene Extrapolationsmethoden entwickelt (Pace 1986), wobei die lineare Extrapolation die einfachste und am häufigsten verwendete Methode ist. Es gilt:

$$\Delta G = \Delta G^0 - m_{\Delta G} \cdot [\text{Denaturans}] \quad (8)$$

Dabei ist $m_{\Delta G}$ der Anstieg von ΔG in Abhängigkeit von der Denaturanskonzentration. Im Übergangsmittelpunkt sind die Konzentrationen von N und D identisch und $\Delta G = 0$, wodurch sich aus (8) Gleichung (9) ergibt,

$$\Delta G^0 = m_{\Delta G} \cdot [\text{Denaturans}]_{1/2} \quad (9)$$

wobei der $[\text{Denaturans}]_{1/2}$ -Wert die Denaturanskonzentration im Übergangsmittelpunkt ist. Durch Kombination von Gleichung (6), (7), (8) und (9) erhält man für die gemessene Signalintensität die in Gleichung (10) dargestellte Abhängigkeit. Setzt man für die Signale des nativen und denaturierten Zustands (S_N bzw. S_D) die linearen Abhängigkeiten nach Gleichung (4) ein, so erhält man die Gleichung (11) (Santoro and Bolen 1988), welche die direkte Bestimmung von $m_{\Delta G}$ und $[\text{Denaturans}]_{1/2}$ aus den beobachteten Signalintensitäten mittels nicht-linearer Regression ermöglicht. Aus den erhaltenen Parametern kann nach Gleichung (9) ΔG^0 bestimmt werden.

Die für ein Protein ermittelten ΔG^0 -Werte müssen unabhängig von der Art des Denaturans übereinstimmen. Der Anstieg $m_{\Delta G}$ ist ein Maß für die Zunahme der Lösungsmittelzugänglichkeit der Aminosäurereste durch die Denaturierung (Fersht 1999). Ein geringerer $m_{\Delta G}$ -Wert ist auf einen geringeren Unterschied der Lösungsmittelzugänglichkeit

zwischen nativem und denaturiertem Zustand zurückzuführen. Jedoch kann ein geringerer $m_{\Delta G}$ -Wert auch ein Indiz für eine Mehrschritt-Denaturierung und damit für eine Abweichung vom Zweizustandsmodell sein (Fersht 1999).

$$S = \frac{S_N + S_D \cdot \exp [(m_{\Delta G} \cdot ([\text{Denaturans}] - [\text{Denaturans}]_{1/2}) / RT]}{1 + \exp [(m_{\Delta G} \cdot ([\text{Denaturans}] - [\text{Denaturans}]_{1/2}) / RT]} \quad (10)$$

$$S = \frac{(S_N^0 + m_N \cdot [\text{Denaturans}]) + (S_D^0 + m_D \cdot [\text{Denaturans}]) \cdot \exp [(m_{\Delta G} \cdot ([\text{Denaturans}] - [\text{Denaturans}]_{1/2}) / RT]}{1 + \exp [(m_{\Delta G} \cdot ([\text{Denaturans}] - [\text{Denaturans}]_{1/2}) / RT]} \quad (11)$$

Thermische Übergangskurven werden nach dem gleichen Verfahren wie die durch chemische Denaturanzien induzierten Übergangskurven analysiert. Jedoch besteht für die thermische Denaturierung keine lineare Beziehung zwischen ΔG und der Temperatur analog zu Gleichung (8). Die Bestimmung von $\Delta G^{25^\circ\text{C}}$ ist bei Kenntnis der Wärmekapazität ΔC_p durch die Gibbs-Helmholtz Gleichung (12) möglich (Pace 1990).

$$\Delta G^{(T)} = \Delta H_m \cdot (1 - T / T_m) - \Delta C_p \cdot [(T_m - T) + T \cdot \ln (T / T_m)] \quad (12)$$

Wenn die Gleichgewichtskonstante als Funktion der Temperatur (im Übergangsbereich) bestimmt wurde, kann mit Hilfe der van't Hoff Gleichung (13) die Enthalpie ΔH der thermischen Denaturierung bestimmt werden. Für $\ln K_D = 0$ wird die Übergangstemperatur T_m und ΔH_m erhalten. Mit Hilfe der Gibbs-Gleichung (2) kann dann auch die Entropie bei der Übergangstemperatur (ΔS_m) ermittelt werden.

$$-\Delta H / R = d(\ln K_D) / d(1 / T) \quad (13)$$

Zur Bestimmung von ΔC_p wurden verschiedene Methoden genutzt (Pace 1990; Fersht 1999). Die beste Methode zur Bestimmung von ΔC_p ist die Kalorimetrie. Es gibt auch eine direkte Bestimmung von ΔC_p aus der thermischen Übergangskurve, die jedoch nur für wenige Fälle

erfolgreich ist. Neben diesen Methoden kann ΔC_p auch durch die Bestimmung von T_m und ΔH_m in Abhängigkeit vom pH-Wert (Fersht 1999) oder auch aus Harnstoff-induzierten Übergangskurven bei verschiedenen Temperaturen unterhalb des thermischen Übergangs bestimmt werden (Pace and Laurents 1989).

Bei einem Zweizustandsmodell muss die mittels Kalorimetrie bestimmte Enthalpie ΔH^{cal} mit der van't Hoff Enthalpie $\Delta H^{\text{van't Hoff}}$ (13) übereinstimmen (Fersht 1999). $\Delta H^{\text{cal}} / \Delta H^{\text{van't Hoff}} < 1$ deutet auf die Akkumulation eines Intermediats hin, bei $\Delta H^{\text{cal}} / \Delta H^{\text{van't Hoff}} > 1$ wurde die Messung durch Aggregation oder anderen Faktoren gestört.

2.1.1.2. *Kinetische Parameter*

Während die thermodynamischen Parameter das Gleichgewicht zwischen N und D (3) beschreiben, bestimmen die kinetischen Parameter den zeitlichen Verlauf der Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktion, die zur Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts führen. Die Faltungsreaktionen können aus mikroskopischen Reaktionen bestehen, die auf Grund zu geringer Unterschiede ihrer Eigenschaften nicht voneinander getrennt werden können und so eine komplexe makroskopische Phase erzeugen. Unterscheiden sich die mikroskopischen Reaktionen genügend in ihren Eigenschaften, so können oft mehrere makroskopische Phasen beobachtet werden. Diese mehrphasigen Reaktionen können sowohl durch auftretende Intermediate als auch durch die Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung verursacht sein (Fischer and Schmid 1990). Die Faltungsphasen folgen im Allgemeinen einer Reaktion 1. Ordnung (14). Im einfachsten Fall würde man sowohl für die Entfaltung als auch für die Rückfaltung jeweils eine Phase detektieren können, die den zeitlichen Verlauf der Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts charakterisiert und deren Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) sich aus den Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion zusammensetzt (15). Die Verfolgung von Faltungskinetiken kann durch eine Vielzahl von Methoden erfolgen. Die am häufigsten verwendeten sind dabei spektroskopische Methoden wie UV-, CD-, Fluoreszenz-, Infrarot- und NMR-Spektroskopie. Daneben werden die Methode des H/D-Austauschs, gekoppelt mit NMR-Spektroskopie, und die limitierte Proteolyse für derartige Untersuchungen herangezogen.

$$S = A \cdot \exp(-k \cdot t) + B \quad (14)$$

(S – Signal, A – Amplitude der Faltungsreaktion, k – Geschwindigkeitskonstante, t – Zeit, B – *offset*)

$$k_{\text{obs}} = k_u + k_f \quad (15)$$

Wird die enzymatische Aktivität eines Proteins zur Verfolgung von Ent- und Rückfaltungsreaktionen genutzt, kann die zu beobachtende Reaktion durch Gleichung (16) beschrieben werden, welche dem Integral des die Faltungsreaktion charakterisierenden Signals (14) entspricht.

$$S = C \cdot \exp(-k \cdot t) + D \cdot t + B \quad (16)$$

Dabei stellt S das zu beobachtende Signal, C die Amplitude der Faltungsphase mit $C = A / k$ aus Gleichung (14), k die Geschwindigkeitskonstante, D die katalytische Aktivität im Gleichgewicht und B das spektroskopische *offset* dar.

Für die Denaturierung mittels chemischer Denaturanzien wie Harnstoff oder GdnHCl wurde für viele Proteine eine lineare Abhängigkeit für die halblogarithmische Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung bzw. Rückfaltung k_u bzw. k_f gegen [Denaturans] gefunden (Fersht 1999). Es gilt:

$$\ln k_u = \ln k_u^0 + m_{ku} \cdot [\text{Denaturans}] \quad \text{bzw.} \quad \ln k_f = \ln k_f^0 - m_{kf} \cdot [\text{Denaturans}] \quad (17)$$

wobei k_u^0 bzw. k_f^0 die Geschwindigkeitskonstanten in Abwesenheit des Denaturans und m_{ku} bzw. m_{kf} die jeweiligen Anstiege der linearen Funktionen in der Auftragung von $\ln k_{\text{obs}}$ gegen [Denaturans], die als Chevron-Plot bekannt ist, darstellen. In diesen linearen Bereichen des Entfaltungs- bzw. Rückfaltungastes des Chevron-Plots (Abb. 3) wird die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion im Verhältnis zur Hinreaktion sehr klein, wodurch k_{obs} annähernd der Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion (k_u bzw. k_f) entspricht. Durch Kombination der Gleichungen (15) und (17) erhält man die Beziehung (18). Danach kann der vollständige Verlauf von $\ln k_{\text{obs}}$ im Chevron-Plot durch eine nicht-lineare Regression ermittelt werden.

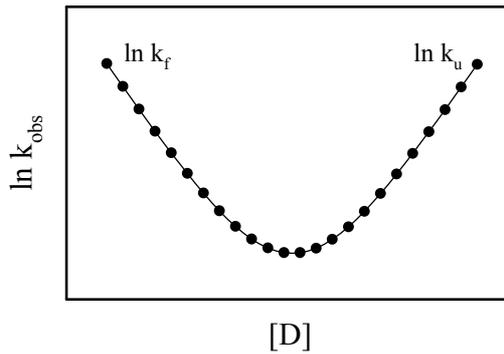


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Chevron-Plots.

Die Linie zeigt die Regression mittels Gleichung (18).

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln (k_f^0 \cdot \exp (-m_{kf} \cdot [\text{Denaturans}]) + k_u^0 \cdot \exp (m_{ku} \cdot [\text{Denaturans}]))) \quad (18)$$

Die Geschwindigkeitskonstanten können mit Hilfe der Eyring-Gleichung (19) in die entsprechenden freien Aktivierungsenthalpien ΔG^\ddagger umgewandelt werden, wobei K die Boltzmann-Konstante, h das Plancksche Wirkungsquantum und k die entsprechende Geschwindigkeitskonstante darstellt.

$$\Delta G^\ddagger = R \cdot T \cdot (\ln (K / h) - \ln (k / T)) \quad (19)$$

Die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger setzt sich wie die freie Enthalpie ΔG (2) aus einem enthalpischen und einem entropischen Term zusammen (20).

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger \quad (20)$$

Die lineare Abhängigkeit von $\ln k_{\text{obs}}$ lässt sich auf ΔG^\ddagger übertragen (Fersht 1999), und es gilt:

$$\Delta G_u^\ddagger = \Delta G_u^{\ddagger 0} - m_u \cdot [\text{Denaturans}] \quad \text{bzw.} \quad \Delta G_f^\ddagger = \Delta G_f^{\ddagger 0} - m_f \cdot [\text{Denaturans}] \quad (21)$$

wobei $\Delta G_u^{\ddagger 0}$ und $\Delta G_f^{\ddagger 0}$ die freie Aktivierungsenthalpie der Entfaltungs- bzw. der Rückfaltungsreaktion in Abwesenheit des Denaturans ist. Durch Kombination der Gleichungen (17), (19) und (21) lassen sich die Anstiege m_u und m_f ermitteln (22).

$$m_u = R \cdot T \cdot m_{ku} \quad \text{bzw.} \quad m_f = R \cdot T \cdot m_{kf} \quad (22)$$

Für die thermische Denaturierung gilt die lineare Abhängigkeit der halblogarithmischen Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten gegen die Temperatur wiederum nicht. Durch

Kombination der Gleichungen (19) und (20) erhält man die modifizierte Eyring-Gleichung (23). Durch den Eyring-Plot ($\ln(k_u / T)$ gegen $1 / T$) kann die Geschwindigkeitskonstante linear extrapoliert werden, wodurch die Bestimmung von k_u und ΔG^\ddagger unter nativen Bedingungen möglich wird. Neben der Bestimmung von ΔG^\ddagger können auch ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger ermittelt werden.

$$\ln(k_u / T) = \ln(K / h) + \Delta S^\ddagger / R - \Delta H^\ddagger / R \cdot T \quad (23)$$

In der Praxis tritt jedoch selten ein ideales Zweizustandsmodell auf. Hier können Faltungsprozesse über die Bildung von Intermediaten erfolgen, oder der Zustand D kann hinsichtlich seines Rückfaltungsprozesses nicht als homogen betrachtet werden. So können unter denaturierenden Bedingungen Isomerisierungsreaktionen der Peptidyl-Prolyl-Bindungen (Kiefhaber et al. 1992; Kiefhaber and Schmid 1992) auftreten, die sowohl die beobachtbare Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung als auch die der Rückfaltung beeinflussen. Zur Bestimmung der eigentlichen Rückfaltungsreaktionen bietet sich die Doppelsprung-Technik an (Kiefhaber and Schmid 1992; Mayr et al. 1996). Hier werden Proteine definierte Zeiten der Denaturierung ausgesetzt und anschließend wird die Rückfaltung durch Verdünnung des Denaturans induziert. Dies ermöglicht die Bestimmung der eigentlichen Rückfaltungsgeschwindigkeit, da langsamere Isomerisierungsreaktionen unter denaturierenden Bedingungen ausgeschaltet werden. Die Methode erlaubt aber auch die Bestimmung der Isomerisierungsgeschwindigkeit unter denaturierenden Bedingungen (Mayr et al. 1996). Durch Doppelsprungexperimente vom denaturierten Zustand zu nativen Bedingungen und wieder zu höheren Denaturanskonzentrationen kann die Bildung des nativen Zustands aus nativ-ähnlichen Intermediaten verfolgt werden (Schmid 1983; Golbik et al. 1999). Zur Aufklärung von komplexen Faltungsreaktionen sind vor allem Puls-H/D-Austausch-Studien geeignet (Udgaonkar and Baldwin 1990; Baldwin 1993; Kiefhaber and Baldwin 1995; Udgaonkar and Baldwin 1995; Juneja and Udgaonkar 2002).

Ein anderes Problem stellt die Bestimmung von k_u unter schwach denaturierenden Bedingungen dar, da auf Grund der Gleichgewichtslage keine oder nur sehr kleine Signaländerungen auftreten. Dies macht die Bestimmung von k_u mittels spektroskopischer Methoden schwierig. Eine Lösung dieses Problems bietet die Kopplung von irreversiblen Folgereaktionen an die Entfaltungsreaktion. Dies können einerseits H/D-Austausch Studien (Kiefhaber and Baldwin 1995; Juneja and Udgaonkar 2002) oder chemische Modifizierungen des denaturierten Zustands (Sridevi and Udgaonkar 2002) sein. Neben diesen Methoden

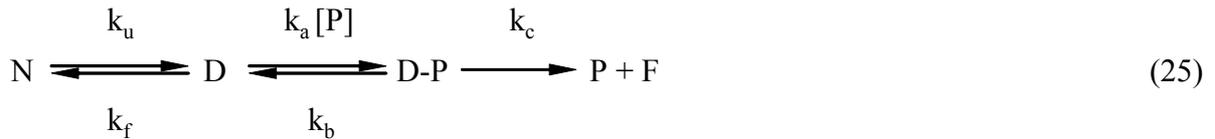
eignet sich vor allem die Methode der limitierten Proteolyse zur Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeiten (Imoto et al. 1986; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997; 2001), die in dieser Arbeit angewandt wurde.

2.1.1.3. Methode der limitierten Proteolyse zur Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeiten

Mittels limitierter Proteolyse wird die proteolytische Zugänglichkeit primärer Spaltstellen detektiert. Dabei hängt die proteolytische Zugänglichkeit unmittelbar von der Flexibilität der die primäre Schnittstelle umgebenden Region ab (Fontana et al. 1986; Hubbard 1998). Während auf Grund der hohen Rigidität ein proteolytischer Abbau des nativen Proteins nicht oder nur über eine bzw. wenige primäre Schnittstellen erfolgt, steigt durch Zunahme der Flexibilität die Anzahl der primären Spaltstellen im denaturierten Protein stark an. Dies hat zur Folge, dass Proteine im nativen Zustand oft resistent gegenüber Proteasen sind, jedoch nach Denaturierung schnell proteolytisch zu Fragmenten (F) abgebaut werden. Durch die Denaturierung eines Proteins in Gegenwart einer Protease (P) wird die Entfaltung irreversibel gestaltet (24), wobei k_p die Geschwindigkeitskonstante des proteolytischen Abbaus darstellt.



Unter der Voraussetzung, dass das native Protein nicht durch die verwendete Protease abgebaut wird, die Protease das Protein im denaturierten Zustand unabhängig seiner Heterogenität abbaut, die Substratspezifität der Protease nicht den Abbau des zu untersuchenden Proteins limitiert und die Protease stabil genug ist, so dass sie während des gesamten Zeitraums der Untersuchung eine konstante Aktivität aufweist, ist die Bestimmung von k_u mittels limitierter Proteolyse möglich (Imoto et al. 1986). Zur genauen Beschreibung des Systems muss das in (24) dargestellte Schema auf die Bindung des Substrats und seiner katalytischen Umsetzung erweitert werden (25), wobei D-P der Enzym-Substrat-Komplex ist und k_a , k_b und k_c die Geschwindigkeitskonstanten der Substratbindung, -dissoziation und -spaltung der katalysierten Reaktion sind.



Unter steady-state-Bedingungen ($d[D]/dt = 0$ und $d[D-P]/dt = 0$) ergibt sich für die Geschwindigkeit des proteolytischen Abbaus von N Gleichung (26) (Imoto et al. 1986).

$$-dN/dt = k_c \cdot [D-P] = \frac{(k_u/k_f) \cdot k_c \cdot [P] \cdot [N]}{(k_b + k_c)/k_a + (k_c/k_f) \cdot [P]} \quad (26)$$

Die Bestimmung des intakten Proteins ($[N] + [D]$) als Funktion der Zeit ist durch Abstoppen des proteolytischen Abbaus nach verschiedenen Zeitintervallen und anschließendem Trennen des Protein-Fragment-Gemisches mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) oder Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) möglich. Unter schwach denaturierenden Bedingungen und bei hohen Proteasekonzentrationen entspricht die freie Proteasekonzentration $[P]$ der eingesetzten Konzentration $[P]_0$ und die Konzentration des intakten Proteins der Konzentration $[N]$, da $[D]$ und $[D-P]$ sehr klein sind. Aus der Abnahme der durch densitometrische Evaluierung der SDS-PAGE-Gele bzw. aus HPLC-Chromatogrammen ermittelten Peakfläche der Bande/des Peaks des intakten Proteins als Funktion der Zeit können die Geschwindigkeitskonstanten der Proteolyse k_p nach

$$A_t = A_0 \cdot \exp(-k_p \cdot t) \quad (27)$$

bestimmt werden (Abb. 4). Hierbei entspricht A_t der Peakfläche zur Zeit t und A_0 der Peakfläche zur Zeit $t = 0$.

Durch Bestimmung der k_p -Werte als Funktion der Proteasekonzentration $[P]_0$ lassen sich aus Gleichung (28) k_u -Werte für die jeweiligen Bedingungen ermitteln.

$$k_p = \frac{k_u \cdot [P]_0}{B + [P]_0} \quad \text{mit} \quad B = \frac{(k_b + k_c) \cdot k_f}{k_a \cdot k_c} \quad (28)$$

Dabei ist B eine für jedes Protein-Protease-System spezifische Konstante unter den jeweiligen Denaturierungsbedingungen. Mit steigender Proteasekonzentration $[P]_0$ steigt k_p entsprechend einer hyperbolen Funktion und erreicht bei unendlich hoher Proteasekonzentration die Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung des Proteins k_u , d.h. unter entfaltungslimitierenden Bedingungen ($k_p \gg k_u$) folgt die Abnahme von N einer Reaktion pseudo-1. Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante k_u .

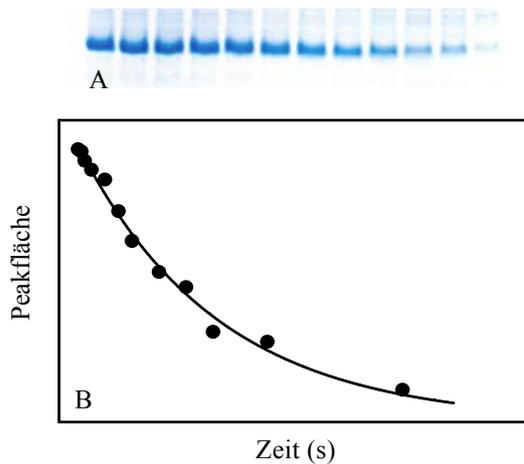


Abb. 4: Exemplarische Darstellung des Zeitverlaufs des proteolytischen Abbaus von RNase A, demonstriert am Beispiel eigener Daten.

A) Bande der intakten RNase A im SDS-PAGE-Gel, B) dazugehörige Peakfläche der intakten RNase A angepasst mittels Gleichung (27).

Die Auswahl der Protease sollte nach ihrer Stabilität unter den experimentellen Bedingungen, der Substratspezifität und nach der Proteolyseempfindlichkeit des nativen Proteins erfolgen. Der Einsatz von Proteasen verschiedener Substratspezifitäten kann die erhaltenen Ergebnisse verifizieren bzw. zu einem besseren Verstehen des Entfaltungsprozesses führen. Letzteres wäre der Fall, wenn die verwendeten Proteasen in verschiedenen Regionen des Zielproteins angreifen, wodurch man die Möglichkeit erhält, diese separat während der Entfaltung zu beobachten.

2.1.2. Das Modell der Entfaltungsregion

Untersuchungen immobilisierter Proteine zeigten, dass die Immobilisierung oft zur Stabilisierung des Proteins führte (Ulbrich et al. 1986; Schellenberger and Ulbrich 1989; Ulbrich-Hofmann et al. 1993). Während die thermische Inaktivierung der löslichen Enzyme einer Reaktion 1. Ordnung folgte, wurden die immobilisierten Enzyme, wenn sie eine Stabilisierung zeigten, nach einer doppelt-exponentiellen Funktion inaktiviert. Dabei entsprach die eine Geschwindigkeitskonstante der des löslichen Enzyms, wohingegen die zweite Geschwindigkeitskonstante deutlich kleiner war. Diese zweiphasige Inaktivierung

konnte auf zwei Enzymspezies zurückgeführt werden, die sich in ihrer Stabilität, aber nicht in den katalytischen Eigenschaften unterschieden und ein Ergebnis der Immobilisierung waren (Ulbrich-Hofmann et al. 1993; Ulbrich-Hofmann et al. 1995). Diese Ergebnisse führten zu einem Modell, nach dem die Entfaltung eines Proteins unter denaturierenden Bedingungen an einer definierten Region des Moleküls beginnt, der so genannten Entfaltungsregion. Durch eine unspezifische Immobilisierung kann diese Region bei einem Teil der Proteine fixiert werden, was zu einer Stabilisierung führt, während die Moleküle, deren Entfaltungsregion nicht in die Immobilisierung involviert ist, keine Stabilisierung aufweisen. Daher ist die Stabilisierung eines Proteins abhängig von der Position der Modifizierung und sollte am erfolgreichsten sein, wenn die labilste Region des Moleküls stabilisiert wird (Ulbrich-Hofmann et al. 1999).

Diese Untersuchungen zur Entfaltungsregion wurden durch Studien zur thermischen Denaturierung von RNase A und ihrer glykosylierten Form, der RNase B, fortgeführt (Arnold et al. 1996; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997; Arnold et al. 1998; 1999). Für beide Enzyme, die hinsichtlich ihrer Proteinkomponente identisch sind, wurde durch Untersuchungen mittels limitierter Proteolyse die Region zwischen Lys31 und Phe46 als die erste für Thermolysin und Trypsin zugängliche Region während der Entfaltung identifiziert (Arnold et al. 1996; Arnold et al. 1998). Dabei wurde für RNase B, die eben in dieser Entfaltungsregion einen N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratrest trägt (Asn34), sowohl eine höhere kinetische als auch thermodynamische Stabilität nachgewiesen (Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997; Pfeil 2002). Durch Modifizierung des Kohlenhydratrests konnte die Stabilisierung von RNase B auf den ersten Kohlenhydratrest zurückgeführt werden (Arnold et al. 1999).

Weitere Studien wurden an einer neutralen Protease des Thermolysintyps durchgeführt, für die durch Mutationsstudien eine Oberflächenregion in der N-terminalen Domäne als kritisch für die thermische Stabilität identifiziert wurde, während andere Regionen weniger entscheidend waren (Vriend and Eijsink 1993; Eijsink et al. 1995). Durch Einführung einer Disulfidbindung in dieser Region konnte die thermische Stabilität drastisch erhöht werden (Mansfeld et al. 1997). Weitere Studien wurden an ortsspezifisch kovalent immobilisierten Enzymen durchgeführt. Hierzu wurden in verschiedenen Regionen mittels ortsgerechter Mutagenese Cysteine eingeführt, wodurch eine ortsspezifische Immobilisierung über den jeweiligen Cysteinrest möglich wurde. Auch hier konnte für die Enzyme, die an der für die thermische Stabilität kritischen Region immobilisiert wurden, die größte Stabilisierung beobachtet werden (Mansfeld et al. 1999).

Neben diesen Studien wurden auch durch andere Untersuchungen Befunde für die Existenz solcher labilen Regionen erhalten. Björk und Pol (1992) konnten für die Denaturierung von Cystatin ein Intermediat identifizieren, in welchem eine Region mit geringerer Stabilität entfaltet ist. Siddiqui et al. (1993) postulierten für die thermische Denaturierung von *Arthrobacter* D-Xylose-Isomerase eine *weak region*, deren Entfaltung die Entfaltung des Gesamtmoleküls initiiert. Yamada et al. (1993) und Motoshima et al. (1996) postulierten auf Grund von Untersuchungen zur Stabilisierung von Lysozym, dass für die kinetische Stabilisierung eines Proteins die Stabilisierung der im Übergangszustand am stärksten entfalteten Region essentiell ist. Gokhale et al. (1996) identifizierten eine *fragile region* für das dimere Enzym Thymidylatsynthase.

Durch Lokalisierung und gezielte Modifizierung solcher Entfaltungsregionen in Proteinen sollte eine Stabilisierung des Gesamtmoleküls ermöglicht werden. Zur Identifizierung solcher Regionen benötigt man Methoden, die Entfaltungsprozesse auf der molekularen Ebene verfolgen können. Somit sind vor allem die Methode des H/D Austauschs gekoppelt mit der NMR-Spektroskopie (Baldwin 1993; Woodward 1994; Raschke and Marqusee 1998; Huyghues-Despointes et al. 1999), das unspezifische Markieren von Oberflächenbereichen (Matheson and Scheraga 1979) und die Methode der limitierten Proteolyse (Price and Johnson 1990) geeignet.

2.2. TFE als Denaturans - Eigenschaften und Wirkung

Die Untersuchung der Wirkung von TFE auf die Struktur von Peptiden und Proteinen begann bereits vor mehr als 3 Jahrzehnten (Buck 1998). Die ersten Studien zum Effekt von TFE auf Peptide wurden bereits in den 60er Jahren und auf Proteine Anfang der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts durchgeführt. Zu Beginn war TFE einer unter vielen Alkoholen, die als Lösungsmittel zur Denaturierung von Proteinen und zur Stabilisierung von Strukturen in Peptiden genutzt wurden. Auf Grund der gegenüber anderen kurzkettigen aliphatischen Alkoholen besonders stark ausgeprägten Eigenschaft, helikale Strukturen in Peptiden und Proteinen zu induzieren (Buck 1998), rückte vor allem seit den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts TFE in den Mittelpunkt der Untersuchungen, was sich in zahlreichen Publikationen widerspiegelt. Erste Studien beschränkten sich auf die Untersuchung der stabilisierten Strukturen in Peptiden und Proteinen und auf die physikochemische Wirkungsweise, durch welche TFE die Konformation der Polypeptide beeinflusst (Galat 1985; Nelson and Kallenbach 1986; Jiménez et al. 1987; Lehrman et al. 1990; Segawa et al.

1991; Sönnichsen et al. 1992; Storrs et al. 1992; Buck et al. 1993; Alexandrescu et al. 1994; Shiraki et al. 1995; Rajan and Balaram 1996; Luo and Baldwin 1997). Relativ neu sind Untersuchungen des Effekts von TFE auf Ent- und Rückfaltungskinetiken von Proteinen (Lu et al. 1997; Kentsis and Sosnick 1998; Chiti et al. 1999a; Main and Jackson 1999; Zerovnik et al. 1999; Hamada et al. 2000; Huang et al. 2001). Neben diesen Untersuchungen wurden auch Studien zum Einfluss von TFE bei der *in vitro* Induktion amyloider Strukturen in Proteinen (Chiti et al. 1999b) und auf die Struktur von Nukleinsäuren (Kypr et al. 1999) durchgeführt sowie die Eignung von TFE als Membranmimetikum untersucht (Chaloin et al. 1997; Fregeau Gallagher et al. 1997).

2.2.1. Wirkungsweise von TFE

Der exakte Mechanismus, wie TFE auf Peptide und Proteine wirkt, ist noch unklar. Jedoch gibt es auf Grund zahlreicher Untersuchungen und Modellierungen Vorstellungen über die Wirkungsweise von TFE, die 1. auf eine Stabilisierung von internen Wasserstoffbrückenbindungen im Polypeptid, 2. auf die Wechselwirkung mit hydrophoben Aminosäureseitenketten und 3. auf die Wirkung als Osmolyt durch Veränderung der Wasserstruktur und der damit verbundenen Desolvatisierung von Proteinen zurückzuführen ist (Buck 1998).

1. Effekt auf die Wasserstoffbrückenbindungen: TFE ist ein besserer Protonen- bzw. Wasserstoffbrückenbindungsdonor, aber ein schwächerer Akzeptor als Wasser (Nelson and Kallenbach 1986; Rajan and Balaram 1996; Buck 1998). Daher wurde angenommen, dass TFE vorwiegend Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Carbonylsauerstoff der Peptidbindung eingeht, welche im Gegensatz zur Amidgruppe in der Lage ist, zwei Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen. Durch das Binden von TFE-Molekülen, welche ca. 9 mal größer sind als Wassermoleküle (van Buuren and Berendsen 1993), wird Wasser, welches auf Grund seiner ähnlichen H-Bindungs-Donor- und Akzeptoreigenschaften durch Binden an die Amidgruppe die intramolekularen H-Bindungen schwächt, vom Peptidrückgrat verdrängt, was zur Stärkung der H-Bindungen im Peptid bzw. Protein führt (Rajan and Balaram 1996). Diese Annahme wird durch experimentelle Befunde der NMR-Spektroskopie (Llinás and Klein 1975) und auch durch Simulationsstudien (De Loof et al. 1992; Brooks 1993; Guo and Karplus 1994) gestützt. Auch Untersuchungen an der Modellverbindung *o*-Salicylsäure konnten eine Stärkung der intramolekularen H-Bindung zwischen der Carboxyl- und der Hydroxylgruppe in TFE zeigen (Luo and Baldwin 1997). Jedoch ist nicht klar, ob das

vorgeschlagene Modell, welches eine direkte Bindung des Lösungsmittels an das Polypeptid einschließt, durch thermodynamische Daten unterstützt wird (Walgers et al. 1998). Indirekte Effekte auf die H-Bindungseigenschaften könnten durch die unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten von TFE und Wasser verursacht sein. So wird die Dielektrizitätskonstante von 79 (Wasser) auf 27 in reinem TFE (25°C) gesenkt (Llinás and Klein 1975), wodurch elektrostatische Wechselwirkungen gestärkt werden.

2. Effekt auf hydrophobe Interaktionen: Untersuchungen durch NMR-Spektroskopie (Yang et al. 1993) und Neutronenbeugung (Lehmann et al. 1985) zeigten, dass TFE mit der Proteinoberfläche (vorwiegend mit hydrophoben Seitenketten) interagiert und in das Innere des Moleküls eindringt, was auf die hydrophobe Natur der CF₃-Gruppe zurückzuführen ist. So konnte der Effekt, der zur Denaturierung von Proteinen in TFE führt, hauptsächlich auf die Schwächung von hydrophoben Interaktionen und nur wenig auf die Erhöhung von lokalen Helixinteraktionen zurückgeführt werden (Thomas and Dill 1993).

3. Effekt auf die Struktur des Lösungsmittels und der Solvatisierung des Polypeptids: Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass die Struktur des Wassers durch Alkohole beeinflusst wird (Kovrigin and Potekhin 1997; Westh and Koga 1997). Erst kürzlich wurde ein indirekter Mechanismus zur Stabilisierung von helikalen Strukturen vorgeschlagen, in welchem die Stabilisierung eines kompakten Zustands durch die Veränderung der Wasserhülle der Polypeptidkette erfolgt (Walgers et al. 1998), womit ein vorteilhafter entropischer und ein unvorteilhafter enthalpischer Beitrag für die freie Enthalpie der Helixbildung verbunden ist. Diese Annahme werden durch Faltungsstudien in TFE unterstützt (Kentsis and Sosnick 1998). Durch Untersuchungen mittels Lichtstreuung in TFE/Wasser-Gemischen (Gast et al. 1999) wurden ähnliche Ergebnisse wie für *tert*-Butylalkohol mittels Lichtstreuung (Iwasaki and Fujiyama 1977) und Hexafluorisopropanol mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (Kuprin et al. 1995) erhalten. Diese Lösungsmittel bilden in wässrigen Lösungen abhängig von der Konzentration Cluster. Aus den Ergebnissen der Lichtstreuungsuntersuchungen (Gast et al. 1999) wurde geschlossen, dass TFE in geringen Konzentrationen (bis ca. 20 %, v/v) Cluster mit 18 Molekülen Wasser bildet ((H₂O)₁₈TFE). In TFE-Konzentrationen über 20 % (v/v) ist das gesamte Wasser durch TFE gebunden und es kommt zur Bildung größerer Cluster, die in ≥ 50 % TFE wieder in kleinere Cluster zerfallen. Diese Ergebnisse werden durch NMR-Studien (Hong et al. 1999) und theoretische Analysen (Chitra and Smith 2002) unterstützt und stehen im Einklang mit Untersuchungen von Luo und Baldwin (1997), welche in Peptiden eine lineare Abhängigkeit der Helixbildung von der TFE-Konzentration bis 25 % TFE (v/v) mit anschließendem Plateau

fanden. So könnte die durch TFE verursachte Dehydratisierung des Polypeptidrückgrates die Ursache für eine indirekte Stabilisierung von intramolekularen H-Bindungen sein, die zur Induktion helikaler Strukturen führt (Walgers et al. 1998).

Insgesamt resultiert der Effekt von TFE auf die Struktur von Peptiden und Proteinen aus verschiedenen Mechanismen, deren Ergebnis von den jeweiligen Bedingungen und dem zu untersuchenden Protein abhängig ist. Alle Mechanismen führen jedoch zu einer Destabilisierung von Wechselwirkungen, die sich über einen weiten Bereich der Polypeptidkette erstrecken, wohingegen lokale Wechselwirkungen (wie in helikalen Strukturen und β -turns) stabilisiert werden. Vergleicht man verschiedene Alkohole hinsichtlich ihrer Wirkung, helikale Strukturen zu induzieren, ergibt sich folgende steigende Effektivität: Methanol < Ethanol < Isopropanol < TFE < Hexafluorisopropanol (Hirota et al. 1997).

2.2.2. Untersuchungen der Struktur und Faltung von Proteinen in TFE

Neben den frühzeitigen Studien von Peptiden rückte vor allem in den 90er Jahren die Untersuchung des Effekts von TFE auf die Struktur und Faltung von Proteinen in den Mittelpunkt des Interesses. Hierbei stellten vor allem die Studien an Hühnereiweiß-Lysozym (Galat 1985; Segawa et al. 1991; Buck et al. 1993; Buck et al. 1995; 1996; Hoshino et al. 1997; Lu et al. 1997) und β -Lactoglobulin (Shiraki et al. 1995; Hamada and Goto 1997; Hirota et al. 1997) Meilensteine in der Untersuchung der Proteinstruktur in TFE dar. Neben diesen Modellproteinen wurden die Untersuchungen bald auf andere Proteine wie z.B. α -Lactalbumin (Alexandrescu et al. 1994; Polverino de Laureto et al. 1995; Gast et al. 1999), Cytochrom c (Fontana et al. 1995; Konno 1998; Grandori 2002), Stefin A und Stefin B (Zerovnik et al. 1998; Zerovnik et al. 1999), Myoglobin (Luo and Baldwin 1998), RNase A (Polverino de Laureto et al. 1997; Gast et al. 1999; Sivaraman et al. 1999), Acylphosphatase (Chiti et al. 1999a; Chiti et al. 1999b) und viele andere ausgedehnt. Anfänglich beschäftigte man sich vorwiegend mit der Charakterisierung des TFE-denaturierten Zustands mittels Gleichgewichtsuntersuchungen. Bei diesen Untersuchungen konnte mit zunehmender TFE-Konzentration eine Zerstörung der Tertiärstruktur beobachtet werden (Buck 1998), die zu einem meist helikalen denaturierten Zustand, dem TFE-denaturierten Zustand, führte, welcher Ähnlichkeiten zum *molten globule* Zustand besitzt (Buck et al. 1993). Der TFE-denaturierte Zustand ist durch das Fehlen von Wechselwirkungen, die sich über weite Bereiche der Polypeptidkette erstrecken (hydrophobe Interaktionen, H-Bindungen in β -Faltblattstrukturen)

und durch das Vorhandensein lokaler Wechselwirkungen (vorwiegend H-Bindungen) charakterisiert, die zur Stabilisierung und Induktion helikaler (Buck et al. 1993; Alexandrescu et al. 1994; Buck et al. 1995; Shiraki et al. 1995) und β -Haarnadel-Strukturen (Blanco et al. 1992) führen, wohingegen β -Faltblattstrukturen meist zerstört werden. So durchlaufen die meisten β - und α -/ β - Proteine einen Übergang vom β -Faltblatt zu helikalen Strukturen, wobei die Regionen, die bereits unter nativen Bedingungen helikale Strukturen ausbilden, stabiler als die induzierten nicht-nativen helikalen Strukturen sind (Buck et al. 1995; 1996). Entgegen dieser allgemeinen Tendenz wurde auch der Erhalt nativ-ähnlicher β -Faltblattstrukturen im TFE-denaturierten Zustand von Proteinen nachgewiesen (Schönbrunner et al. 1996). Während in Peptiden und denaturierten Proteinen (reduziertes Hühnereiweiß-Lysozym, Ratnaprabha and Sasidhar 1998; reduzierte RNase A, Sivaraman et al. 1999) bereits durch niedrige TFE-Konzentrationen helikale Strukturen induziert werden, wurde eine Helixinduktion in nativen Proteinen erst nach Zerstörung der Tertiärstruktur in höheren Konzentrationen beobachtet (Buck 1998). Die Stabilisierung von Faltungsintermediaten durch TFE wurde durch Luo und Baldwin (1998) beschrieben. Neben der Stabilisierung und Induktion von intramolekularen Strukturen können auch intermolekulare Wechselwirkungen von Proteinen in TFE auftreten (intermolekulare β -Faltblätter, Dong et al. 1998), die Ausgangspunkt für die Bildung amyloider Strukturen (Chiti et al. 1999b) bzw. Aggregationen (Narhi et al. 1996; Chiti et al. 1999a; Huang et al. 2001; Srinivas et al. 2002) sein können.

Neben diesen Studien wurde auch der Effekt von TFE auf die Faltung von Proteinen untersucht. Lu et al. (1997) konnten zeigen, dass unter gleichen Endbedingungen die Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung aus TFE identisch mit denen der Rückfaltung aus GdnHCl sind. So hat der TFE-denaturierte Zustand mit seinem hohen Anteil an helikalen Strukturen keinen Einfluss auf die Rückfaltungsgeschwindigkeit, was auf die im Vergleich zur Faltungsreaktion wesentlich schnellere Zerstörung der induzierten Strukturen durch die Verdünnung des TFE zurückgeführt wurde. Dagegen hat jedoch die TFE-Konzentration im Rückfaltungsansatz einen bedeutenden Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung. So wurde für verschiedene Proteine im Gegensatz zu anderen Denaturanzien wie GdnHCl und Harnstoff in gewissen Grenzen eine Beschleunigung der Rückfaltungsgeschwindigkeit mit steigenden TFE-Konzentrationen beobachtet (Lu et al. 1997; Kentsis and Sosnick 1998; Chiti et al. 1999a; Main and Jackson 1999; Zerovnik et al. 1999; Hamada et al. 2000). Die Rückfaltungsgeschwindigkeit erreicht ein Maximum bei einer für das jeweilige Protein optimalen TFE-Konzentration (5 – 20 %, v/v) und fällt nach Überschreiten dieser optimalen Konzentration wieder ab (Hamada et al. 2000). Die Ursachen

für eine Beschleunigung der Proteinfaltung wurden kontrovers in der Literatur diskutiert. So wurde die Beschleunigung der Rückfaltung von Hühnereiweiß-Lysozym in Gegenwart von geringen TFE-Konzentrationen auf die Stabilisierung nativ-ähnlicher Wechselwirkungen zurückgeführt (Lu et al. 1997). Da die Struktur des Übergangszustands ähnlich zu den durch TFE stabilisierten Strukturen sein sollte, wurde eine im Vergleich zum denaturierten Zustand auftretende Stabilisierung des Übergangszustands, die zur Beschleunigung der Faltungsreaktion führt, geschlussfolgert (Buck 1998). Die Umwandlung eines Zweizustandssystems in ein Multizustandssystem wurde für die Rückfaltung von Acylphosphatase in TFE beobachtet (Chiti et al. 1999a). Hier wurde die Stabilisierung eines Intermediats, in welchem bereits native Helices ausgebildet sind, für die beschleunigte Faltung in Gegenwart geringer TFE-Konzentrationen verantwortlich gemacht. Die Rückfaltungsgeschwindigkeit erreicht dabei ihr Maximum bei einer TFE-Konzentration, bei der der Sekundärstrukturgehalt des denaturierten Zustands dem des nativen Zustands entspricht. Hamada et al. (2000) konnten für verschiedene Proteine, die nach einem Zweizustandsmodell falten, das Ausmaß der Beschleunigung der Rückfaltungsreaktion durch TFE mit der Anzahl von lokalen H-Bindungen des Peptidrückgrates im nativen Zustand korrelieren. Bei all diesen Untersuchungen (Lu et al. 1997; Chiti et al. 1999a; Hamada et al. 2000) wurde die Beschleunigung der Rückfaltungsreaktion in geringen TFE-Konzentrationen auf eine Stabilisierung nativer lokaler Wechselwirkungen (Helices, β -turns), die eine Stabilisierung von Übergangszuständen bzw. Intermediaten nach sich ziehen, zurückgeführt. Im Gegensatz zu diesen Studien kommen Kentsis und Sosnick (1998) und auch Main und Jackson (1999) zu dem Ergebnis, dass die Beschleunigung der Rückfaltung von Proteinen in TFE vorwiegend durch eine Destabilisierung des denaturierten Zustands (im Vergleich zum Übergangszustand) verursacht ist. Diese Destabilisierung wird auf eine Desolvatisierung der Polypeptidkette zurückgeführt, wodurch die Beschleunigung der Rückfaltungsreaktion durch einen indirekten Mechanismus erfolgt (Walgers et al. 1998).

Die Geschwindigkeit der Rückfaltung von Proteinen in Gegenwart von TFE wird jedoch nicht nur von einer Stabilisierung von nativen helikalen Strukturen bzw. von der Destabilisierung des denaturierten Zustands geprägt, sondern steht auch im direkten Zusammenhang mit der Destabilisierung von nativen hydrophoben Interaktionen. So konnte für alle Proteine eine Abnahme der Faltungsgeschwindigkeit oberhalb der optimalen TFE-Konzentration beobachtet werden. Diese Abnahme der Faltungsgeschwindigkeit sollte vorwiegend durch die Störung hydrophober Interaktionen als durch die Induktion nicht-nativer helikaler Strukturen verursacht sein (Thomas and Dill 1993).

2.3. *RNase A aus Rinderpankreas als Modellprotein*

Das reichliche Vorhandensein von Rinderpankreas und der dort enthaltenen hohen Ribonukleaseaktivität führte zur frühzeitigen Entdeckung der RNasen (Jones 1920). Durch die leichte Gewinnung in großen Mengen sowie ihre hohe Stabilität und die Reversibilität ihrer Denaturierung wurde RNase A Studienobjekt für Forschungen in der Proteinfaltung, der Proteinstabilität, der Enzymologie u.v.m., deren Ergebnisse zu Meilensteinen auf ihrem Gebiet wurden (Raines 1998). Diese historische Rolle von RNase A als Modellprotein wird durch die Verleihung des Nobel-Preises an die 4 Wissenschaftler C. B. Anfinsen, 1972 (Anfinsen 1973), S. Moore und W. S. Stein, 1972 (Moore and Stein 1973) und R. B. Merrifield, 1984 (Merrifield 1986) unterstrichen. So war RNase A das erste Enzym und das dritte Protein nach Insulin (Sanger 1959) und Hämoglobin (Braunitzer et al. 1961) für welches die korrekte Aminosäuresequenz bekannt war (Hirs et al. 1960; Smyth et al. 1963). Sie war das dritte Enzym bzw. fünfte Protein (nach Myoglobin, Kendrew 1963; Hämoglobin, Perutz 1963; Lysozym, Blake et al. 1965; Carboxypeptidase A, Lipscomb et al. 1966) für welches die dreidimensionale Struktur durch Röntgenkristallstrukturanalyse bestimmt wurde (Kartha 1967). Letztlich wurde die Nutzung der NMR-Spektroskopie zur Bestimmung der Proteinstruktur (Saunders et al. 1957) und von Proteinfaltungswegen (Udgaonkar and Baldwin 1988) mit RNase A entwickelt. Auch heute noch ist RNase A Objekt zahlreicher Untersuchungen, was durch eine große Anzahl an Fachartikeln belegt wird.

2.3.1. **Struktur und Funktion von RNase A**

RNase A (EC 3.1.27.5) ist ein kleines Protein, welches aus einer 124 Aminosäure langen durchgehenden Polypeptidkette besteht (Smyth et al. 1963) (Abb. 5). Das aus 3 α -Helices und verschiedenen β -Faltblattstrukturen aufgebaute Proteinmolekül ist durch 4 Disulfidbindungen verbrückt (Wlodawer et al. 1982) (Abb. 6), die für die Stabilität essentiell sind (Shimotakahara et al. 1997; Klink et al. 2000). RNase A enthält im nativen Zustand zwei *cis*-Proline (in den Positionen 93 und 114) und zwei *trans*-Proline (in den Positionen 42 und 117). RNase A enthält 6 Tyrosine (in den Positionen 25, 73, 76, 92, 97, und 115), aber keine Tryptophane.

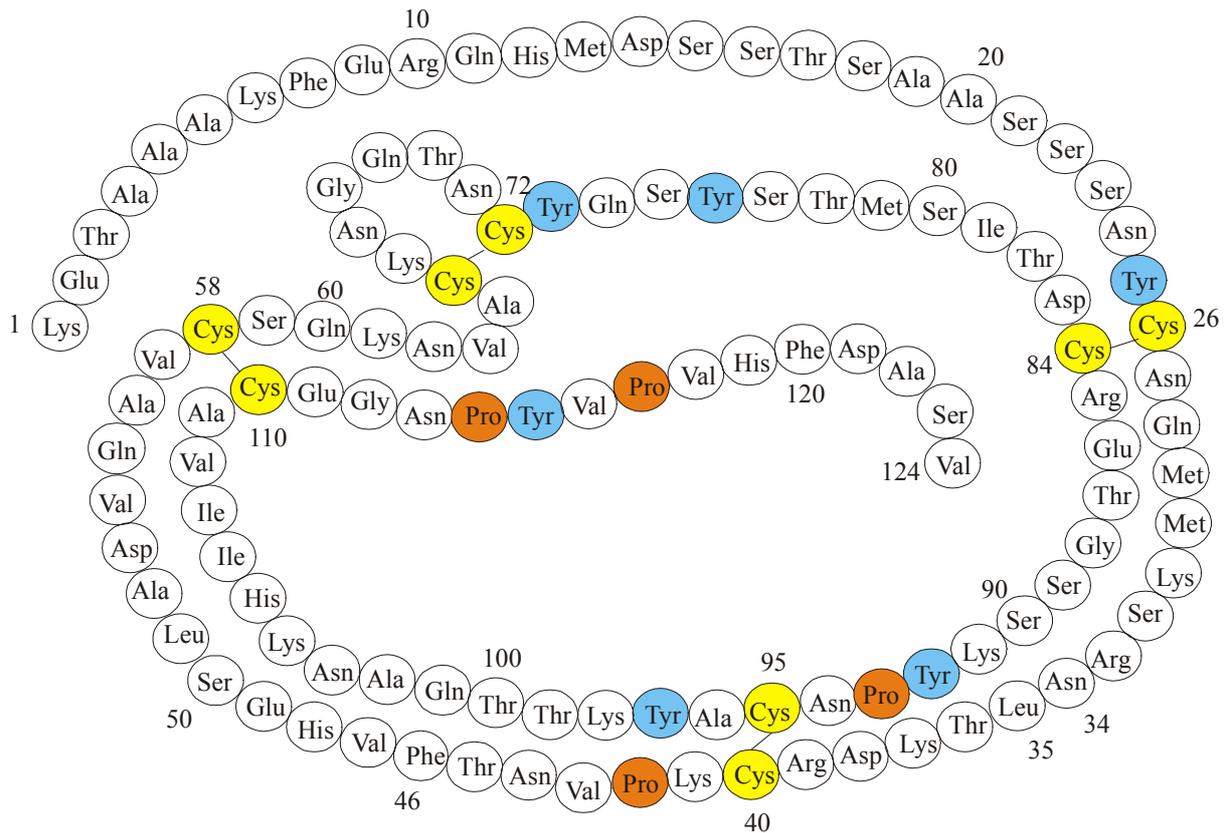


Abb. 5: Aminosäuresequenz von RNase A nach Smyth et al. (Smyth et al. 1963).

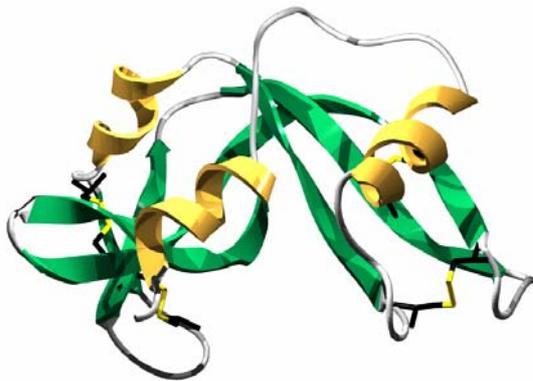


Abb. 6: Tertiärstruktur von RNase A.

Das Modell wurde der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm SwissPDBViewer erstellt. α -Helices und β -Faltblätter sind als Bänder dargestellt.

Neben RNase A gibt es im Rinderpankreas noch weitere RNasen, die hinsichtlich ihrer Proteinkomponente identisch zu RNase A sind (Wlodawer et al. 1982; Williams et al. 1987) und sich nur in einem an der Seitenkette des Asn34 N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratrests unterscheiden. RNase B, die Hauptform der glykosylierten Spezies, ist ein Gemisch aus verschiedenen glykosylierten Formen, in welchen ein Kohlenhydratrest bestehend aus 2 *N*-Acetylglucosamin- und 5 - 9 Mannoseresten mit der Seitenkette des Asn34

verknüpft ist (Plummer and Hirs 1963; Liang et al. 1980; Rudd et al. 1992; Fu et al. 1994). Neben dieser Hauptform existieren noch RNase C und RNase D, die eine noch heterogenere Glykosylierung an Position 34 besitzen (Plummer 1968) und nur in geringsten Mengen vorkommen.

RNase A gehört zu der Gruppe der Endonukleasen und bevorzugt die Spaltung einzelsträngiger Ribonukleinsäuren mit Pyrimidinbasen in P₁-Position (delCardayré and Raines 1994; Cuchillo et al. 1997; Raines 1998), wobei die Affinität zu Cytidin größer als zu Uridin ist (delCardayré and Raines 1995). Bei der Phosphodiestererspaltung entstehen im 1. Schritt, der Transphosphorylierung, ein Oligonukleotid mit einem freien 5'-Ende und ein Oligonukleotid mit einem 2',3'-zyklischen Phosphat am 3'-Ende (Cuchillo et al. 1997; Raines 1998) (Abb. 7A). Der 2',3'-zyklische Phosphodiester wird unter Spaltung der 2'-Phosphatbindung in einem separaten 2. Schritt hydrolysiert (Cuchillo et al. 1993; Raines 1998) (Abb. 7B). Der Hydrolyseschritt erfolgt aber auf Grund der geringen Affinität des 2',3'-zyklischen Phosphodiesters deutlich langsamer, wodurch dieser während der Spaltung von Ribonukleinsäuren angereichert wird (Cuchillo et al. 1993; Cuchillo et al. 2002).

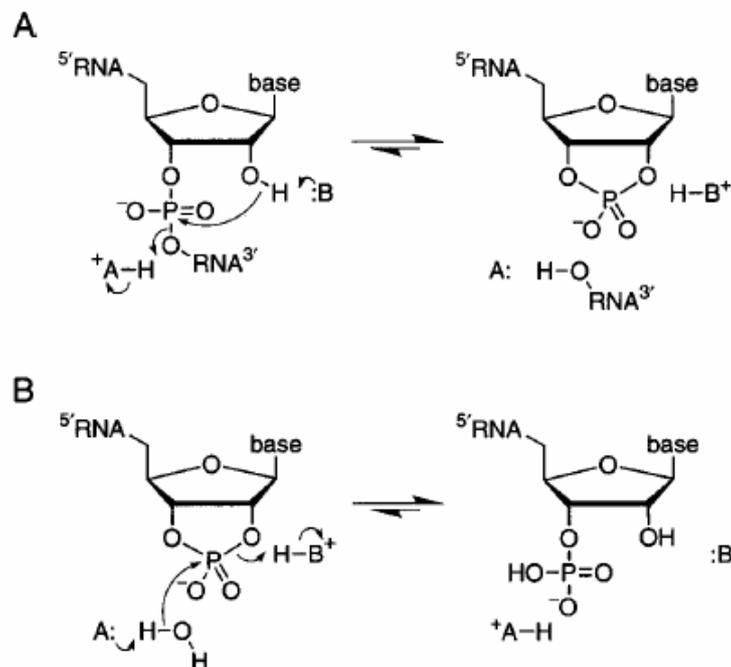


Abb. 7: Mechanismus der RNase A katalysierten Transphosphorylierung (A) und der Hydrolyse Reaktion (B).

In beiden Reaktionsschritten repräsentieren „B“ His12 und „A“ His119 der RNase A. Abbildung entnommen aus Raines (1998).

Das aktive Zentrum von RNase A besteht aus den Aminosäuren Gln11, His12, Lys41, His119 und Asp121 (Raines 1998) (Abb. 8A), wobei His12 und His119 die katalytische Diade bilden. Neben dem aktiven Zentrum, der P₁-Bindungsstelle, besitzt RNase A weitere Bindungsstellen, um den RNA-Strang zu binden (Raines 1998) (Abb. 8B).

A

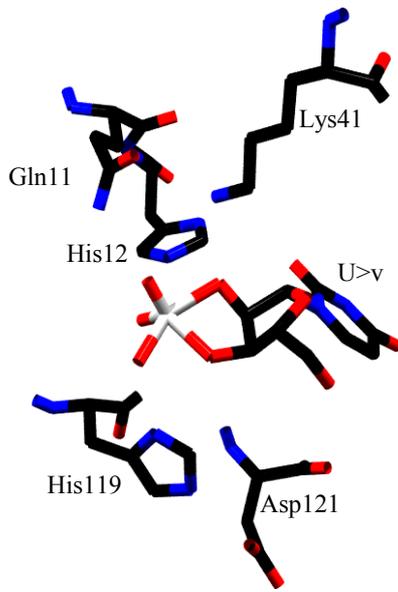
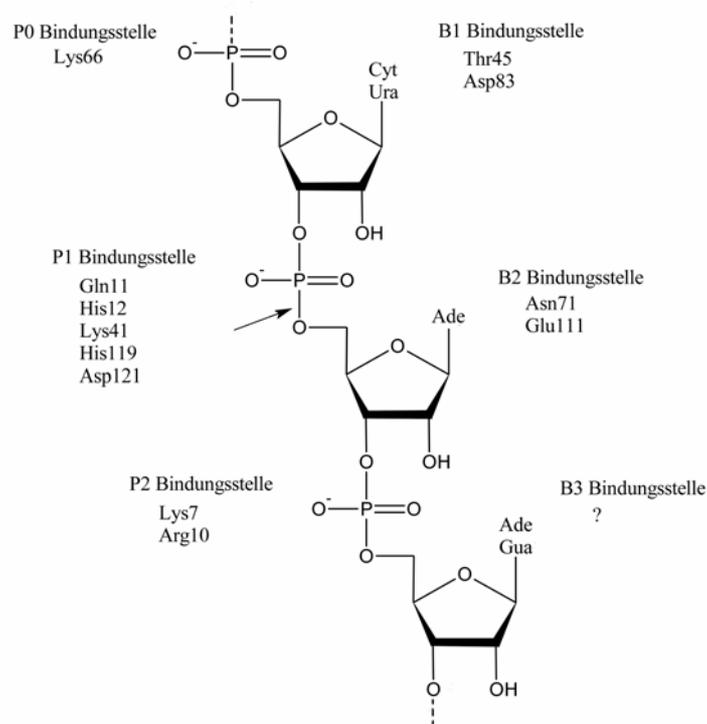


Abb. 8: (A) Kristallstruktur des aktiven Zentrums von RNase A mit einem gebundenen 2',3'-zyklischen Uridinmonovanadat (U>v) und (B) Interaktionen zwischen den Bindungsstellen in RNase A und einem gebundenen RNA-Molekül nach Raines (1998).

Die in (B) aufgeführten Aminosäurereste sind bei der Substratbindung bzw. bei der Katalyse beteiligt. „P“ symbolisiert die Bindungsstelle der Phosphatgruppe, „B“ die Bindungsstelle der Base. Der Pfeil zeigt die Spaltstelle.

B



2.3.2. Stabilität und Faltung von RNase A

Zur Charakterisierung von RNase A standen anfangs die Nutzung von einfachen spektroskopischen Methoden (Sela and Anfinsen 1957; Hermans and Scheraga 1961) und die Verwendung von Proteasen (Richards and Vithayathil 1959; Ooi et al. 1963; Rupley and Scheraga 1963; Klee 1967; Winchester et al. 1970) im Vordergrund. In den folgenden Jahren wurden neu entwickelte Techniken in die Untersuchungen einbezogen. So wurde die Veränderung der Proteinstruktur durch C²-His NMR-Spektroskopie (Benz and Roberts 1973; Westmoreland and Matthews 1973), Laser-Raman-Spektroskopie (Chen and Lord 1976), ¹³C-NMR-Spektroskopie (Howarth 1979), CD-Spektroskopie (Labhardt 1982), H/D Austauschstudien mit NMR-Spektroskopie (Robertson and Baldwin 1991), Röntgenkleinwinkelstreuung (Sosnick and Trehwella 1992), Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (Takeda et al. 1995a; b), Energietransfermessungen (Buckler et al. 1995) und dynamische Lichtstreuung (Nöppert et al. 1996) untersucht. Die Aufklärung der Kristallstruktur (Kartha 1967; Wlodawer et al. 1982) sowie die Zuordnung der ¹H-NMR-Signale (Rico et al. 1989; Robertson et al. 1989) und die dadurch mögliche Bestimmung der Proteinstruktur in Lösung (Santoro et al. 1993) ermöglichten neben globalen Untersuchungen die Charakterisierung des Proteins auf lokaler Strukturebene. Hier gewannen vor allem Untersuchungen mittels H/D-Austausch an Bedeutung (Udgaonkar and Baldwin 1990; Robertson and Baldwin 1991; Mayo and Baldwin 1993; Kiefhaber and Baldwin 1995; Udgaonkar and Baldwin 1995; Nash et al. 1996; Juneja and Udgaonkar 2002). Als einfach durchzuführende Methode gewann aber auch die Methode der limitierten Proteolyse an Interesse (Lang and Schmid 1986; Teschner and Rudolph 1989; Arnold et al. 1996; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997; Polverino de Laureto et al. 1997; Arnold et al. 1998; 1999; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000; 2001; Köditz et al. 2002).

Auf Grund der ausgeprägten Reversibilität der Entfaltung von RNase A wurde ihre thermodynamische Stabilität in GdnHCl (Schmid and Baldwin 1978b; Pace et al. 1990; Yao and Bolen 1995; Juminaga et al. 1997; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000), in Harnstoff (Pace et al. 1990; Reinstädler et al. 1996; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2001; Ramos and Baldwin 2002), in Abhängigkeit vom pH-Wert (Pace et al. 1990; Juminaga et al. 1997), in TFE (Gast et al. 1999) sowie bei erhöhter Temperatur (Tsong et al. 1971; Garel and Baldwin 1973; Nall and Baldwin 1977; Reinstädler et al. 1996; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997; Juminaga et al. 1997; Pfeil 2002; Ramos and Baldwin 2002) und bei erhöhtem Druck (Takeda et al. 1995a; b; Panick and Winter 2000; Torrent et al. 2001) umfassend untersucht. Diese Untersuchungen wurden ebenso auf durch Mutation des *rnase*-Gens erhaltene

Varianten von RNase A ausgedehnt (Schultz and Baldwin 1992; Dodge and Scheraga 1996; Juminaga et al. 1997; Quirk et al. 1998; Schultz et al. 1998; Klink et al. 2000; Markert et al. 2001).

Neben der Untersuchung des thermodynamischen Gleichgewichts wurden zur Aufklärung des Faltungswegs zahlreiche kinetische Untersuchungen zur Entfaltung und Rückfaltung der disulfidverbrückten RNase A durch unterschiedliche Arbeitsgruppen durchgeführt und in der Literatur diskutiert (Cuchillo et al. 1997; Neira and Rico 1997; Raines 1998; Wedemeyer et al. 2002). Hierbei gehen die heutigen Erkenntnisse vorwiegend auf die Untersuchungen der Arbeitsgruppen um R. L. Baldwin, F. X. Schmid und H. A. Scheraga zurück. Nach Untersuchungen der Arbeitsgruppe um R. L. Baldwin und F. X. Schmid faltet denaturierte RNase A in drei verschiedenen kinetischen Phasen: zwei langsame Rückfaltungsphasen und eine schnelle Rückfaltungsphase (Schmid and Blaschek 1981). Die langsamen Rückfaltungsphasen sind nur unter stark nativen Bedingungen bei niedrigen Temperaturen auflösbar (Nall et al. 1978; Cook et al. 1979; Schmid and Blaschek 1981). Alle drei Phasen werden auf das Vorhandensein verschieden entfalteter Spezies zurückgeführt: U_f (fast), U_s^I (slow) und U_s^{II} mit einem Anteil von ca. 20 %, 15 % bzw. 65 % des Gesamtproteins (Schmid and Blaschek 1981; Schmid 1983). Es wird angenommen, dass jede der 3 Spezies unabhängig zum nativen Zustand faltet. Die langsam faltenden Spezies U_s^I und U_s^{II} sind durch die *cis/trans* Isomerisierung von Prolinen (hierbei kann die Peptidbindung X-Pro als *cis* oder *trans* Isomer vorliegen) im denaturierten Zustand verursacht (Brandts et al. 1975; Schmid and Baldwin 1978a; Lin and Brandts 1983; Schmid 1983), wobei eine Beteiligung der im nativen Zustand in *cis* vorliegenden Proline 93 und 114 nachgewiesen werden konnte (Lin and Brandts 1983; 1984; Schultz et al. 1992). In Rückfaltungsuntersuchungen aus Harnstoff konnte eine Beschleunigung der langsamen Rückfaltungsphase in Gegenwart von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans* Isomerasen gezeigt werden (Fischer and Bang 1985).

Durch die Gruppe von H. A. Scheraga wurden durch Variation der Rückfaltungsbedingungen neben den bereits bekannten Phasen 2 weitere Rückfaltungsphasen gefunden (Houry et al. 1994; Houry and Scheraga 1996a), welche durch die im denaturierten Zustand populierte Spezies U_{vf} (very fast) und U_m (medium) verursacht werden. Durch weitere Untersuchungen wurde eine Beteiligung der Proline 93, 114 und 117 bei der Bildung der langsamer faltenden Spezies durch die im denaturierten Zustand auftretende Prolinisomerisierung nachgewiesen (Dodge and Scheraga 1996). Dagegen wird die Faltung von RNase A durch die Isomerisierung des Prolins 42 nicht beeinflusst (Dodge et al. 1994;

Dodge and Scheraga 1996). Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurde das in Abb. 9 dargestellte Box-Modell entwickelt (Wedemeyer et al. 2002), das hinsichtlich der Amplituden und Phasen den jeweils neuen experimentellen Erkenntnissen angepasst wurde (Houry et al. 1994; Dodge and Scheraga 1996; Houry and Scheraga 1996a; Juminaga et al. 1997; Wedemeyer et al. 2002). Daraus ergeben sich 8 Spezies, die sich hinsichtlich ihrer Prolinkonfiguration unterscheiden und in 5 separaten Phasen unabhängig voneinander falten (Abb. 10).

Über die Rückfaltung von U_s^I und U_m ist auf Grund der geringen Amplitude nur wenig bekannt, wobei ein Intermediat I' für die Rückfaltung von U_s^I postuliert, aber nicht nachgewiesen wurde (Mui et al. 1985). Die Rückfaltung von U_s^{II} und U_{vf} sind dagegen sehr gut untersucht. U_s^{II} faltet unter Bildung eines frühen Intermediats I_1 über ein nativ-ähnliches Intermediat I_N zum nativen Zustand N (Kim and Baldwin 1980; Udgaonkar and Baldwin 1988; 1990; 1995) (Abb. 10). I_1 besitzt bereits ähnliche Austauschraten für die Amidprotonen wie I_N und bindet den Inhibitor 2'CMP, was auf eine definierte Tertiärstruktur und eine ähnliche Stabilität wie I_N hindeutet (Udgaonkar and Baldwin 1995). Der Unterschied zwischen I_1 und I_N besteht darin, dass I_1 noch die spektroskopischen Eigenschaften vom denaturierten Zustand besitzt, während I_N bereits nativ-ähnliche Eigenschaften wie z.B. Aktivität und native Tyrosinabsorption zeigt (Cook et al. 1979; Schmid 1981; Schmid and Blaschek 1981; Schmid 1983). Daraus kann abgeleitet werden, dass in I_N die Tyrosinseitenketten im Inneren des Moleküls verborgen sind, wohingegen diese sich in I_1 noch an der Oberfläche des Moleküls befinden (Udgaonkar and Baldwin 1995). Trotz gleicher Absorptionseigenschaften unterscheiden sich I_N und N in ihren Fluoreszenzeigenschaften (Schmid 1981). Beide Intermediate I_1 und I_N besitzen Pro93 in nicht-nativer Konfiguration, so dass hier die Faltung der Prolinisomerisierung vorausgeht.

Die Rückfaltung von U_{vf} , welches alle für die Faltung wichtigen Proline (Pro93, 114, 117) in nativer Konfiguration besitzt (Houry et al. 1994), verläuft über die Bildung eines stark entfalteten Intermediats I_U und eines späteren Intermediats I_Φ zu N (Houry et al. 1996; Houry and Scheraga 1996b) (Abb. 10). Das Intermediat I_U besitzt nur lokale Strukturen und hat keine vor dem Austausch mit dem Lösungsmittel geschützten Amidprotonen. I_Φ besitzt bereits weitreichende Strukturen, welche die Helix 2 und einen Großteil der β -Faltblattstruktur umfassen, ist jedoch deutlich instabiler als das bei der Rückfaltung von U_s^{II} gefundene Intermediat I_1 . Ob U_f , in welchem Pro114 nach dem Box-Modell in der nicht-nativen *trans* Konfiguration vorliegt, ebenfalls über die gleichen Intermediate wie U_{vf} faltet, ist nicht bekannt.

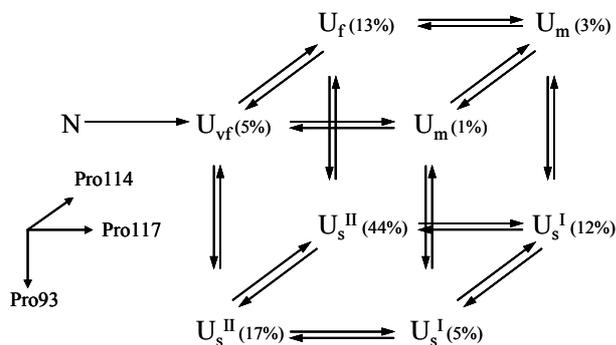


Abb. 9: Box-Modell für die Isomerisierung der Prolylpeptidbindung von Pro93, Pro114 und Pro117 unter Entfaltungsbedingungen nach Wedemeyer et al. (2002).

Das Box-Modell zeigt die durch die Prolinisomerisierung im denaturierten Zustand entstehenden Spezies entsprechend ihrer Rückfaltungsgeschwindigkeit. In Klammern sind die prozentualen Anteile einer jeden Spezies angegeben. Die Vektoren zeigen die Reaktion zum nicht-nativen Isomer des jeweiligen Prolins.

Der kürzlich gelungene Einbau eines β -turn-Mimetiks (Arnold et al. 2002) und eines 5, 5-Dimethyl-(L)-Prolins (Arnold et al. 2003), dessen Asn113–Pro114 Peptidbindung ausschließlich in *cis* Konfiguration vorliegt, eröffnet neue vielversprechende Wege für die Untersuchung des Einflusses von Prolinen auf die Faltung von RNase A.

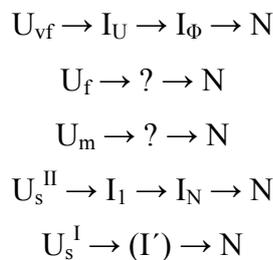


Abb. 10: Rückfaltungswege für die im denaturierten Zustand populierte Spezies.

U_{vf} , U_f , U_m , U_s^{II} , U_s^I - durch die Isomerisierung von Prolylpeptidbindungen entstehende entfaltete Spezies; N - nativer Zustand; I - Intermediate.

Die Entfaltung von RNase A wurde in verschiedenen Denaturanzien (Nall et al. 1978; Kiefhaber and Schmid 1992; Kiefhaber and Baldwin 1995; Kiefhaber et al. 1995; Kiefhaber and Baldwin 1996; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2001; Juneja and Udgaonkar 2002), bei erhöhter Temperatur (Tsong et al. 1971; Matheson and Scheraga 1979; Robertson and Baldwin 1991; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997; 2001) und durch Druck (Panick and Winter 2000) untersucht. Ein weitgehend akzeptiertes Entfaltungsmodell von RNase A ist: $N \rightarrow U_f (U_{vf}) \rightarrow U_s (U_s^{I+II} + U_m)$ (Neira and Rico 1997), wobei die erste Reaktion die strukturelle Entfaltung und die zweite Reaktion die Isomerisierung der Prolylpeptidbindungen ist. Trotz dieser Annahme gab es schon in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts Hinweise für

Entfaltungsintermediate (Benz and Roberts 1973). Diese Studien wurden durch weitere Untersuchungen in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts unterstützt (Mayo and Baldwin 1993; Curtil et al. 1994; Kiefhaber and Baldwin 1995; Kiefhaber et al. 1995; Phillips et al. 1995), wodurch der direkte Beweis für die Existenz eines Entfaltungsintermediats durch NMR-Spektroskopie gelang (Kiefhaber et al. 1995). Neueste Untersuchungen durch Puls-H/D-Austauschstudien lieferten Beweise für die Existenz zweier unter nativen Bedingungen vorkommender nativer Spezies (N - dominante Form, N_I^* - alternative Form) (Juneja and Udgaonkar 2002). N_I^* besitzt im Gegensatz zu N bereits einige Amidprotonen, die für einen Austausch voll zugänglich sind. Die Entfaltung von N kann auf zwei parallelen Wegen erfolgen (Abb. 11), wobei mehrere Intermediate (I_U^2 und I_U^3) durchlaufen werden können. Dagegen erfolgt die Entfaltung von N_I^* direkt zu U_f (U_{vf}).

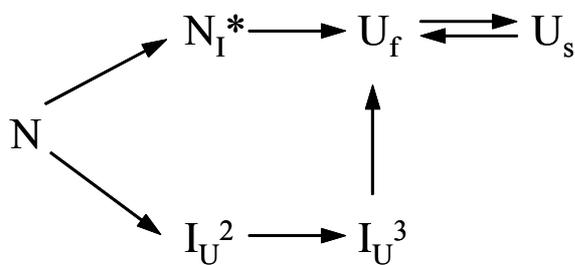


Abb. 11: Entfaltungsmodell von RNase A nach Juneja und Udgaonkar (2002).

N - nativer Zustand; N_I^* - nativ-ähnlicher Zustand; I_U^2 , I_U^3 - Intermediate; U_f (U_{vf}) - denaturierter Zustand mit nativen Prolylpeptidbindungen; U_s - denaturierter Zustand mit nicht-nativen Prolylpeptidbindungen.

Neben den Untersuchungen an disulfidverbrückter RNase A wurden auch Studien zur Faltung reduzierter RNase A unter oxidativen Bedingungen und zur Entfaltung nativer RNase A unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Cuchillo et al. 1997; Neira and Rico 1997), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Während für verschiedene Fragmente von RNase A der Einfluss von TFE auf ihre Struktur gut untersucht ist (Nelson and Kallenbach 1986; Jiménez et al. 1987; Jiménez et al. 1988; Storrs et al. 1992; Kumaran and Roy 1999), gibt es nur wenige Untersuchungen zum Einfluss von TFE auf die Struktur von intakter RNase A. Hierbei beschränkten sich die Studien auf die Untersuchungen des thermodynamischen Gleichgewichts unter Verwendung spektroskopischer Methoden (Gast et al. 1999; Sivaraman et al. 1999) und dynamischer Lichtstreuung (Gast et al. 1999), die zeigten, dass die Zerstörung der Tertiärstruktur in TFE-Konzentrationen $> 30\%$ (v/v) mit einer Induktion helikaler Strukturen einhergeht. In TFE-Konzentrationen $> 50\%$ ist die Tertiärstruktur vollständig zerstört, wobei weitere helikale Strukturen induziert werden können. Luo und Baldwin (1998) untersuchten den Einfluss von

TFE auf die GdnHCl-induzierte Übergangskurve und zeigten, dass TFE die Tertiärstruktur von RNase A destabilisiert. Polverino de Laureto et al. (1997) untersuchten den TFE-denaturierten Zustand in 50 % TFE mittels limitierter Proteolyse durch Thermolysin und konnten die Peptidbindung Asn34–Leu35 als primäre Spaltstelle identifizieren. Kinetische Untersuchungen der Ent- und Rückfaltungsreaktion von RNase A in TFE wurden bisher noch nicht durchgeführt.

2.3.3. Proteolysestudien zur RNase A

Bereits Anfang der 60er Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde die limitierte Proteolyse als einfache Methode zur Untersuchung der Entfaltung von RNase A bei erhöhten Temperaturen genutzt, wobei bereits primäre Schnittstellen für die Proteasen Trypsin (Ooi et al. 1963) und Chymotrypsin (Rupley and Scheraga 1963) identifiziert wurden. Weitere Untersuchungen zur thermischen Entfaltung von RNase A schlossen sich seit den 70er Jahren bis heute an (Winchester et al. 1970; Arnold et al. 1996; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997; 2000; 2001). Dabei wurden neben dem Abbau durch Trypsin (Arnold et al. 1996) auch der Abbau durch die Proteasen Thermolysin (Arnold et al. 1996) und Proteinase K (Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000) untersucht, wobei erstmals systematisch Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung von RNase A mittels limitierter Proteolyse bestimmt wurden (Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997). Die Proteolysestudien wurden auch auf weitere Denaturanzien wie Harnstoff (Arnold and Ulbrich-Hofmann 2001), GdnHCl (Yang and Tsou 1995; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000) und TFE (Polverino de Laureto et al. 1997) ausgedehnt. Neben der Verfolgung von Entfaltungsprozessen dienten Proteolysestudien zur Untersuchung der Prolinisomerisierung in RNase A (Lin and Brandts 1984).

Weiterhin wurde die proteolytische Spaltung von RNase A unter nativen Bedingungen durch die unspezifischen Proteasen Proteinase K (Rauber et al. 1978), Subtilisin Carlsberg (Richards and Vithayathil 1959) und Elastase (Klee 1965), wobei deren primäre Schnittstellen identifiziert wurden, untersucht. Dabei konnte kürzlich durch den Austausch des Ala20 durch ein Pro eine RNase A-Variante erzeugt werden, die gegen Proteinase K und Subtilisin Carlberg, die die Peptidbindung Ala20–Ser21 spalten, resistent ist (Markert et al. 2001).

2.4. *Proteinase K*

Proteinase K (EC 3.4.21.64) gehört zu den Serinproteasen der Subtilisinfamilie (Pähler et al. 1984) und stammt aus dem Pilz *Tritirachium album* Limber (Ebeling et al. 1974). Proteinase K besteht aus 279 Aminosäuren und besitzt eine Molmasse von 28,8 kDa. Das Protein ist durch 4 Disulfidbindungen verbrückt und enthält ein freies Cystein (Cys73). Die katalytische Triade wird durch die Aminosäuren Asp39, His69, Ser224 gebildet (Betzler et al. 1986). Das pH-Optimum liegt zwischen pH 7,5 und pH 12, der isoelektrische Punkt bei pH 8,9 (Ebeling et al. 1974). Proteinase K bindet zwei Kalzium-Ionen, die sie für die Stabilität, jedoch nicht für die Aktivität benötigt (Müller et al. 1994). Proteinase K besitzt ein breites Substratspektrum, da die Erkennung von Substraten hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat erfolgt (Müller et al. 1994). Jedoch zeigt das Enzym in P₁-Position (Schechter and Berger 1967) eine leichte Präferenz für hydrophobe und aromatische Aminosäuren (Ebeling et al. 1974) und bevorzugt bei kurzkettigen Substraten in der P₁'-Position Ala = Gly > Phe = Leu > Val (Brömme et al. 1986). Eine Bindung von Prolin in P₁-Position erfolgt nicht (Brömme et al. 1986). Bemerkenswert ist die hohe Stabilität von Proteinase K gegenüber erhöhten Temperaturen und chemischen Denaturanzien wie Harnstoff und Natriumdodecylsulfat (Hilz et al. 1975; Bajorath et al. 1988). Durch die hohe Stabilität und das breite Substratspektrum ist Proteinase K sehr gut für Untersuchungen zur Struktur und Stabilität von Proteinen geeignet.

3. Materialien und Methoden

3.1. *Materialien*

3.1.1. Chemikalien

2',3'-zyklisches Cytidinmonophosphat (cCMP)	Fluka, Taufkirchen
2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Merck, Darmstadt
6-Carboxyfluoreszein-dArUdAdA-6-Carboxy-tetramethylrhodamin (IDT2)	Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Eurogentec, Groningen, NL
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blau G250	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Glutathion oxidiert (GSSG)	Boehringer Mannheim, Penzberg
Glutathion reduziert (GSH)	Roche Diagnostics, Mannheim
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Appllichem, Darmstadt
Kalziumchlorid	Serva, Heidelberg
Kanamycin	Serva, Heidelberg
N-Acetyl-Tyrosinamid	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appllichem, Darmstadt
N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid	Bachem, Weil am Rhein
N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin (Tricin)	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Taufkirchen
Trifluorethanol (TFE)	Fluka, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Appllichem, Darmstadt
Trypton	Difco, Augsburg

Alle weiteren Chemikalien waren von höchster Reinheit.

3.1.2. Proteine

RNase A (EC 3.1.27.5, SIGMA, Taufkirchen) wurde vor dem Einsatz wie unter 3.2.4.4. beschrieben gereinigt. Alle anderen Proteine wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

Proteasen

Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Subtilisin Carlsberg	Sigma, Taufkirchen

Restriktionsendonukleasen

Ava I, Bsm I, Eco RI, Hind III, Nde I, Sac I	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
--	---------------------------------------

PfuTurbo DNA-Polymerase

T4 DNA-Ligase	Stratagene, Heidelberg
Shrimp Alkalische Phosphatase	Invitrogen, Karlsruhe
Lysozym (Hühnereiweiß)	USB, Cleveland, OH, USA
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
Casein	Pierce, Bonn
	Merck, Darmstadt

Markerproteine

Cytochrom c (Pferdeherz)	alle Sigma, Taufkirchen
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	
Trypsin-Inhibitor (Rinderpankreas)	

3.1.3. Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt und mittels HPLC gereinigt.

Primer für die Klonierung des A20P-rnase A-Gens aus dem pET 22b(+) Plasmid in das pET 26b(+) Plasmid:

T7Prom	5´-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3´
T7Term	5´-CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG-3´

Sequenzierungsprimer:

Die Sequenzierungsprimer waren am 5´-Ende mit IRD 800 modifiziert.

T7Prom	5´-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3´
--------	---------------------------------

T7Term 5' - GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'

Primer für die ortsgerichtete Mutagenese:

Die gegenüber dem Ausgangsplasmid veränderten Nukleotide sind rot hervorgehoben, die eingeführten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen unterstrichen.

A20P fw	5' -GAC TCC AGC ACT TCC <u>GCC CCG</u> AGC AGC TCC AAC TAC TG-3'
A20P rev	5' -CA GTA GTT GGA GCT <u>GCT CGG</u> GGC GGA AGT GCT GGA GTC-3'
A20P→Wt fw	5' -C ACT TCC GCT GCC AGC AGC TCC-3'
A20P→Wt rev	5' -GGA GCT GCT GGC AGC GGA AGT G-3'
S21P fw	5' -CC AGC ACT TCC GCC GCT <u>CCG</u> AGC <u>TCC</u> AAC TAC TGT AAC-3'
S21P rev	5' -GTT ACA GTA GTT <u>GGA GCT</u> <u>CGG</u> AGC GGC GGA AGT GCT GG-3'
A20P/S21P fw	5' -CC AGC ACT TCC GCC CCG <u>CCG</u> AGC <u>TCC</u> AAC TAC TGT A-3'
A20P/S21P rev	5' -GTT ACA GTA GTT <u>GGA GCT</u> <u>CGG</u> CGG GGC GGA AGT GCT-3'
S21L fw	5' -C TCC AGC ACT TCC GCC GCC <u>CTG</u> AGC <u>TCC</u> AAC TAC TG3'
S21L rev	5' -CA GTA GTT <u>GGA GCT</u> <u>CAG</u> GGC GGC GGA AGT GCT GGA G-3'
K31A/R33S fw	5' -C TGT AAC CAG ATG ATG <u>GCG</u> AGC <u>TCG</u> AAC CTG ACC AAA GAT C3'
K31A/R33S rev	5' -G ATC TTT GGT CAG GTT <u>CGA GCT</u> <u>CGC</u> CAT CAT CTG GTT ACA G-3'
N34D fw	5' -C CAG ATG ATG AAG AGC CGG <u>GAC</u> CTG ACC AAA GAT CGA TGC-3'
N34D rev	5' -GCA TCG ATC TTT GGT CAG <u>GTC</u> CCG GCT CTT CAT CAT CTG G-3'
L35A fw	5' -G ATG ATG AAG AGC CGG <u>AAT GCC</u> ACC AAA GAT CGA TGC AAG C-3'
L35A rev	5' -G CTT GCA TCG ATC TTT GGT <u>GGC ATT</u> CCG GCT CTT CAT CAT C-3'
L35S fw	5' -G ATG ATG AAG AGC CGG <u>AAT TCC</u> ACC AAA GAT CGA TGC AAG C-3'

L35S rev 5´-G CTT GCA TCG ATC TTT GGT GGA ATT CCG GCT CTT
 CAT CAT C-3´

F46Y fw 5´-GC AAG CCA GTG AAC ACA TAT GTG CAC GAG TCC
 CTG G-3´

F46Y rev 5´-C CAG GGA CTC GTG CAC ATA TGT GTT CAC TGG CTT
 GC-3´

3.1.4. Plasmide

Das Plasmid pBXR, welches aus der Klonierung des *rnase A* Gens in das pET 22b(+)-Plasmid (Amp^r; Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach) hervorgeht (delCardayré et al. 1995), wurde freundlicherweise von Ronald T. Raines (WI, USA) zur Verfügung gestellt. Das pET 26b(+)-Plasmid (Kan^r) wurde von Calbiochem-Novabiochem (Schwalbach) bezogen.

3.1.5. *E. coli*-Stämme

E. coli XL1-Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F´ *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)] (Stratagene, Heidelberg)

E. coli BL21 (DE3) *E. coli* B F´ *dcm ompT hsdS* (*r_B*⁻ *m_B*⁻) *gal λ*(DE3) (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach)

3.1.6. Kulturmedien

Die Herstellung der Kulturmedien erfolgte nach Sambrook et al. (1989).

LB-Flüssigmedium:

pro Liter: 10 g Natriumchlorid, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, pH 7,0

LB-Agarplatten:

Zusammensetzung wie LB-Flüssigmedium, 20 g Agar pro Liter

SOC-Medium:

pro Liter: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl, pH 7,0

nach dem Autoklavieren: Zugabe von 5 ml einer 2 M MgCl₂-Lösung und 20 ml einer 1 M Glucoselösung (alle steril)

TB-Glucose-Medium:

pro 900 ml: 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin

nach dem Autoklavieren: Zugabe von 100 ml einer 0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4 -Lösung und 20 ml einer 20 % (w/v) Glucoselösung

3.2. Methoden

3.2.1. Ortsgerichtete Mutagenese des *rnase A*-Gens

Die ortsgerechte Mutagenese erfolgte mit Hilfe des *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis* Kit (Stratagene, Heidelberg) entsprechend der Anleitung des Herstellers. Die verwendeten Mutageneseprimer sind unter 3.1.3. aufgeführt. Die Transformation der Dpn I-behandelten DNA in *E. coli* XL1-Blue Zellen erfolgte abweichend von den Herstellerangaben unter Nutzung elektrokompenter Zellen wie unter 3.2.3.1. beschrieben. Für die Selektion positiver Klone wurden Restriktionsschnittstellen in die DNA eingeführt bzw. entfernt. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen und die genutzten Ausgangsplasmide sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zur Kontrolle der korrekten DNA-Sequenz wurden alle Mutanten wie unter 3.2.3.9. beschrieben sequenziert.

Die Herstellung der Varianten A20P, S21P und A20P/S21P erfolgt in Zusammenarbeit mit Frau Diplom-Biochemikerin Y. Markert (Martin-Luther-Universität Halle).

3.2.2. Klonierung des *A20P-rnase A*-Gens in das pET 26b(+)-Plasmid

Da die Expressionsausbeuten von RNase A im pET 22b(+)-Plasmid (Ampicillinresistenz) sehr gering waren, sollte das *A20P-rnase A*-Gen in das pET 26b(+)-Plasmid (Kanamycinresistenz) kloniert werden. Zur Klonierung des *A20P-rnase A*-Gens in das pET 26b(+)-Plasmid wurde eine PCR unter Verwendung der unter 3.1.3. angegebenen Oligonukleotide durchgeführt. Nach Reinigung des PCR-Produkts durch Agarosegelelektrophorese (3.2.3.5.) wurde dieses unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen Nde I und Hind III verdaut (3.2.3.6.). Das DNA-Fragment wurde nach erneuter Reinigung in das mit Nde I und Hind III verdaute und dephosphorylierte Plasmid pET 26b(+) wie unter 3.2.3.8. beschrieben ligiert. Die korrekte DNA-Sequenz wurde durch anschließende DNA-Sequenzierung (3.2.3.9.) sichergestellt.

Tab. 1: Ausgangsplasmide und Restriktionsendonukleasen für die Einführung der jeweiligen Mutation im *rnase A*-Gen.

Mutation	Ausgangs-DNA	Restriktions- endonuklease
A20P	<i>rnase A</i> -Gen in pET 22b(+)	Ava I
A20P→Wildtyp	<i>A20P rnase A</i> -Gen in pET 26b(+)	Ava I
S21L	<i>rnase A</i> -Gen in pET 22b(+)	Sac I
S21P	<i>rnase A</i> -Gen in pET 26b(+)	Sac I
A20P/S21P	<i>A20P rnase A</i> -Gen in pET 26b(+)	Sac I
K31A/R33S	<i>rnase A</i> -Gen in pET 22b(+)	Sac I
N34D	<i>rnase A</i> -Gen in pET 22b(+)	keine
L35S	<i>rnase A</i> -Gen in pET 22b(+)	Eco RI
L35A	<i>rnase A</i> -Gen in pET 22b(+)	Bsm I
F46Y	<i>rnase A</i> -Gen in pET 22b(+)	Nde I
K31A/R33S/F46Y	<i>K31A/R33S rnase A</i> -Gen in pET 22b(+)	Nde I
L35S/F46Y	<i>L35S rnase A</i> -Gen in pET 22b(+)	Nde I
L35A/F46Y	<i>L35A rnase A</i> -Gen in pET 22b(+)	Nde I

3.2.3. Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.3.1. Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Die Transformation der Plasmide in *E. coli* erfolgte mittels Elektroporation unter Verwendung des Gene Pulser II (BioRad, München) nach Herstellerprotokoll. Nach einstündiger Inkubation der transformierten Zellen in SOC-Medium bei 37°C wurden diese auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (50 µg · ml⁻¹ Ampicillin bzw. 25 µg · ml⁻¹ Kanamycin) ausplattiert und bei 37°C inkubiert (Brutschrank Kelvitron, Heraeus, Hanau).

3.2.3.2. *Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli*

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden).

3.2.3.3. *Größen- und Konzentrationsbestimmung von Plasmiden und DNA-Fragmenten*

Die Bestimmung von DNA-Fragmentgrößen erfolgte mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers (1 kb-Leiter, Invitrogen, Karlsruhe) im Agarosegel.

Neben der Abschätzung mit Hilfe der 1 kb-Leiter im Agarosegel wurde die DNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm ($A_{260} = 1$ entspricht ca. $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ doppelsträngige DNA) unter Verwendung eines Ultrospec 3000 Spektrophotometers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt.

3.2.3.4. *Agarosegelelektrophorese*

Die Agarosegelelektrophorese wurde nach Sambrook et al. (1989) unter Verwendung von 1 %-igen Agarosegelen und 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) durchgeführt. Die Färbung der DNA erfolgte mit Ethidiumbromid ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

3.2.3.5. *DNA-Reinigung aus Agarosegelen*

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers extrahiert.

3.2.3.6. *Restriktionsverdau*

Der Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Puffer und Zusätze bei 37°C (Bsm I bei 65°C) über 1 – 24 h. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Restriktionsenzyme durch 20-minütiges Inkubieren bei 65°C (Bsm I bei 80°C).

3.2.3.7. *Dephosphorylierung des pET 26b(+)-Plasmids*

Nach Verdau des pET 26b(+)-Plasmides mit Hind III und Nde I erfolgte die Dephosphorylierung des 5'-Endes der Plasmid-DNA unter Nutzung der Alkalischen Phosphatase aus Shrimp (1 U) bei 37°C für 1 h. Anschließend wurde eine Ethanolfällung nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

3.2.3.8. *Ligation des A20P-rnase A-Gens in das pET 26b(+)-Plasmid*

Die Ligation des DNA-Fragments, welches das A20P-rnase A-Gen enthielt, in das pET 26b(+)-Plasmid erfolgte durch Inkubation beider DNA-Stücke für 2 h bei 24°C in Gegenwart von T4-Ligase (1 U). Fragment und Plasmid wurden in einem Stoffmengenverhältnis von ca. 4:1 eingesetzt.

3.2.3.9. *DNA-Sequenzierung*

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Didesoxy-Verfahren nach Sanger et al. (1977) mit dem *SequiThermEXEL™ LongRead™ DNA Sequencing* Kit (Biozym, Oldendorf) unter Verwendung eines LiCor 4000 DNA-Sequenzers (MWG, Ebersberg) nach Angaben des Herstellers. Für die Sequenzierung wurden die unter 3.1.3. angegebenen am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markierten Oligonukleotide und 200 fmol Plasmid-DNA eingesetzt.

3.2.3.10. *Kultivierung von E. coli-Stämmen*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA oder zur Herstellung einer Glycerinkultur wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ampicillin bzw. Kanamycin) mit einer einzelnen Bakterienkolonie einer bei 37°C inkubierten LB-Agarplatte beimpft und bei 180 rpm und 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.4. Expression und Reinigung von RNase A und ihren Varianten

Die Expression und Reinigung der Varianten von RNase A erfolgte in Anlehnung an delCardayré et al. (1995).

3.2.4.1. Expression der RNase A-Varianten

Vorkultur:

Für die Vorkultur wurden 2 x 100 ml TB-Glucose-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ($400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ampicillin bzw. $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Kanamycin) mit Bakterienzellen aus einer Glycerinkultur angeimpft und bei 200 rpm und 37°C über Nacht inkubiert. Die OD_{600} der Vorkultur sollte zum Animpfen der Hauptkultur zwischen 0,5 und 1,0 liegen.

Hauptkultur:

Für die Hauptkultur wurde 1 l TB-Glucose-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ($400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ampicillin bzw. $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Kanamycin) mit 10 ml der Vorkultur inokuliert und bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Nach Erreichen einer OD_{600} von 1,8 – 2,0 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,7 mM) induziert. 3 – 4 h nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (12 min bei 5000 g unter Verwendung einer AvantiTM J-20 Beckman-Zentrifuge, München) geerntet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.4.2. Isolierung von inclusion bodies

Während der Expression fielen die RNasen intrazellulär in Form von unlöslichen Aggregaten (*inclusion bodies*) an. Zur Isolierung dieser *inclusion bodies* wurde das aus 4 l Kulturmedium erhaltene Zellpellet in 20 ml Zellyse-Puffer (20 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und nach Zugabe von Lysozym 30 s mit dem Ultraturax behandelt. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis erfolgte der Zellaufschluss durch einen Homogenisator (Gaulin Micron Lab 40, APV Homogeniser GmbH, Lübeck; 2 Passagen). Anschließend wurden die *inclusion bodies* durch Zentrifugieren (40 min bei 30000 g unter Verwendung einer AvantiTM J-20 Beckman-Zentrifuge) isoliert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.4.3. Renaturierung der RNase A-Varianten

Die *inclusion bodies* aus 4 l Kulturmedium wurden in 20 ml Solubilisierungspuffer (20 mM Tris/HCl, 7 M GdnHCl, 100 mM DTT, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, mit Stickstoff begast und zur vollständigen Reduzierung der Disulfidbindungen 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von HCl auf 4,0 gesenkt und die solubilisierten *inclusion bodies* gegen 20 mM Essigsäure (2 x 10 l) über Nacht dialysiert (Dialyseschlauch Spectra/Por 3,5 kDa Ausschlussgrenze, Serva, Heidelberg). Nach der Dialyse wurden entstandene Präzipitate durch Zentrifugation (30 min bei 15000 g unter Verwendung einer AvantiTM J-20 Beckman-Zentrifuge) abgetrennt.

Die Renaturierung erfolgte bei Raumtemperatur für 24 h im Dunkeln durch schnelles Verdünnen der Proteinlösung (Endkonzentration ca. 50 – 100 µg · ml⁻¹) in Renaturierungspuffer (1 l Endvolumen; 100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM reduziertes Glutathion (GSH), 0,2 mM oxidiertes Glutathion (GSSG), 10 mM EDTA, pH 8,3).

3.2.4.4. Reinigung von RNase A und ihren Varianten

Nach 24-stündiger Renaturierung wurde die Lösung unter Verwendung eines 0,2 µm Zellulose-Acetat-Filters (Sartorius, Göttingen) von Aggregaten getrennt. Anschließend wurde die Lösung mittels einer Amicon-Zelle (400 ml, Millipore, Schwalbach) unter Verwendung einer 3 K Omega-Membran (Pall Filtron, Dreieich) konzentriert, umgepuffert (50 mM Tris/HCl, pH 7,5) und bis zur weiteren Reinigung bei -20°C gelagert.

Die Reinigung von RNase A und ihren Varianten erfolgte mittels Kationenaustausch-Chromatographie an einer MONO S HR 5/5 FPLC-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg) unter Verwendung einer inerten HPLC-Anlage (Detektor L-4250, Niederdruckgradientenpumpe L-6210, Merck-Hitachi, Tokio/Japan). Durch steigenden NaCl-Gradienten (Laufmittel A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; Laufmittel B: 50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5) wurden die Proteine eluiert und manuell fraktioniert. Die Detektion erfolgte bei 278 nm. Anschließend wurde die Reinheit der Proteine elektrophoretisch (SDS-PAGE) und chromatographisch (durch Rechromatographie) überprüft.

Nach der Reinigung wurden RNase A und ihre Varianten mittels einer Amicon-Zelle (250 ml) unter Verwendung einer 3 K Omega-Membran konzentriert, umgepuffert (50 mM Tris/HCl, pH 8,0) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.5. Bestimmung der RNase A-Konzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, spektroskopisch unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten.

3.2.5.1. Spektroskopische Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der RNase A-Stammlösung wurde unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 9800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 278 nm (Sela and Anfinsen 1957) unter Verwendung eines Ultrospec 3000 Spektrophotometers bestimmt.

Zur spektroskopischen Bestimmung der Proteinkonzentration der RNase A-Varianten wurde ihr Extinktionskoeffizient nach Thannhauser et al. (1984) ermittelt. So wurde für alle F46Y-freien RNase A-Varianten ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 9800 \pm 200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und für alle F46Y-RNasen ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 11300 \pm 200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 278 nm ermittelt.

3.2.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Diese Methode beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis eines Bicinchoninsäure/ Cu^+ -Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf Cu^{2+} -Ionen und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure entsteht (Smith et al. 1985). Hierzu wurde das *BCA Protein Assay* Kit von Pierce (Bonn) verwendet. Der Test wurde entsprechend der Anleitung in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Protein für die Kalibrierkurve im Konzentrationsbereich von 0 – 1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ diente Rinderserumalbumin. Die Detektion erfolgte bei 560 nm unter Verwendung eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes MR 7000 (Dynatech, Denkendorf). Jede Proteinkonzentration stellt das Mittel einer Dreifachbestimmung dar.

3.2.6. TFE-induzierte Denaturierung und Proteolyse

Die limitierte Proteolyse von RNase A und A20P-RNase A wurde in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 und TFE (0 – 60 %, v/v) bei 25°C durchgeführt (Gesamtvolumen 200 μl). Dem bei 25°C vorinkubierten TFE/Puffer-Gemisch wurde

Proteaselösung (Subtilisin Carlsberg, $4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, oder Proteinase K, $0,002 - 2,4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Endkonzentration) zugesetzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von RNase A bzw. A20P-RNase A ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Endkonzentration) gestartet. Nach definierten Zeitintervallen wurden $10 \mu\text{l}$ Probe entnommen und mit $13 \mu\text{l}$ Stoppreagens (1 ml 50 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in Isopropanol und $330 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M}$ HCl) gemischt. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C inkubiert und nach Abkühlung durch Zugabe von $3 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M}$ NaOH neutralisiert.

3.2.7. SDS-PAGE und densitometrische Evaluierung

Die Elektrophorese wurde unter Verwendung einer *Mighty-Small II Elektrophoresis unit* (Hoefer, San Francisco, CA, USA) nach der Methode von Schägger und von Jagow (1987) (Verwendung von 10% und 18% (w/v) Acrylamid für Sammel- und Trenngel ohne Zwischengel) bzw. nach der Methode von Laemmli (1970) (Verwendung von 10% und $17,5 \%$ (w/v) Acrylamid für Sammel- und Trenngel) unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Silberfärbung der Gele erfolgte entsprechend der Methode von Blum et al. (1987). Zur densitometrischen Evaluierung der Bande der intakten RNase A wurden die SDS-PAGE-Gele mit Coomassie Brilliant Blau G250 gefärbt und bei 595 nm unter Verwendung eines CD 60 Densitometers (Desaga, Heidelberg) gescannt.

3.2.8. Bestimmung von Proteolysekonstanten, der relativen proteolytischen Angreifbarkeit und von Entfaltungskonstanten durch limitierte Proteolyse

3.2.8.1. Bestimmung der Proteolysekonstante

Die Proteolysekonstante k_p wurde aus der zeitabhängigen Abnahme der Peakfläche der Bande der intakten RNase A in den gescannten SDS-PAGE-Gelen (Abb. 4), welche einer Reaktion 1. Ordnung folgt, ermittelt (Gl. 27).

3.2.8.2. *Relative proteolytische Angreifbarkeit*

Zum Vergleich der proteolytischen Angreifbarkeit von RNase A in Abhängigkeit der TFE-Konzentration wurden die Quotienten aus den Anstiegen der linearen k_p -Proteasekonzentrationsfunktion bei der entsprechenden TFE-Konzentration (Abb. 16) und dem Anstieg für 0 % (v/v) TFE gebildet. Um den Einfluss der sich in Abhängigkeit von der TFE-Konzentration ändernden Proteinase K-Aktivität auf die so erhaltene relative proteolytische Angreifbarkeit (mit dem Wert 1 für 0 % (v/v) TFE) zu eliminieren, wurde diese anschließend durch die relative Proteinase K-Aktivität bei der jeweiligen TFE-Konzentration (3.2.10.1.) dividiert.

3.2.8.3. *Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung*

Die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung k_u von A20P-RNase A in 0 – 40 % (v/v) TFE wurden durch nicht-lineare Regression der k_p -Proteasekonzentrationsabhängigkeit unter Verwendung der Gleichung (33) bestimmt. Da der Abbau von A20P-RNase A über den nativen Zustand schon bei einer TFE-Konzentration von 5 % (v/v) vernachlässigbar ist, war für TFE-Konzentrationen ≥ 5 % auch die Verwendung der Gleichung (28) möglich.

Die Bestimmung des k_u -Wertes von A20P RNase A in 45 % (v/v) TFE erfolgte unter entfaltungslimitierenden Bedingungen, d.h. bei hohen Proteasekonzentrationen ($\geq 1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), wodurch der ermittelte k_p -Wert der Entfaltungskonstante entspricht. Der in Abb. 16 gezeigte Wert stellt den Mittelwert aus 4 unabhängigen Experimenten dar.

Da der Abbau von RNase A über den nativen Zustand erst ab 40 % (v/v) TFE vernachlässigbar ist, wurde nur für diese TFE-Konzentration k_u (unter entfaltungslimitierenden Bedingungen) ermittelt. Der in Abb. 16 gezeigte Wert stellt den Mittelwert aus 4 unabhängigen Experimenten dar.

3.2.9. **Bestimmung der RNase A-Aktivität**

3.2.9.1. *Bestimmung der RNase A-Aktivität gegenüber cCMP*

RNase A ($20 - 100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) wurde in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Gegenwart von TFE (0 – 50 %, v/v) und 7 mM cCMP (Crook et al. 1960) bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde bei

286 nm in einer 0,1 cm Quarzküvette verfolgt (Ultrospec 3000 Spektrophotometer). Die Initialgeschwindigkeit wurde aus dem linearen Anstieg der Absorption berechnet. Jeder Wert in Abb. 23 ist das Mittel dreier unabhängiger Messungen.

3.2.9.2. Bestimmung der RNase A-Aktivität gegenüber IDT2

Die Aktivität von RNase A und ihren Varianten ($0,25 - 0,5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) wurde in 100 mM MES/NaOH, pH 6,0, in Gegenwart von 100 mM NaCl und 50 nM IDT2 (Kelemen et al. 1999) bei 25°C bestimmt. Die Proteinkonzentration der RNase A-Stammlösungen wurde wie unter 3.2.5.2. beschrieben ermittelt. Die Reaktion wurde durch Detektion des Emissionssignals bei 515 nm (Bandweite 10 nm) in einer 1 cm-Fluoreszenzküvette verfolgt (Fluoro-Max-2 Spektrometer, Jobin Yvon, Bensheim). Die Anregung erfolgte bei 490 nm mit einer Bandweite von 1 nm. Zur Bestimmung der Signaländerung bei vollständigem Substratumsatz (ΔF) wurde das Fluoreszenzsignal vor Zugabe von RNase und nach vollständigem Substratumsatz ermittelt. Die Berechnung von k_{cat}/K_M -Werte erfolgte entsprechend Gleichung (29),

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_M} = \frac{v}{\Delta F \cdot [\text{RNase}]} \quad (29)$$

wobei v der lineare Anstieg des Fluoreszenzsignals, ΔF die Gesamtsignaländerung bei vollständigen Substratumsatz und $[\text{RNase}]$ die Proteinkonzentration ist. Die in Tabelle 5 aufgeführten k_{cat}/K_M -Werte stellen das Mittel einer Dreifachbestimmung dar.

3.2.10. Bestimmung der Proteinase K-Aktivität

3.2.10.1. Bestimmung der Proteinase K-Aktivität gegenüber *N*-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-Nitroanilid

Die Bestimmung der Aktivität von Proteinase K ($2,5 - 20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) erfolgte in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 , TFE (0 – 60 %, v/v) und 1 mM *N*-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-Nitroanilid (Peters et al. 1989) bei 25°C. Die Zunahme der

Absorption bei 410 nm wurde in einer 1 cm Quarzküvette verfolgt (Ultrospec 3000 Spektrophotometer). Die Initialgeschwindigkeit wurde aus dem linearen Anstieg der Absorption bestimmt. Jeder Punkt in Abb. 15 ist aus 3 unabhängigen Messungen hervorgegangen.

3.2.10.2. Bestimmung der Proteinase K-Aktivität gegenüber Casein

Die Aktivität der Proteinase K-Stammlösung in den Entfaltungsexperimenten erfolgte gegenüber Casein als Substrat (Kunitz 1947). Die Casein-Stammlösung (1 %, w/v; in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) wurde nach Fujii et al. (Fujii et al. 1983) hergestellt. Die Bestimmung der Aktivität wurde in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ bei 25°C durchgeführt. Die Caseinkonzentration im Ansatz betrug 0,5 % (w/v). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 1 µg · ml⁻¹) gestartet. Nach definierten Zeitintervallen wurde je ein Ansatz (1 ml) durch Zugabe von 1 ml Trichloressigsäure-Lösung (0,1 M Trichloressigsäure, 0,22 M Natriumacetat, 0,33 M Essigsäure) abgestoppt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben zum Entfernen des nicht-umgesetzten Caseins, welches durch TCA präzipitiert, für 15 min bei 20000 g zentrifugiert (2K15 Zentrifuge, Sigma, Osterode). Anschließend wurden die Überstände bei 275 nm (Ultrospec 3000 Spektrophotometer) in einer 1 cm Quarzküvette vermessen. Der lineare Anstieg der Absorption wurde als Maß der Aktivität verwendet, wobei die Proteasemenge, die bei 275 nm eine Extinktionsänderung von 1 pro Minute verursacht, einer Kunitz-Einheit (KE) entspricht. Jede so bestimmte Proteinase K-Aktivität geht aus 2 unabhängigen Messungen hervor.

3.2.11. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wurde unter Nutzung eines 62-A DS CD-Spektrophotometers (Aviv, Lakewood, NJ/USA) bei 25°C durchgeführt. Die CD-Spektren wurden mit einer Bandweite von 1 nm und einer Integrationszeit von 1 – 3 s aufgenommen; 6 – 12 Einzelspektren wurden akkumuliert. Die Elliptizität $[\Theta]_{MRW}$ pro Aminosäurerest wurde nach Gleichung (30) berechnet.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A \cdot 10} \quad (30)$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$	molare Elliptizität pro Aminosäurerest
Θ	Elliptizität (mdeg)
M_r	molare Masse des Proteins
N_A	Anzahl der Aminosäurereste im Protein
c	Proteinkonzentration ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
d	Schichtdicke der Küvette (cm)

3.2.11.1. *CD-Spektroskopie in TFE*

Die Proben wurden in 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,0, in Gegenwart von 0 – 70 % (v/v) TFE vorbereitet. Die CD-Spektren von RNase A im fernen UV-Bereich (200 – 260 nm) wurden bei einer Konzentration von $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ unter Verwendung einer 0,1 mm Quarzküvette, die im nahen UV-Bereich (250 – 340 nm) bei einer Konzentration von $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ unter Verwendung einer 1 cm Quarzküvette aufgenommen. Die CD-Spektren von A20P-RNase A im fernen UV-Bereich (210 – 260 nm) wurden bei einer Konzentration von $0,1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ unter Verwendung einer 1 mm Quarzküvette, die im nahen UV-Bereich (250 – 340 nm) bei einer Konzentration von $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ unter Verwendung einer 1 cm Quarzküvette aufgenommen.

3.2.11.2. *CD-Spektroskopie der RNase A-Varianten unter nativen Bedingungen*

Die CD-Spektren der RNase A-Varianten wurden in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, bei einer Proteinkonzentration von $1 - 2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ aufgenommen. Für den fernen UV-Bereich (200 – 260 nm) wurde eine 0,1 mm-Quarzküvette, für den nahen UV-Bereich (250 – 340 nm) eine 1 cm-Quarzküvette verwendet.

3.2.12. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde an einem Fluoro-Max 2 Spektrometer (Jobin Yvon, Bensheim) bei 25°C in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, unter Verwendung einer 1 cm × 4 mm-Fluoreszenzküvette durchgeführt.

3.2.12.1. Fluoreszenzspektroskopie in TFE

Die Fluoreszenzspektren von RNase A in TFE wurden von 290 – 350 nm mit einer Schrittweite von 1 nm aufgenommen. Die Bandweite für die Anregung bei 278 nm war 1 nm, die Bandweite für die Emission 10 nm. Die Integrationszeit bei jeder Wellenlänge betrug 0,5 s; 10 Einzelspektren wurden gemittelt. Die Fluoreszenzspektroskopie wurde in Gegenwart von 0 – 70 % (v/v) TFE bei einer Proteinkonzentration von 100 µg · ml⁻¹ durchgeführt.

Für die Aufnahme einer Übergangskurve wurden die Proben mindestens 30 min vorinkubiert und anschließend das Fluoreszenzsignal bei 303 nm über 200 s gemittelt. Die Proben enthielten 130 µg · ml⁻¹ RNase A und 0 – 64 % (v/v) TFE.

Für die Aufnahme einer Übergangskurve von A20P-RNase A wurde diese (100 µg · ml⁻¹) in 0 – 70 % (v/v) TFE für mindestens 30 min inkubiert und anschließend das Fluoreszenzsignal bei 303 nm über 120 s gemittelt. Die Einstellungen entsprachen denen für RNase A.

3.2.12.2. Fluoreszenzspektroskopie in GdnHCl

Zur Aufnahme von Übergangskurven wurde die jeweilige RNase A (50 µg · ml⁻¹) in GdnHCl (0 – 6 M) inkubiert und anschließend die Fluoreszenzspektren von 295 – 315 nm aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 278 nm. Die Bandweite für Emission und Anregung betrug 5 nm, die Integrationszeit 0,2 s; 7 Einzelspektren wurden akkumuliert.

3.2.12.3. Bestimmung der Abhängigkeit der Tyrosinfluoreszenz von der TFE-Konzentration

Zur Bestimmung der Tyrosinfluoreszenz wurden 22 µM *N*-Acetyl-Tyrosinamid in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 0 – 70 % TFE inkubiert und anschließend die Spektren

von 290 – 350 nm aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 278 nm. Die Bandweite für Anregung und Emission betrug 5 nm. Es wurden 5 Einzelspektren akkumuliert.

3.2.13. Bestimmung der Denaturans-induzierten Übergangskurven

Die Fluoreszenzsignale bei 303 nm bzw. die CD-Signale bei 278 nm wurden nach einem Zweizustandsmodell nach Santoro und Bolen (Santoro and Bolen 1988) unter Verwendung der Gleichung (11) mittels nicht-linearer Regression gefittet. Die Fraktion des nativen Proteins (f_N) wurde aus dem gefitteten Signal bestimmt.

3.2.14. Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation wurde unter Verwendung einer Optima XL-A Ultrazentrifuge (Beckman) bei 20°C nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug $0,7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von 20 % (v/v) TFE.

3.2.15. Stopped-flow Fluoreszenzspektroskopie

Die *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie wurde unter Verwendung eines BioSequential DX.17 MV *stopped-flow* Spektrometers (Applied Photophysics, Leatherhead, GB) bei 25°C durchgeführt. Die Integrationszeit betrug 370 μs und die Spaltbreite 7 mm.

3.2.15.1. Intrinsische Tyrosinfluoreszenz zur Detektion von Ent- und Rückfaltungsreaktionen

Zur Verfolgung von Ent- und Rückfaltungsreaktionen von RNase A und A20P-RNase A wurde die Tyrosinfluoreszenz unter Verwendung eines 305 nm *cutoff* Filters detektiert. Die Anregung erfolgte bei 278 nm. In einem typischen Experiment wurden 5 – 10 Einzelmessungen gemittelt. Das Probenvolumen betrug 150 – 200 μl , die Endkonzentration des Proteins 40 μM .

Entfaltungsexperimente: Die Entfaltung von RNase A und A20P-RNase A wurde durch das Mischen eines Volumens RNase-Lösung ($6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \approx 440 \text{ } \mu\text{M}$ in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit 10 Volumina TFE (40 – 76 %, v/v) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, induziert.

Rückfaltungsexperimente: RNase A und A20P-RNase A ($6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) wurden zur vollständigen Entfaltung in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 65 bzw. 60 % (v/v) TFE für mindestens 30 min inkubiert. Die Rückfaltung wurde durch Mischen eines Volumens dieser RNase-Lösung mit 10 Volumina 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, die 0 – 32 % (v/v) TFE enthielten, induziert.

Zur Bestimmung von Rückfaltungsgeschwindigkeiten der bei Entfaltungsexperimenten beobachteten schnell entfaltenden Spezies wurden Doppelsprungexperimente mit A20P-RNase A durchgeführt. Dabei wurde die Entfaltung von A20P-RNase A durch Mischen eines Volumens RNase-Lösung ($36 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit 5 Volumina 78 % (v/v) TFE in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, induziert. Nach 2 s wurde die Rückfaltung durch Mischen eines Volumens dieser Lösung ($6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ A20P-RNase A in 65 % (v/v) TFE, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit 10 Volumina 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, die 0 – 28 % (v/v) TFE enthielten, gestartet.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurden die Daten entsprechend der Anzahl der auftretenden Phasen nach einer einfach- bzw. doppelt-exponentiellen Gleichung (31) angepasst,

$$S = A \cdot \exp(-k \cdot t) + C \quad \text{bzw.} \quad S = A \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + B \cdot \exp(-k_2 \cdot t) + C \quad (31)$$

wobei S das Signal, A und B die jeweiligen Amplituden der Faltungsreaktion, C das *offset* und k bzw. k_1 und k_2 die Geschwindigkeitskonstanten der Faltungsreaktionen darstellen.

3.2.15.2. *Verfolgung von Ent- und Rückfaltungsreaktionen durch Detektion der RNase A-Aktivität gegenüber IDT2*

Zur Verfolgung von Ent- und Rückfaltungsreaktionen von RNase A und A20P-RNase A wurde die Aktivität gegenüber IDT2 (Kelemen et al. 1999) genutzt. Dazu wurde die Fluoreszenzemission unter Verwendung eines 515 nm *cutoff* Filters detektiert. Die Anregung erfolgte bei 490 nm. In einem typischen Experiment wurden 5 – 10 Einzelmessungen gemittelt. Das Probevolumen betrug 150 – 200 μl .

Entfaltungsexperimente: Die Entfaltung von RNase A und A20P-RNase A wurde durch das Mischen eines Volumens RNase-Lösung ($0,050 - 20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit 10 Volumina TFE (50 – 70 %, v/v) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 75 – 100 nM IDT2 induziert.

Rückfaltungsexperimente: RNase A und A20P-RNase A ($20 - 500 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) wurden zur vollständigen Entfaltung in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 60 % (v/v) TFE für mindestens 30 min inkubiert. Die Rückfaltung wurde durch Mischen eines Volumens dieser RNase-Lösung mit 10 Volumina 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, die 0 – 32 % (v/v) TFE und 100 nM IDT2 enthielt, induziert.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgte nach Gleichung (16).

3.2.16. *Stopped-flow* CD-Spektroskopie

Die *stopped-flow* CD-Spektroskopie wurde unter Verwendung eines Pistar 180 CD-Spektrometers (Applied Photophysics, Leatherhead, GB) bei 25°C durchgeführt. Die Messungen erfolgten in einer 20 μl -Zelle mit einem Lichtweg von 1 cm bei 278 nm. In einem typischen Experiment wurden 7 – 8 Einzelmessungen gemittelt.

Entfaltungsexperimente: Die Entfaltung von A20P-RNase A wurde durch das Mischen eines Volumens RNase-Lösung ($8,25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit 10 Volumina TFE (45 – 75 %, v/v) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, induziert. Zur Bestimmung des Signals des nativen Zustands wurde 1 Volumen RNase-Lösung mit 10 Volumina 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, gemischt.

Rückfaltungsexperimente: A20P-RNase A ($8,25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) wurde zur vollständigen Entfaltung in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 60 % (v/v) TFE für mindestens 30 min inkubiert. Die Rückfaltung wurde durch Mischen eines Volumens dieser RNase-Lösung mit 10 Volumina 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, die 0 – 25 % (v/v) TFE enthielt, induziert. Die Messung des Signals des denaturierten Zustands erfolgte durch Mischen eines Volumens RNase-Lösung mit 10 Volumina 60 % (v/v) TFE in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurden die Daten entsprechend der Anzahl der auftretenden Phasen nach einer einfach- bzw. doppelt-exponentiellen Gleichung angepasst (31).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. *Stabilität und Faltung von RNase A und A20P-RNase A in TFE*

Auf Grund der Applikation so genannter *non-conventional media* in enzymtechnischen Anwendungen ist man an der Untersuchung der Stabilität und Faltung von Proteinen in organischen Medien interessiert. In dieser Arbeit sollte die Stabilität und Faltung von RNase A, einem etablierten Modellprotein, in organischen Medien untersucht werden. Da Studien in TFE auf Grund seiner ausgeprägten strukturinduzierenden Eigenschaften von besonderem Interesse sind, wurde dieses als organisches Agens gewählt. Neben der Untersuchung durch spektroskopische Methoden wurde die Methode der limitierten Proteolyse zur Detektion lokaler Strukturänderungen favorisiert. Zur Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeiten unter nativen und nativ-ähnlichen Bedingungen mittels limitierter Proteolyse, die auf Grund des schnellen proteolytischen Abbaus des nativen Enzyms durch Proteinase K für RNase A nicht möglich war, wurden die Studien auf die proteasestabilere Variante A20P-RNase A ausgedehnt.

4.1.1. **Bestimmung der Entfaltungsgeschwindigkeit mittels limitierter Proteolyse**

Bei Proteinen, deren nativer Zustand (N) resistent gegenüber Proteasen ist, kann eine Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeitskonstanten (k_u) wie im Abschnitt 2.1.1.3. beschrieben unter Verwendung der Gleichung (28) erfolgen. Oft wird jedoch bereits der native Zustand eines Proteins durch Proteasen angegriffen und zu Fragmenten (F) abgebaut. Dies kann vor allem unter nativen bzw. nativ-ähnlichen Bedingungen beobachtet werden, bei denen die Entfaltungsgeschwindigkeit eines Proteins sehr klein ist und somit der proteolytische Abbau über den denaturierten Zustand (D) mit der Geschwindigkeitskonstante k_p sehr langsam erfolgt. Unter diesen Bedingungen kann oft der proteolytische Abbau des nativen Proteins mit der Geschwindigkeitskonstante k_{pN} in Gleichung (32) nicht vernachlässigt werden. Diese Tatsache kann auch bei der Verwendung von Proteasen beobachtet werden, bei denen angenommen wurde, dass der native Zustand gegen einen proteolytischen Abbau resistent sein sollte (Arnold and Ulbrich-Hofmann 2001), was eine

Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeiten (k_u) unter diesen Bedingungen nach Gleichung (28) unmöglich macht.



Zur Bestimmung von k_u unter diesen Bedingungen wurde Gleichung (28) durch einen Term, der den proteolytischen Abbau des nativen Zustands berücksichtigt, erweitert (33).

$$k_p = \frac{k_u \cdot [P]_0}{B + [P]_0} + k_{pN} \cdot [P]_0 \quad (33)$$

Dabei ist k_{pN} eine Protease-Protein-spezifische Konstante unter den jeweiligen Bedingungen und entspricht dem k_{cat} / K_M - Wert der Protease für das native Protein ($[N] \ll K_M$). Mit Hilfe dieser Erweiterung wird die Bestimmung von k_u unter der Voraussetzung $k_{pN} < k_u$ auch für Proteasen, die das native Protein abbauen, möglich (Abb. 12, Fall 2). Für $k_{pN} \ll k_u$ wird der 2. Term in Gleichung (33) vernachlässigbar klein, wodurch sich diese zu Gleichung (28) vereinfacht (Abb. 12, Fall 1). Wenn beide Konstanten identisch sind oder $k_{pN} > k_u$ kann nicht zwischen dem proteolytischen Abbau des nativen bzw. denaturierten Proteins unterschieden werden (Abb. 12, Fall 3). Eine Bestimmung von k_u ist unter diesen Bedingungen demzufolge nicht möglich.

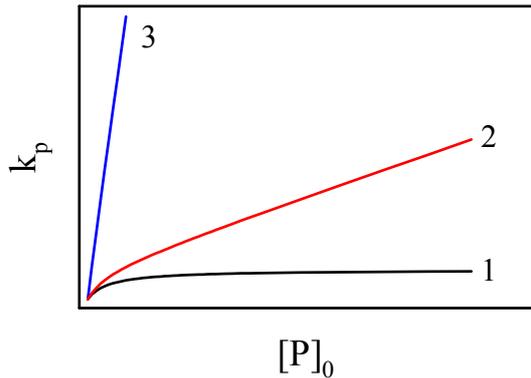


Abb. 12: Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse k_p von der Proteasekonzentration.

1) $k_{pN} \ll k_u$, entspricht einer Resistenz von N gegenüber der Protease; 2) $k_{pN} < k_u$; 3) $k_{pN} \geq k_u$.

4.1.2. Qualitative Charakterisierung des proteolytischen Abbaus von RNase A und A20P-RNase A in Gegenwart von TFE

Die Analyse des Entfaltungsprozesses von RNase A mittels limitierter Proteolyse wurde zunächst in Weiterführung der Diplomarbeit (Köditz 1998) qualitativ durch die Detektion des sich in Abhängigkeit der TFE-Konzentration ändernden Fragmentmusters in der SDS-PAGE verfolgt. Außerdem wurden durch die Bestimmung von primären Fragmenten Regionen, die bei der Denaturierung als erste proteolytisch zugänglich sind, identifiziert. Als Proteasen dienten Proteinase K und Subtilisin Carlsberg. In Abb. 13 sind typische, sich aus dem proteolytischen Abbau von RNase A in 0, 20 und 40 % (v/v) TFE ergebende Fragmentmuster als Funktion der Zeit dargestellt. Unter nativen Bedingungen wird RNase A unter Spaltung der Peptidbindung Ala20-Ser21 durch Proteinase K und Subtilisin Carlsberg zur so genannten RNase S abgebaut (Richards and Vithayathil 1959; Rauber et al. 1978). Das große Fragment von RNase S (Fragment 21-124), welches auch S-Protein genannt wird, ist im SDS-PAGE-Gel sichtbar (Abb. 13B). Überraschenderweise konnte in 20 % (v/v) TFE durch beide Proteasen keine Fragmentierung von RNase A beobachtet werden (Abb. 13C), wohingegen in 40 % (v/v) TFE wiederum ein Abbau von RNase A auftrat (Abb. 13D). Im Gegensatz zu den nativen Bedingungen, unter denen nur das S-Protein im SDS-PAGE-Gel sichtbar war, wurden in 40 % (v/v) TFE verschiedene Fragmente detektiert. Der gleiche Trend wurde für den proteolytischen Abbau von RNase A durch Elastase gefunden (Köditz 1998). Jedoch wurde auf Grund der geringen Stabilität von Elastase in höheren TFE-Konzentrationen auf weitere Untersuchungen verzichtet.

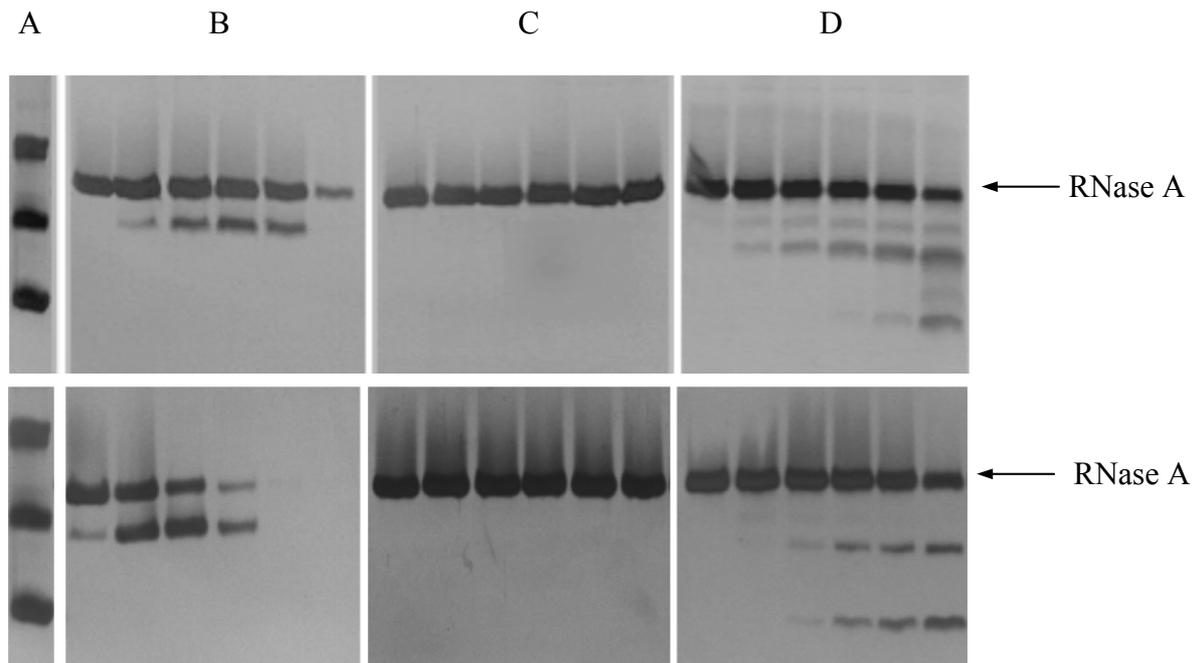


Abb. 13: SDS-PAGE des proteolytischen Abbaus von RNase A durch Subtilisin Carlsberg (oben) und Proteinase K (unten) in TFE.

RNase A wurde in Gegenwart von Subtilisin Carlsberg und Proteinase K im Verhältnis 50:1 (w/w) in (B) 0, (C) 20 und (D) 40 % (v/v) TFE bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 s, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h und 6 h abgestoppt (von links nach rechts in jedem SDS-PAGE-Gel). In (A) sind die Referenzproteine Sojabohnentrypsininhibitor (21 kDa), Cytochrom c (12,4 kDa) und Trypsininhibitor aus Rinderpankreas (6,5 kDa) gezeigt.

Die in TFE-Konzentrationen > 40 % (v/v) entstehenden Fragmente wurden mittels *reversed phase* (RP-) HPLC getrennt und anschließend durch *matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry* (MALDI-MS) und N-terminale Proteinsequenzierung analysiert (Köditz 1998; Köditz et al. 2002). So konnten für Subtilisin Carlsberg und Proteinase K die N-terminalen Fragmente 1–76 und 1–79 sowie die komplementären C-terminalen Fragmente 77–124 und 80–124 identifiziert werden. Dadurch sind die Peptidbindungen 76–77 und 79–80 von RNase A als die unter TFE-denaturierenden Bedingungen als erste zugängliche Schnittstellen (primäre Schnittstellen) bestimmt. Auf Grund der geringen Konzentration des in Abb. 13D (oben) sichtbaren Fragments mit der größten molekularen Masse konnte dieses nicht identifiziert werden. In Analogie zu Abb. 13B handelte es sich dabei wahrscheinlich um das Fragment 21–124.

Zur Analyse des Entfaltungswegs von A20P-RNase A, die sich im nativen Zustand durch eine hohe Stabilität gegenüber Proteinase K auszeichnet (siehe 2.3.3.), wurde der proteolytische Abbau von A20P-RNase A durch Proteinase K in Abhängigkeit von der

TFE-Konzentration analog zur RNase A mittels SDS-PAGE analysiert. In Abb. 14 sind die typischen, sich aus dem proteolytischen Abbau von A20P-RNase A in 0, 20 und 50 % (v/v) TFE ergebenden Fragmentmuster als Funktion der Zeit dargestellt. Im Gegensatz zur RNase A konnte im gleichen Zeitraum unter nativen Bedingungen weder eine Abnahme der Bande der intakten A20P-RNase A noch das Entstehen von Fragmenten im SDS-PAGE-Gel beobachtet werden (Abb. 14B). Diese drastische Abnahme der proteolytischen Angreifbarkeit ist auf die Einführung eines Prolins in Position 20 zurückzuführen (Markert et al. 2001), welche der P₁-Position (Schechter and Berger 1967) beim Abbau von RNase A durch Proteinase K entspricht. Durch die Einführung eines Prolins in P₁-Stellung wird die Bindung des Substrates im aktiven Zentrum von Proteinase K gestört (Brömme et al. 1986), was zu einer höheren proteolytischen Stabilität von A20P-RNase A führt. In 20 % (v/v) TFE wurde wie für RNase A keine Fragmentierung beobachtet (Abb. 14C). Erst in TFE-Konzentrationen > 30 % (v/v) konnte ein Abbau von A20P-RNase A durch Proteinase K beobachtet werden, der zur Entstehung von Fragmenten führte. Erwartungsgemäß war das Fragmentmuster (Abb. 14D) dem von RNase A in 40 % (v/v) TFE (Abb. 13D) ähnlich.

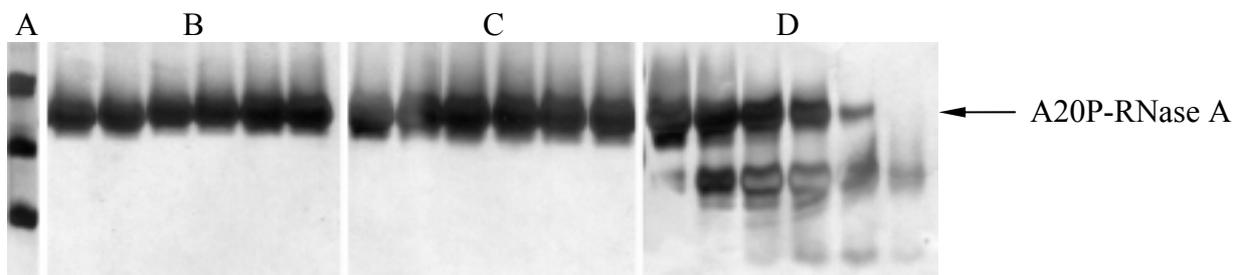


Abb. 14: SDS-PAGE des proteolytischen Abbaus von A20P-RNase A durch Proteinase K in TFE.

A20P-RNase A wurde in Gegenwart von Proteinase K im Verhältnis 50:1 (w/w) in (B) 0 und (C) 20 % (v/v) TFE bzw. im Verhältnis 20:1 (w/w) in (D) 50 % (v/v) TFE bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 s, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h und 6 h abgestoppt (von links nach rechts in jedem SDS-PAGE-Gel). In (A) sind die Referenzproteine Sojabohmentrypsininhibitor (21 kDa), Cytochrom c (12,4 kDa) und Trypsininhibitor aus Rinderpankreas (6,5 kDa) gezeigt.

4.1.3. Proteinase K-Aktivität in TFE

Zur Ermittlung einer von der Proteaseaktivität unabhängigen proteolytischen Angreifbarkeit von RNase A war die Bestimmung der Proteinase K-Aktivität in Abhängigkeit von der TFE-Konzentration notwendig. Die Aktivität wurde gegenüber *N*-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-

Nitroanilid als Substrat wie unter 3.2.10.1 beschrieben bestimmt. Nach einem leichten Anstieg der Proteinase K-Aktivität in 5 % (v/v) TFE nahm diese mit steigender TFE-Konzentration exponentiell ab (Abb. 15).

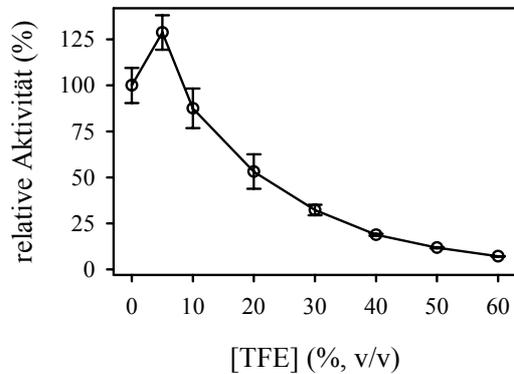


Abb. 15: Aktivität von Proteinase K in Abhängigkeit von der TFE-Konzentration. Die Aktivität von Proteinase K wurde gegenüber *N*-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilid als Substrat in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, bei 25°C bestimmt (3.2.10.1).

4.1.4. Quantifizierung des proteolytischen Abbaus von RNase A und A20P-RNase A durch Proteinase K

Nach der qualitativen Charakterisierung des proteolytischen Abbaus von RNase A und A20P-RNase A sollte die Proteolysekonstante (k_p) in Abhängigkeit von der Proteasekonzentration (Proteinase K) in Abwesenheit und in Gegenwart von TFE bestimmt werden. Dazu wurden Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gele densitometrisch ausgewertet (3.2.7.) und die jeweilige Proteolysekonstante k_p wie unter 3.2.8.1. beschrieben bestimmt.

Die Proteolysekonstanten von RNase A und A20P-RNase A sind als Funktion der Proteinase K-Konzentration für verschiedene TFE-Konzentrationen in Abb. 16 dargestellt. Unter nativen Bedingungen (0 % TFE, v/v) weist A20P-RNase A im Gegensatz zu RNase A eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber der Spaltung durch Proteinase K auf, was sich in den geringeren k_p -Werten widerspiegelt (Abb. 16C). Im Gegensatz zur RNase A, bei der ein linearer Anstieg der k_p -Werte in Abhängigkeit von der Proteasekonzentration beobachtet wurde (Abb. 16A), zeigten die k_p -Werte für A20P-RNase A mit steigender Proteasekonzentration ein Sättigungsverhalten (Abb. 16B). Für die k_p -Proteasekonzentrationsabhängigkeit von A20P-RNase A wurde in 0 % (v/v) TFE nach dem Abknicken ein lineares Ansteigen der k_p -Werte mit steigender Proteasekonzentration beobachtet (Abb. 16C). Dieser Anstieg entspricht der Geschwindigkeitskonstante des Abbaus von A20P-RNase A über den nativen Zustand (k_{pN}) (siehe 4.1.1.). Bei TFE-Konzentrationen

$\geq 5\%$ (v/v) war dieser lineare Anstieg vernachlässigbar klein. Während für RNase A erst ab einer TFE-Konzentration von 40 % (v/v) ein Sättigungsverhalten beobachtet werden konnte (nicht gezeigt), was die Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeiten ermöglichte, war dies für A20P-RNase A über den gesamten TFE-Konzentrationsbereich (0 – 45 %, v/v) auf Grund der erhöhten proteolytischen Resistenz des nativen Zustands gegenüber Proteinase K möglich. So ist bei A20P-RNase A die Proteolysekonstante des nativen Zustands (k_{pN}) stets kleiner als die Entfaltungsgeschwindigkeit (k_u), wodurch ein Abknicken der Proteolysekonstanten mit steigender Proteasekonzentration beobachtet werden konnte.

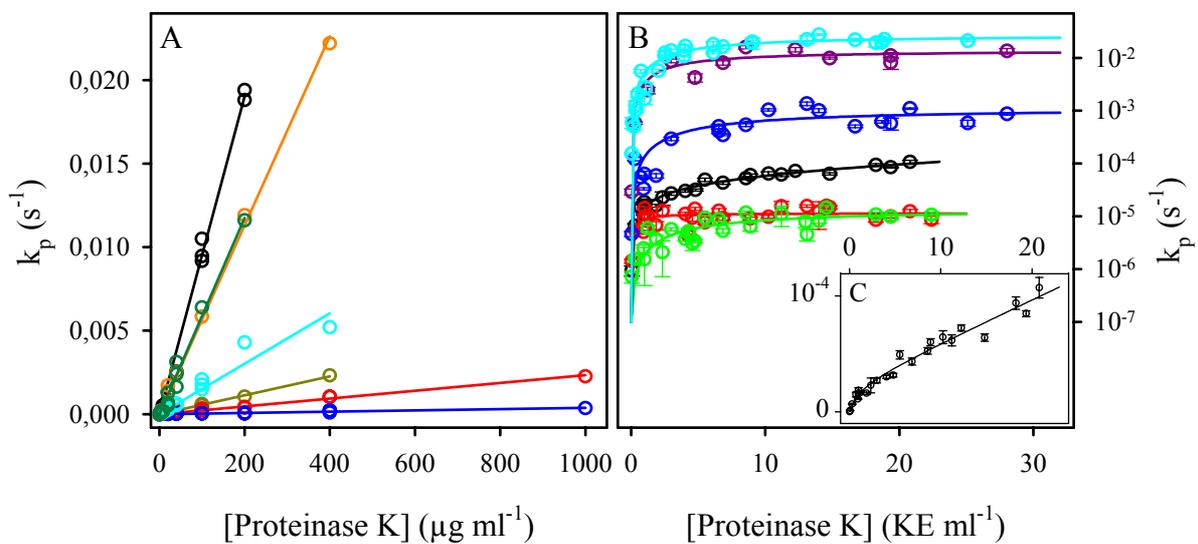


Abb. 16: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des proteolytischen Abbaus (k_p) von RNase A (A) und A20P-RNase A (B, C) von der Proteinase K-Konzentration für verschiedene TFE-Konzentrationen bei 25°C.

Die k_p -Werte wurden aus der zeitabhängigen Abnahme der Peakfläche der Bande der intakten RNase in Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen bestimmt. In (A) sind die Abhängigkeiten der k_p -Werte von der Proteasekonzentration für RNase A in 0 (●), 5 (●), 10 (●), 30 (●), 40 (●), 50 (●) und 60 % (●) (v/v) TFE, in (B) die für A20P-RNase A in 0 (●), 10 (●), 20 (●), 30 (●), 35 (●) und 40 % (●) (v/v) TFE dargestellt. (C) zeigt für A20P-RNase A die direkte Auftragung der Abhängigkeit der k_p -Werte von der Proteasekonzentration in 0 % (v/v) TFE. 1 KE \sim 100 μ g Proteinase K.

4.1.5. Relative proteolytische Angreifbarkeit von RNase A und Entfaltungskonstanten von A20P-RNase A in TFE

Die relative proteolytische Angreifbarkeit von RNase A wurde aus den Anstiegen der k_p -Proteasekonzentrationsabhängigkeiten (Abb. 16A) wie unter 3.2.8.2. beschrieben bestimmt. Auf diesem Wege wurde der Einfluss des TFE auf die Protease-Aktivität eliminiert. Während die relative proteolytische Angreifbarkeit über 30 % (v/v) TFE stark ansteigt (Abb. 17A), was mit dem Verlust der Tertiärstruktur einhergeht (Abb. 19A), sinkt diese überraschenderweise bis 20 % (v/v) TFE um 2 Größenordnungen gegenüber 0 % (v/v) TFE ab (Abb. 17A).

Für A20P-RNase A wurden aus den k_p -Proteasekonzentrationsabhängigkeiten die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (k_u) nach Gleichung (33) ermittelt. Die Entfaltungskonstanten von A20P-RNase A und RNase A in 45 bzw. 40 % (v/v) TFE wurden unter entfaltungslimitierenden Bedingungen, d.h. bei hohen Proteasekonzentrationen, bestimmt (3.2.8.3.). Bis 20 % (v/v) TFE ist keine signifikante Änderung der Entfaltungsgeschwindigkeit von A20P-RNase A zu beobachten (Abb. 17B). Über 20 % (v/v) TFE steigt die Entfaltungsgeschwindigkeit stark an. Diese knickt bei TFE-Konzentrationen > 35 % (v/v) ab und nähert sich der mittels spektroskopischen Methoden beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Entfaltungsreaktion an (Abb. 34B). Die durch limitierte Proteolyse bestimmte Entfaltungsgeschwindigkeit von RNase A in 40 % (v/v) TFE ist mit der von A20P-RNase A vergleichbar.

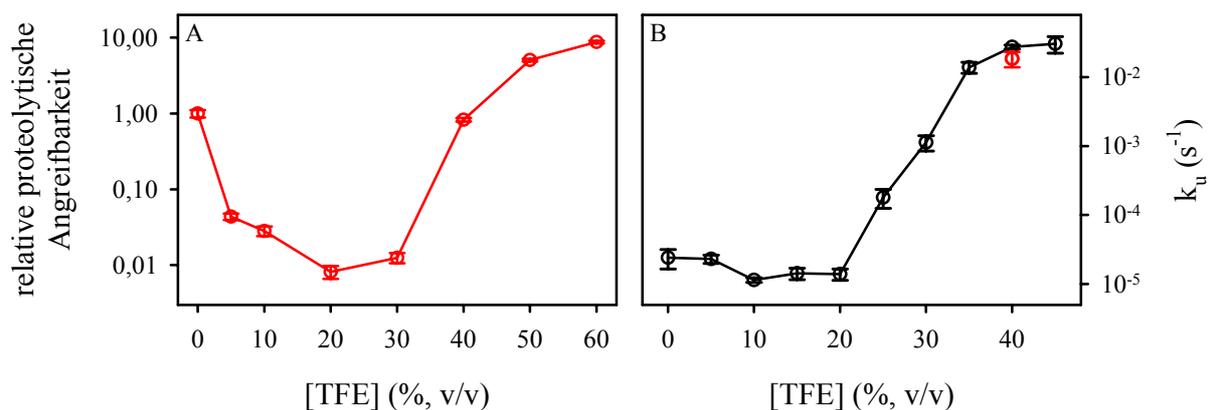


Abb. 17: Relative proteolytische Angreifbarkeit und Entfaltungskonstanten von RNase A bzw. A20P-RNase A in TFE.

Die relative proteolytische Angreifbarkeit von RNase A (A) und die Entfaltungskonstante k_u von A20P-RNase A (●) bzw. RNase A (◐) (B) wurden in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, bei 25°C wie unter 3.2.8. beschrieben bestimmt.

4.1.6. Analytische Ultrazentrifugation

Um ausschließen zu können, dass eine Aggregation oder Oligomerisierung von RNase A die Abnahme der proteolytischen Angreifbarkeit von RNase A in 5 – 30 % (v/v) TFE verursachte, wurde RNase A in Abwesenheit von TFE und in Gegenwart von 20 % (v/v) TFE mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht (3.2.14.). Durch Vergleich der Extinktion der Probe vor und nach einem Geschwindigkeitslauf kann auf ein Auftreten irreversibler Aggregationen geschlossen werden. Durch den Gleichgewichtslauf können Art und Molmassen eventuell auftretender Oligomere identifiziert werden. Das Ergebnis der analytischen Ultrazentrifugation zeigte, dass RNase A in 20 % (v/v) TFE vollständig als Monomer vorliegt und so Aggregationen oder Oligomerisierungen als Ursache für die Abnahme der proteolytischen Angreifbarkeit ausgeschlossen werden können. In Abb. 18 ist der Gleichgewichtslauf der analytischen Ultrazentrifugation dargestellt. Die für RNase A in 20 % (v/v) TFE erhaltene Molmasse ist auf Grund der höheren Dichte des TFE/Puffer-Gemisches etwas geringer als die Molmasse für das Puffersystem.

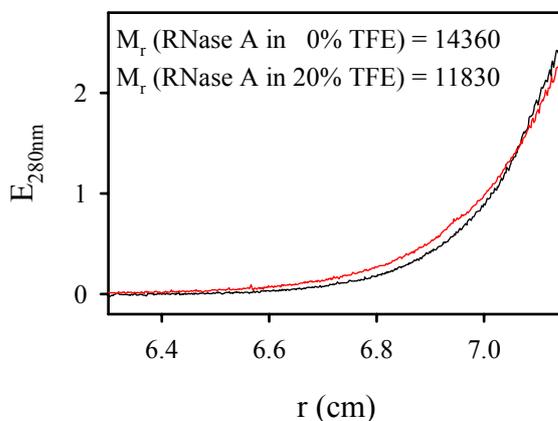


Abb. 18: Analytische Ultrazentrifugation von RNase A.

RNase A wurde bei 20°C und 40000 rpm für 30 h equilibriert. Die Messung wurde bei einer Proteinkonzentration von $0,7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in 0 (—) und 20 % (—) (v/v) TFE durchgeführt.

4.1.7. CD-Spektren von RNase A und A20P-RNase A in TFE

Um die TFE-induzierten Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur von RNase A und A20P-RNase A zu untersuchen, wurden deren CD-Spektren im nahen und fernen UV-Bereich in TFE-Konzentrationen zwischen 0 und 70 % (v/v) aufgenommen (Abb. 19). Im nahen UV-Bereich, welcher die Tertiärstruktur charakterisiert, wurden bis zu einer TFE-Konzentration von 30 % (v/v) keine signifikanten Änderungen sowohl bei RNase A als auch bei A20P-RNase A beobachtet (Abb. 19A und C). Über 30 % (v/v) TFE zeigten die Spektren

eine zunehmende Zerstörung der Tertiärstruktur an. Bei TFE-Konzentrationen $\geq 50\%$ (v/v) ist die Tertiärstruktur vollständig zerstört, was durch ein gleichbleibendes CD-Signal ersichtlich wurde (Abb. 19A und C).

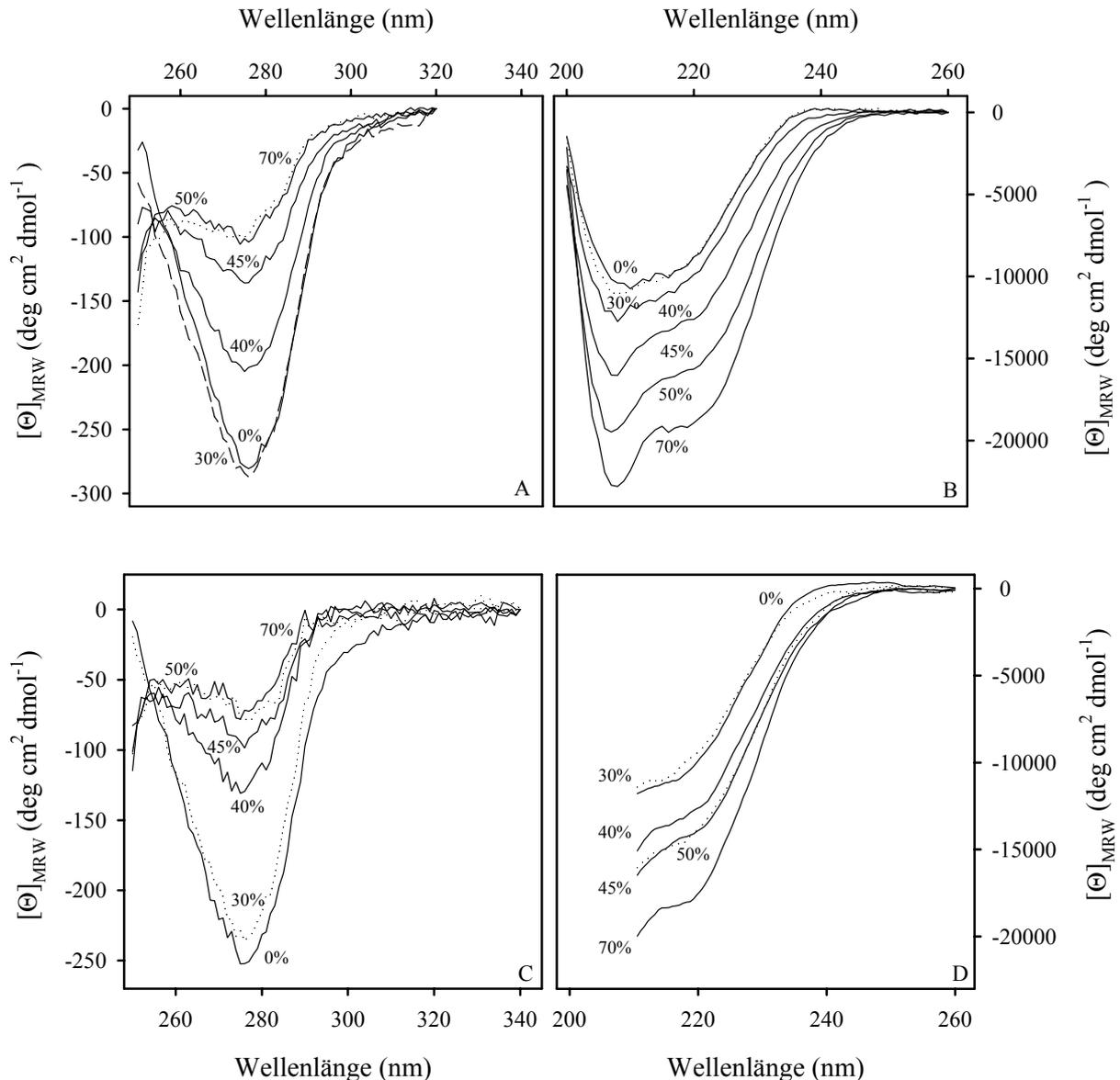


Abb. 19: CD-Spektren von RNase A und A20P-RNase A in TFE.

Die CD-Spektren von RNase A im nahen (A) und im fernen UV-Bereich (B) sowie von A20P-RNase A im nahen (C) und fernen (D) UV-Bereich wurden in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Abwesenheit von TFE und in Gegenwart von 30, 40, 45, 50 und 70 % (v/v) TFE wie unter 3.2.11. beschrieben aufgenommen.

Wie für den nahen UV-Bereich konnten auch im fernen UV-Bereich, der die Sekundärstruktur charakterisiert, bis zu einer TFE-Konzentration von 30 % (v/v) keine Änderungen des CD-Signals detektiert werden (Abb. 19B und D). Über 30 % (v/v) TFE stieg die negative

Elliptizität an, was auf eine Induktion zusätzlicher Sekundärstruktur (hauptsächlich helikaler Struktur) schließen lässt. Im Gegensatz zu RNase A, wo die negative Elliptizität mit steigender TFE-Konzentration stetig zunahm, wurde bei A20P-RNase A eine Stagnation der Helixinduktion zwischen 45 und 50 % (v/v) TFE beobachtet. Erst in TFE-Konzentrationen > 50 % (v/v) konnte eine weitere Zunahme des CD-Signals detektiert werden (Abb. 19D).

4.1.8. Fluoreszenzspektren von RNase A in TFE

Als alternative Methode zur Detektion von Tertiärstrukturänderungen wurden Fluoreszenzspektren von RNase A in 0 – 70 % (v/v) TFE (Abb. 20) aufgenommen. Da RNase A neben 6 Tyrosinen keine Tryptophane besitzt, trat keine wie bei tryptophanhaltigen Proteinen beobachtete Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums (von ca. 335 zu 350 nm) durch Denaturierung des Proteins auf. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei RNase A zwischen 300 und 310 nm. Während der Denaturierung von RNase A stieg die Fluoreszenzintensität stark an, da das durch die Disulfidbrücken auftretende Quenchen der Fluoreszenz im nativen Zustand abnimmt. So kann durch den Anstieg des Fluoreszenzsignals die Zerstörung der Tertiärstruktur verfolgt werden.

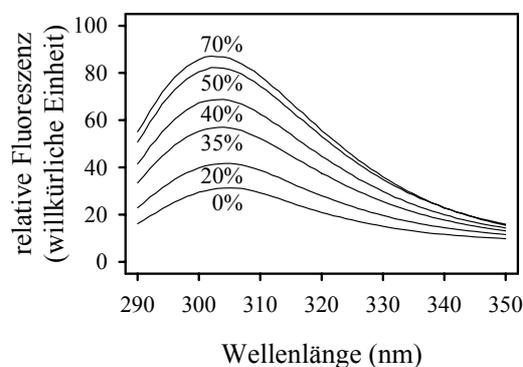


Abb. 20: Fluoreszenzspektren von RNase A in TFE.

Die Fluoreszenzspektren wurden in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, in Abwesenheit von TFE und in Gegenwart von 20, 35, 40, 50 und 70 % (v/v) TFE wie unter 3.2.12.1. beschrieben aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 278 nm.

4.1.9. Einfluss von TFE auf die Fluoreszenz von *N*-Acetyl-Tyrosinamid

Wie in 2.1.1.1. ausgeführt, wird zur Bestimmung von ΔG^0 eine lineare Abhängigkeit des Signals im prä- und posttransitionalen Bereich als auch ein linearer Zusammenhang zwischen den ΔG -Werten und der Denaturationskonzentration vorausgesetzt. Durch Verwendung von Fluorophoren wie z.B. *N*-Acetyl-Tyrosinamid können Abweichungen von den linearen Beziehungen, die die Bestimmung von ΔG^0 beeinträchtigen können, detektiert werden. So

wurde der Einfluss von TFE auf die Fluoreszenz von *N*-Acetyl-Tyrosinamid in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, bei 25°C wie unter 3.2.12.3. beschrieben untersucht (Abb. 21). Die Tyrosinfluoreszenz stieg mit zunehmender TFE-Konzentration auf ein Maximum bei ca. 20 % (v/v) TFE an und fiel in TFE-Konzentrationen > 30 % (v/v) wieder ab, wobei eine leichte Blauverschiebung der Spektren auftrat. Interessanterweise wurde in 20 % (v/v) TFE, wo sich das Intensitätsmaximum der Fluoreszenz des freien Tyrosins befindet, auch die geringste proteolytische Angreifbarkeit von RNase A (Abb. 17A) beobachtet. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität korreliert mit der Abnahme des Anteils an nicht-gebundenem Wasser in TFE, der bis ca. 20 % (v/v) TFE auf ca. 0 % sinkt (Gast et al. 1999). Die beobachtete Abnahme der Fluoreszenzintensität in TFE-Konzentrationen > 20 % (v/v) könnte durch die Umlagerung der TFE/Wasser-Cluster verursacht werden (siehe 2.2.1., Gast et al. 1999). Da die Fluoreszenzintensität des *N*-Acetyl-Tyrosinamids keine lineare Abhängigkeit von der TFE-Konzentration aufweist (Abb. 21B), kann die Bestimmung von ΔG^0 aus TFE-induzierten Fluoreszenzübergangskurven beeinträchtigt sein.

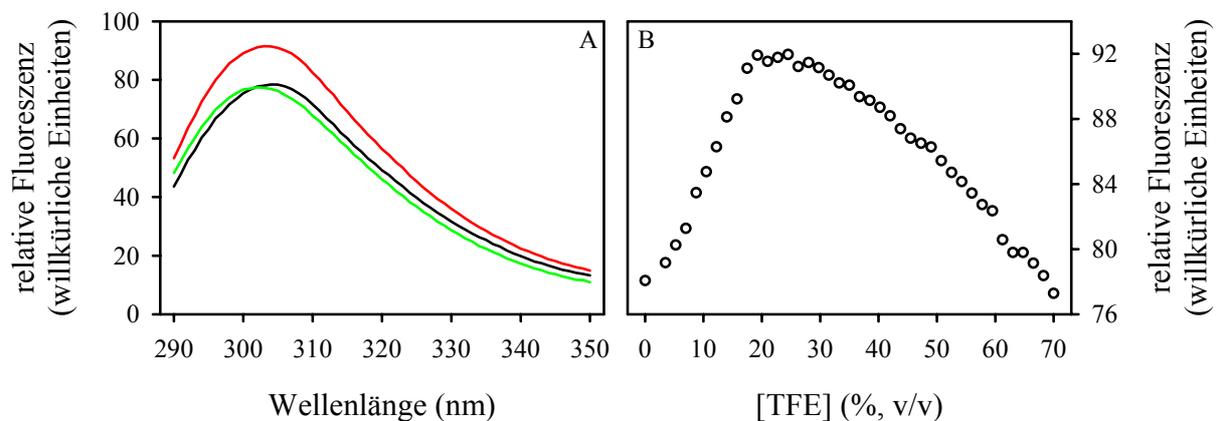


Abb. 21: Abhängigkeit der Tyrosinfluoreszenz von der TFE-Konzentration.

In (A) sind die Fluoreszenzspektren von *N*-Acetyl-Tyrosinamid in Abwesenheit von TFE (—) und in Gegenwart von 20 (—) und 70 % (—) (v/v) TFE gezeigt. (B) zeigt die Fluoreszenzintensität bei 303 nm in Abhängigkeit von der TFE-Konzentration. Die Tyrosinfluoreszenz wurde zwischen 0 – 70 % (v/v) TFE in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, bei 25°C wie unter 3.2.12.3. beschrieben bestimmt. Die Anregung erfolgte bei 278 nm.

4.1.10. TFE-induzierte Übergangskurven von RNase A und A20P-RNase A

Um die TFE-induzierte Entfaltung von RNase A und A20P-RNase A zu untersuchen, wurden Übergangskurven aus den CD-Signalen bei 278 nm und den Fluoreszenzsignalen bei 303 nm

erstellt (Abb. 22A). Neben der Zerstörung der Tertiärstruktur wurde auch die Induktion von nicht-nativen helikalen Strukturen durch Auftragung der CD-Signale bei 222 nm erfasst (Abb. 22B).

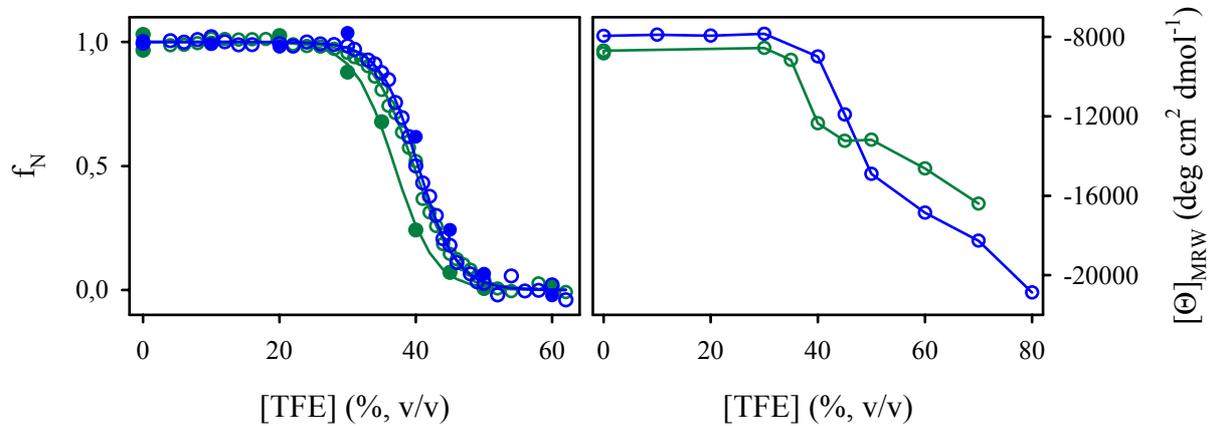


Abb. 22: Übergangskurven von RNase A und A20P-RNase A in TFE bei 25°C.

(A) zeigt den Anteil an nativem Protein (f_N), erhalten durch die Fluoreszenzsignale bei 303 nm (○, ●) bzw. CD-Signale bei 278 nm (●, ●) von RNase A (○, ●) und A20P-RNase A (○, ●). (B) zeigt das CD-Signal bei 222 nm von RNase A (○) und A20P-RNase A (○).

Während die CD- und Fluoreszenzsignale identische Ergebnisse für RNase A lieferten, traten für A20P-RNase A Unterschiede auf. So waren die aus der Fluoreszenzspektroskopie erhaltenen Übergangskurven für RNase A und A20P-RNase A nahezu identisch, wohingegen die CD-Übergangskurve von A20P-RNase A bereits eine Zerstörung der Tertiärstruktur in niedrigeren TFE-Konzentrationen offenbarte (Abb. 22A). Für A20P-RNase A konnte auch bereits in niedrigeren TFE-Konzentrationen eine Induktion von helikalen Strukturen abgeleitet werden (Abb. 22B). Diese Helixinduktion stagnierte zunächst zwischen 45 und 50 % (v/v) TFE. Erst nach dem vollständigen Verlust der Tertiärstruktur in TFE-Konzentrationen > 50 % (v/v) erfolgte eine weitere Induktion von helikalen Strukturen. Die Helixinduktion zwischen 30 und 50 % (v/v) TFE (Abb. 22B) geht mit dem kooperativen Zusammenbruch der Tertiärstruktur einher (Abb. 22A), wohingegen der Bereich > 50 % (v/v) TFE durch die Eigenschaften des Lösungsmittels, in unstrukturierten Proteinen helikale Strukturen zu induzieren, geprägt ist. Das CD-Signal bei 222 nm zeigte, dass das Ausmaß der Induktion von helikalen Strukturen in A20P-RNase A geringer als das für RNase A ist (Abb. 22B).

Aus den Übergangskurven wurden nach Gleichung (11) und (9) die thermodynamischen Parameter ΔG^0 , $m_{\Delta G}$ und $[\text{TFE}]_{1/2}$ ermittelt (Tab. 2). Da die aus den TFE-Übergangskurven ermittelten ΔG^0 -Werte mit denen aus der GdnHCl-induzierten Übergangskurve vergleichbar sind (Tab. 5), kann von einer geringen Beeinträchtigung der ΔG^0 -Bestimmung ausgegangen werden (siehe 4.1.9.). Für RNase A lieferten Fluoreszenz- und CD-Übergangskurven ähnliche ΔG^0 - und $[\text{TFE}]_{1/2}$ -Werte, während für A20P-RNase A ein aus der CD-Übergangskurve um ca. 3 % (v/v) kleinerer $[\text{TFE}]_{1/2}$ -Wert (40 vs. 37 %) ermittelt wurde. Dass aus beiden Übergangskurven von A20P-RNase A trotzdem ähnliche ΔG^0 -Werte erhalten wurden, ist auf die unterschiedliche Kooperativität zurückzuführen. Insgesamt erscheint A20P-RNase A etwas instabiler.

Tab. 2: Thermodynamische Parameter von RNase A und A20P-RNase A in TFE bei 25°C.

Die thermodynamischen Parameter wurden aus den mittels Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie bei 303 nm bzw. 278 nm aufgenommenen TFE-induzierten Übergangskurven nach Gl. (11) und Gl. (9) bestimmt. Zur Ermittlung dieser Parameter wurde eine lineare freie Enthalpiebeziehung nach (Santoro and Bolen 1988) vorausgesetzt.

	RNase A		A20P-RNase A	
	Fluoreszenz	CD _{278 nm}	Fluoreszenz	CD _{278 nm}
$[\text{TFE}]_{1/2}$ (% v/v)	40,3 ± 0,2	41,4 ± 0,7	39,7 ± 0,2	36,9 ± 0,6
$m_{\Delta G}$ (kJ · mol ⁻¹ · M ⁻¹)*	-6,3 ± 0,3	-5,9 ± 1,2	-5,7 ± 0,3	-6,0 ± 0,9
ΔG^0 bei 25°C (kJ · mol ⁻¹)	35,6 ± 1,7	33,9 ± 7,6	31,4 ± 1,5	30,9 ± 5,1

* 1 % (v/v) TFE entspricht 0,1391 M.

4.1.11. RNase A-Aktivität in TFE

Der Einfluss von TFE auf die Aktivität von RNase A wurde gegenüber cCMP als Substrat wie unter 3.2.9.1. beschrieben bestimmt (Abb. 23). In niedrigen TFE-Konzentrationen (< 20 %, v/v) wurde eine leichte Aktivierung von RNase A beobachtet, während über 30 % (v/v) TFE die Abnahme der Aktivität mit der Zerstörung der Tertiärstruktur einhergeht. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu anderen chemischen Denaturanzien wie z.B. GdnHCl und Harnstoff (Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000), bei denen eine Inaktivierung der RNase A-Aktivität vor Zerstörung der Tertiärstruktur eintritt.

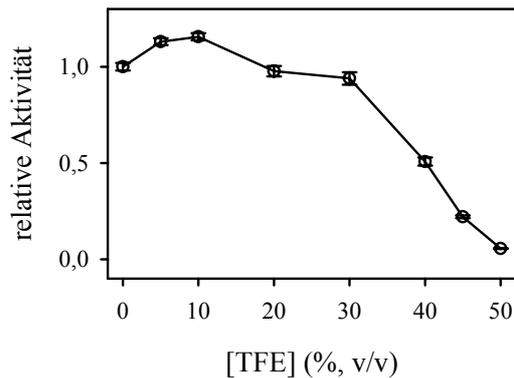


Abb. 23: RNase A-Aktivität in TFE.

Die RNase A-Aktivität wurde gegenüber cCMP als Substrat in Abwesenheit von TFE und in Gegenwart von 5, 10, 20, 30, 40, 45 und 50 % (v/v) TFE wie unter 3.2.9.1. beschrieben bei 25°C bestimmt.

4.1.12. *Stopped-flow* Faltungskinetiken

Zur weiteren Charakterisierung der Faltung von RNase A und A20P-RNase A in TFE wurden neben den Gleichgewichtsuntersuchungen auch kinetische Studien durchgeführt, bei denen Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltungsreaktion in Abhängigkeit von der TFE-Konzentration bestimmt wurden. Die Initiierung von Ent- bzw. Rückfaltungsreaktionen erfolgte durch Mischen zweier Lösungen unter Verwendung einer *stopped-flow* Apparatur. Hierbei enthielt Lösung 1 native RNase (ohne TFE) für Entfaltungsreaktionen bzw. TFE-denaturierte RNase für Rückfaltungsreaktionen. Lösung 2 enthielt Puffer ohne bzw. mit TFE verschiedener Konzentrationen (0 – 76 %, v/v), der entweder zur Denaturierung (Entfaltungsexperiment) oder zur Rückfaltung (Rückfaltungsexperiment) des Proteins führte. Nach Mischen beider Lösungen konnte die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen nativem und denaturiertem Zustand durch Detektion der entsprechenden Signaländerung beobachtet werden. Zur Verfolgung solcher Faltungsreaktionen wurden die Änderung der intrinsischen Tyrosinfluoreszenz, des CD-Signals bei 278 nm und der Aktivität gegenüber IDT2 als Substrat genutzt.

4.1.12.1. Verfolgung von Faltungsreaktionen über die Detektion der intrinsischen Tyrosinfluoreszenz

Die Verfolgung von Faltungsreaktionen (Ent- bzw. Rückfaltung) unter Nutzung der Tyrosinfluoreszenz wurde wie unter 3.2.15.1. beschrieben durchgeführt. Wie schon unter 4.1.9. erläutert, steigt das Fluoreszenzsignal von RNase A auf Grund der abnehmenden Fluoreszenzlöschung durch Disulfidbindungen während der Denaturierung an bzw. kann eine Abnahme des Fluoreszenzsignals bei Rückfaltung des Proteins beobachtet werden (Abb. 24). Die erhaltenen Kinetiken für Ent- und Rückfaltungsreaktion von RNase A und

A20P-RNase A konnten nach einer doppelt-exponentiellen Funktion angepasst werden. In Abb. 24 sind stellvertretend zwei Kinetiken von A20P-RNase A dargestellt.

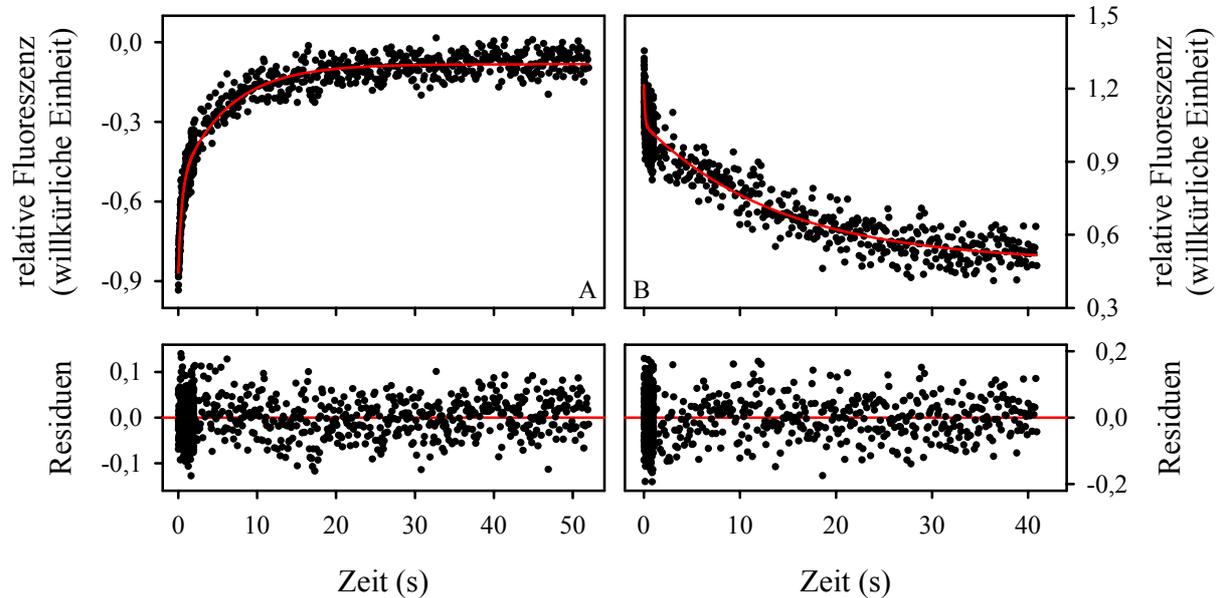


Abb. 24: Ent- und Rückfaltungskinetik von A20P-RNase A in TFE bei 25°C, detektiert mittels intrinsischer Tyrosinfluoreszenz.

In (A) ist die Entfaltungskinetik von A20P-RNase A in 69,1 % (v/v) TFE und in (B) die Rückfaltungskinetik von A20P-RNase A in 13,6 % (v/v) TFE mit der entsprechenden Anpassung nach einer doppelt-exponentiellen Funktion (oben) und den entsprechenden Residuen (unten) gezeigt. Die Kinetiken wurden bei einer Anregung von 278 nm und einer Integralemission von > 305 nm bei 25°C aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 40 μ M in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0.

Die durch Anpassung der Kinetiken erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind in Abb. 25 als Funktion der TFE-Konzentration dargestellt. Für die Entfaltungsreaktion von RNase A und A20P-RNase A wurden zwei für beide Proteine identische Entfaltungsäste im Chevron-Plot erhalten. Während der Entfaltungsast der langsamen Phase in TFE-Konzentrationen > 55 % (v/v) abknickt, weisen die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase eine lineare Abhängigkeit von der TFE-Konzentration im Chevron-Plot auf (Abb. 25). Anzumerken ist, dass die schnelle Phase auf Grund der kleinen Amplitude in TFE-Konzentrationen zwischen 40 – 55 % (v/v) vor allem bei RNase A nur schwer zu detektieren war.

Für die Rückfaltungsreaktion wurden wie für die Entfaltungsreaktion zwei Phasen gefunden, die für beide Enzyme ähnlich sind. Die Detektion der schnellen Phase erwies sich

auf Grund hoher Geschwindigkeitskonstanten von bis zu 40 s^{-1} als schwierig. Für beide Phasen wurde eine nicht-lineare Abhängigkeit der $\ln k_{\text{obs}}$ -Werte von der TFE-Konzentration beobachtet. Während die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Rückfaltungsphase in TFE-Konzentrationen $> 20 \%$ (v/v) eine starke Abhängigkeit von der TFE-Konzentration zeigten, blieben sie in TFE-Konzentrationen $< 20 \%$ (v/v) unverändert. Die Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Rückfaltungsphase stiegen langsam mit sinkender TFE-Konzentration an, wobei der entsprechende Ast im Chevron-Plot in TFE-Konzentrationen $< 15 \%$ (v/v) abknickte (Abb. 25).

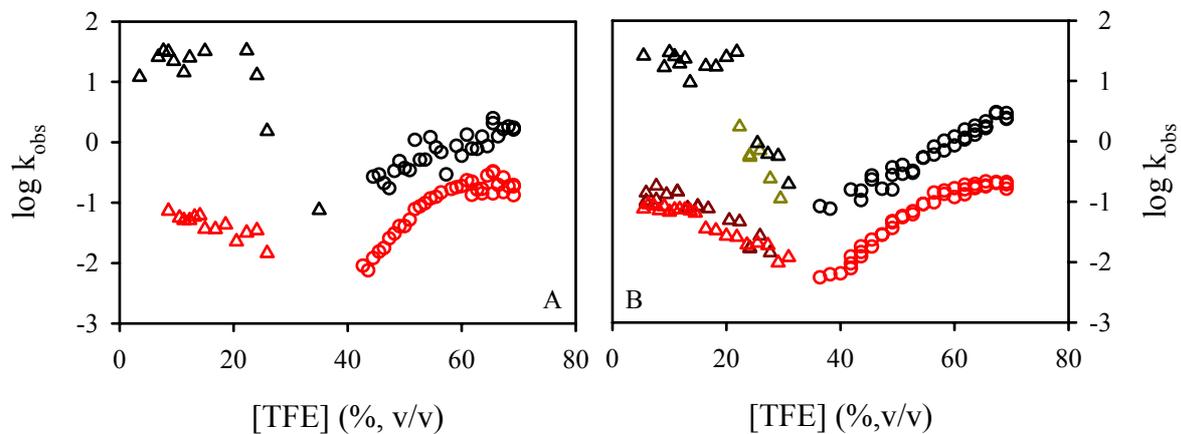


Abb. 25: Chevron-Plot von RNase A und A20P-RNase A in TFE, bestimmt durch *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie.

Dargestellt sind die langsamen (\circ , Δ) und schnellen (\bullet , \blacktriangle) Phasen der Entfaltungsreaktion (\bullet , \circ) und der Rückfaltungsreaktion (\blacktriangle , Δ) von RNase A (A) und A20P-RNase A (B) der Einzelsprungexperimente. In (B) sind zusätzlich die schnelle (\blacktriangle) und langsame (Δ) Phase der Rückfaltungsreaktion von A20P-RNase A der Doppelsprungexperimente gezeigt.

Die Kinetiken wurden bei einer Anregung von 278 nm und einer Integralemission von $> 305 \text{ nm}$ bei 25°C aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug $40 \mu\text{M}$ in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0.

Zur Bestimmung der Rückfaltungsgeschwindigkeit der bei den Entfaltungsexperimenten beobachteten schnellen Phase wurde ein Doppelsprungexperiment durchgeführt. Hierzu wurde A20P-RNase A 2 s zur Denaturierung in 65% (v/v) TFE inkubiert und anschließend die Rückfaltung durch Mischen dieser Lösung mit einer Lösung niedrigerer TFE-Konzentration initiiert. Jedoch konnten keine anderen Phasen für die Rückfaltung beobachtet werden (Abb. 25).

4.1.12.2. Verfolgung von Faltungsreaktionen über die Detektion der RNase-Aktivität gegenüber IDT2 als Substrat

Da in TFE die Abnahme der RNase A-Aktivität mit der Abnahme des Anteils an nativem Protein einhergeht (Abb. 22 und Abb. 23), ist die Verfolgung von Faltungsreaktionen durch die Detektion der RNase A-Aktivität möglich. Dabei bietet diese Methodik den Vorteil, dass nur Reaktionen detektiert werden, die mit einer Änderung der Aktivität einhergehen. Die Verwendung von IDT2 als Substrat bietet dabei einen sehr sensitiven Aktivitätstest (Kelemen et al. 1999), wodurch geringste Mengen RNase für die Verfolgung von Faltungskinetiken ausreichen. Bei der Spaltung von IDT2 wird der intramolekulare Quencher, der die Fluoreszenz im ungespaltenen Substrat verhindert, abgespalten, so dass die Emission bei 515 nm stark ansteigt. Der Anstieg der Fluoreszenz ist bis zu einem Substratverbrauch von 5 – 10 % linear, wodurch dieser Bereich zur Verfolgung von Faltungsprozessen genutzt werden kann.

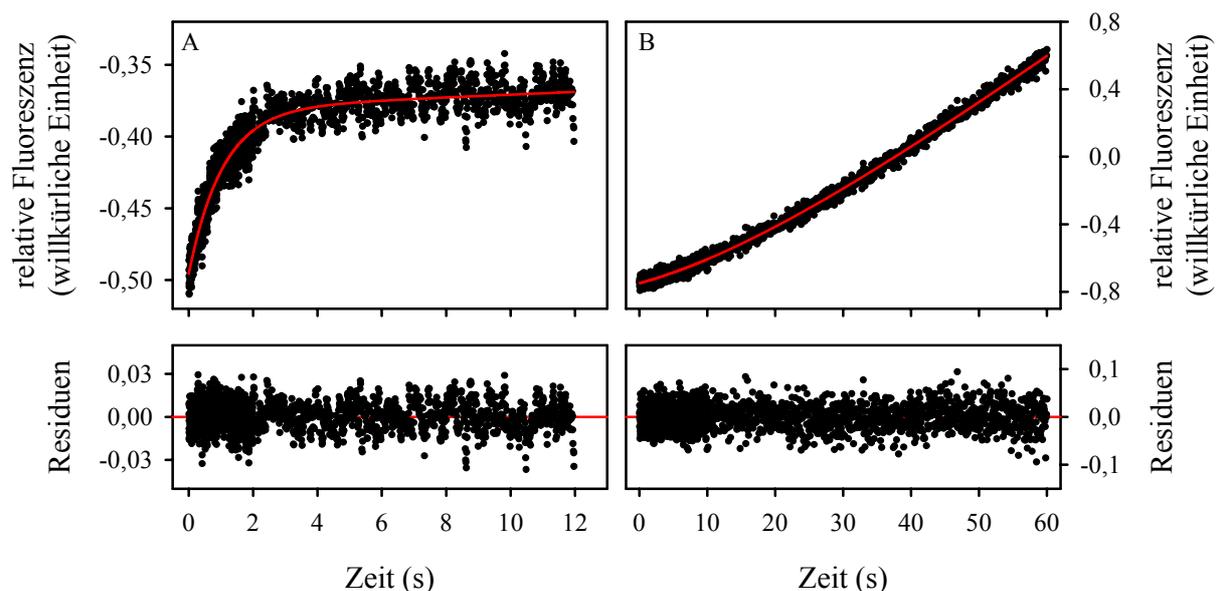


Abb. 26: Ent- und Rückfaltungskinetik von A20P-RNase A in TFE bei 25°C, detektiert mittels Aktivität gegenüber IDT2 als Substrat.

In (A) ist die Entfaltungskinetik von A20P-RNase A in 63,6 % (v/v) TFE und in (B) die Rückfaltungskinetik von A20P-RNase A in 5,45 % (v/v) TFE mit der entsprechenden Anpassung (oben) nach (16) und den entsprechenden Residuen (unten) gezeigt. Die Kinetiken wurden bei einer Anregung von 490 nm und einer Integralemission von > 515 nm in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, bei einer Substratkonzentration von 100 nM bei 25°C aufgenommen.

Die Messung der Ent- und Rückfaltungsreaktionen wurde an einer *stopped-flow* Apparatur wie unter 3.2.15.2. beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Kinetiken konnten durch eine Reaktion 1. Ordnung mit einem linearen Endanstieg (16) gut beschrieben werden. In Abb. 26 sind stellvertretend eine Kinetik der Ent- und Rückfaltungsreaktion von A20P-RNase A dargestellt.

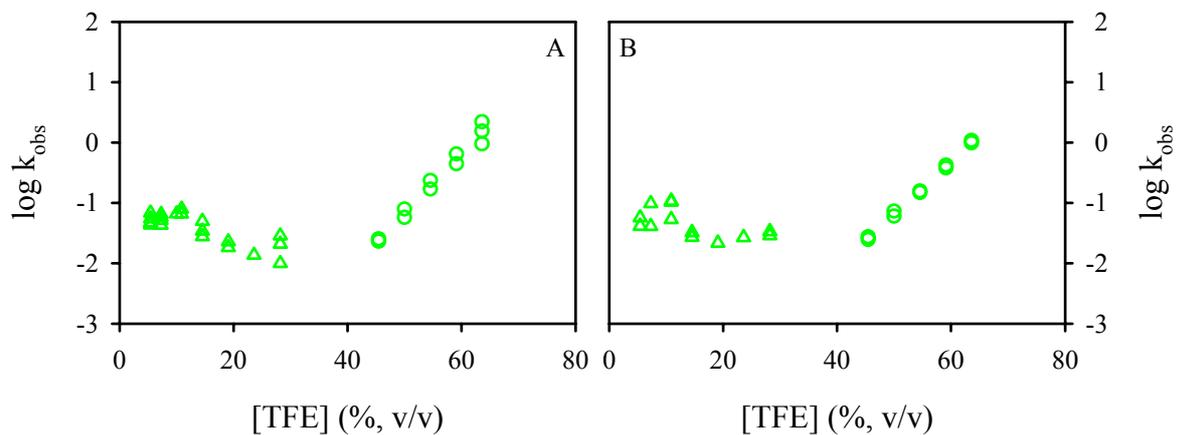


Abb. 27: Chevron-Plot von RNase A und A20P-RNase A in TFE, bestimmt durch *stopped-flow* Aktivitätsmessung.

Dargestellt sind die Entfaltungsphase (●) und Rückfaltungsphase (▲) von RNase A (A) und A20P-RNase A (B) bei 25°C. Die k_{obs} -Werte wurden wie in 3.2.15.2. beschrieben bestimmt.

Die durch Anpassen der Kinetiken erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind in Abb. 27 dargestellt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Ent- und Rückfaltungsreaktion zeigten für beide Enzyme sehr ähnliche TFE-Abhängigkeiten. Die Geschwindigkeitskonstanten der mittels Aktivitätsmessung beobachteten Rückfaltungsreaktion stimmen mit denen der durch intrinsische Tyrosinfluoreszenz beobachteten langsamen Rückfaltungsreaktion (Abb. 25) überein. Die Geschwindigkeitskonstanten der durch Aktivitätsmessung beobachteten Entfaltungsreaktion, welche die Hauptentfaltungsreaktion darstellen, zeigen eine lineare Abhängigkeit im Chevron-Plot und verlaufen in TFE-Konzentrationen ≤ 55 % (v/v) identisch zu denen der mittels Tyrosinfluoreszenz beobachteten langsamen Entfaltungsphase, gehen jedoch in TFE-Konzentrationen > 55 % (v/v) in die der durch Tyrosinfluoreszenz beobachteten schnelle Entfaltungsreaktion über (siehe 4.1.13.). Eine schnelle Ent- bzw. Rückfaltungsphase wie bei der Detektion der intrinsischen Fluoreszenz konnte nicht beobachtet werden, wobei die Bestimmung des Anstiegs bei $t=0$ einen Hinweis für das Vorhandensein einer schnellen Rückfaltungsphase liefern könnte. Jedoch wurde auf Grund der auftretenden starken Schwankungen bei der Bestimmung der Anfangsanstiege von einer

Bestimmung dieser bei den Rückfaltungskinetiken abgesehen. Die starken Schwankungen sind wahrscheinlich auf die hohe Empfindlichkeit des Tests gegenüber RNase-Konzentrationschwankungen im Testansatz zurückzuführen.

4.1.12.3. Verfolgung von Faltungsreaktionen von A20P-RNase A durch CD-Spektroskopie

Wie schon durch die CD-Spektren von A20P-RNase A und RNase A in TFE gezeigt wurde (Abb. 19), ist die CD-Spektroskopie vor allem im nahen UV-Bereich eine hervorragende Methode zur Verfolgung von Faltungsreaktionen. Im Gegensatz zur Fluoreszenzspektroskopie liefert die CD-Spektroskopie im nahen UV-Bereich für den nativen und denaturierten Zustand ein von der TFE-Konzentration unabhängiges Signal. Dies ermöglicht durch Auswerten der Absolutamplituden die Bestimmung von eventuellen *burst*-Phasen während der Rückfaltungsreaktion.

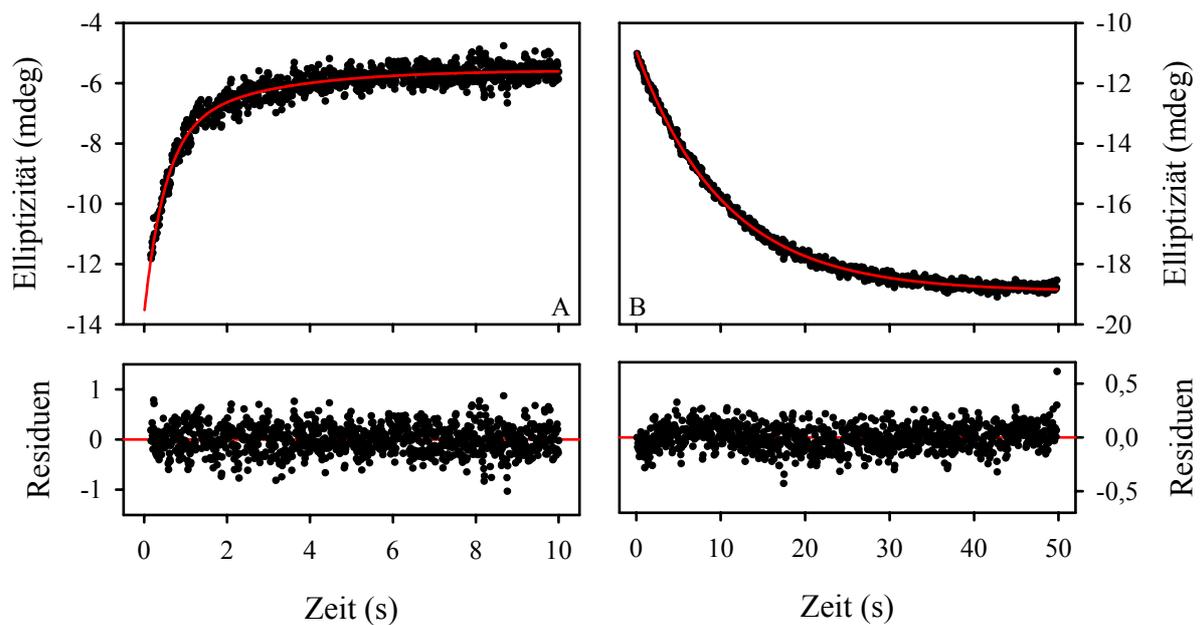


Abb. 28: Ent- und Rückfaltungskinetik von A20P-RNase A in TFE bei 25°C, detektiert mittels *stopped-flow* CD-Spektroskopie.

In (A) ist die Entfaltungskinetik von A20P-RNase A in 63,6 % (v/v) TFE und in (B) die Rückfaltungskinetik von A20P-RNase A in 5,45 % (v/v) TFE mit den Anpassungen (oben) und entsprechenden Residuen (unten) gezeigt. Die Kinetiken wurden bei 278 nm in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, bei einer Proteinkonzentration von 55 μ M bei 25°C aufgenommen.

Zur Verfolgung von Faltungsreaktionen von A20P-RNase A wurden die Proben wie unter 3.2.16. beschrieben gemischt und das CD-Signal bei 278 nm detektiert. Bei der Entfaltungsreaktion wurden stets 2 Phasen detektiert (Abb. 28A), während bei den Rückfaltungsreaktionen in TFE-Konzentrationen $< 23\%$ (v/v) nur eine Phase beobachtet wurde (Abb. 28B). Das Fehlen der schnellen Rückfaltungsphase in TFE-Konzentrationen $< 23\%$ (v/v) könnte durch die gerätetechnisch bedingte geringe Punktdichte verursacht sein, da diese zur Verfolgung von Kinetiken mit Geschwindigkeitskonstanten $> 10\text{ s}^{-1}$ nicht ausreichte. Da jedoch in TFE-Konzentrationen $< 14,5\%$ (v/v) die maximal erreichbare Amplitude (100 % Rückfaltung) beobachtet wurde, ist in diesen Konzentrationen entweder keine schnelle Faltungsphase vorhanden oder deren Amplitude so klein, so dass diese im Fehler der Methodik liegt (Abb. 29A).

Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten der Ent- und Rückfaltungsreaktionen (Abb. 29B) sind mit denen der durch intrinsische Fluoreszenz beobachteten Faltungsreaktionen identisch. Nur in TFE-Konzentrationen $\geq 63\%$ (v/v) treten geringe Abweichungen zwischen den mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Entfaltungsphase auf (siehe 4.1.13.).

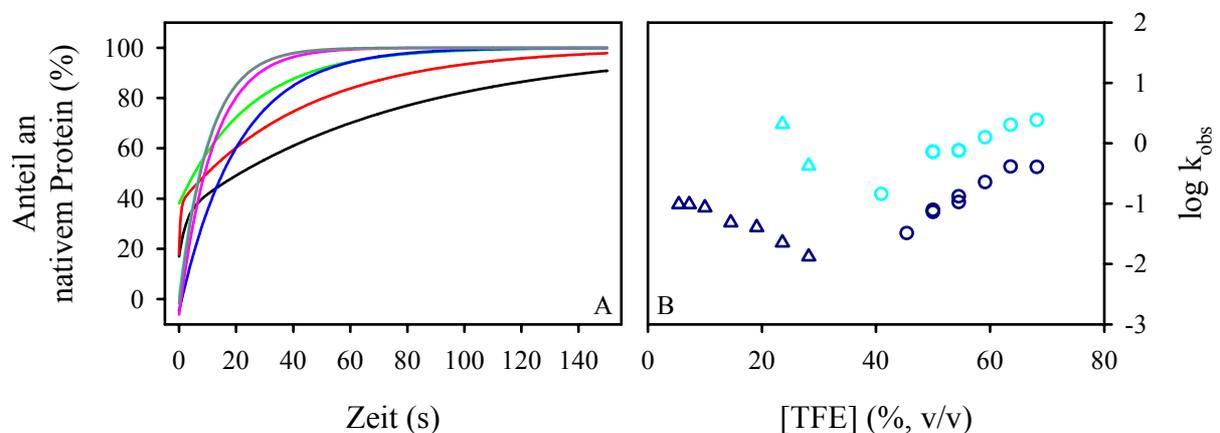


Abb. 29: Ent- und Rückfaltung von A20P-RNase A in TFE bei 25°C detektiert durch CD-Spektroskopie.

(A) zeigt die Rückfaltungskinetiken von A20P-RNase A in 5,45 (—), 7,3 (—), 10 (—), 14,5 (—), 19,1 (—), 23,6 (—) und 28,2 % (—) TFE (v/v) bei 25°C. (B) zeigt den Chevron-Plot für A20P-RNase A in TFE bei 25°C. Dargestellt sind die langsamen (●, Δ) und schnellen (○, ▲) Phasen der Entfaltungs- (○) und der Rückfaltungsreaktion (Δ). Die Kinetiken wurden bei 278 nm in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, bei einer Proteinkonzentration von 55 μM bei 25°C aufgenommen.

4.1.12.4. Amplituden der Faltungsreaktionen von RNase A und A20P-RNase A in TFE

Neben den Änderungen der Geschwindigkeitskonstanten war auch der Verlauf der Amplituden der Faltungsphasen von Interesse. Daher wurden die relativen Amplituden der langsamen und schnellen Ent- und Rückfaltungsphasen für RNase A und A20P-RNase A bestimmt und in Abb. 30 dargestellt.

Die aus den *stopped-flow* Fluoreszenzmessungen erhaltenen Amplituden der schnellen Entfaltungsphase stiegen für A20P-RNase A schon bei TFE-Konzentrationen von 40 – 60 % (v/v) an. Im Gegensatz dazu war der Anstieg der Amplituden der schnellen Phase von RNase A durch den Übergang der Hauptentfaltungsphase von der langsamen in die schnelle Phase (bei > 60 % TFE, v/v) geprägt (Abb. 30). Die Hauptentfaltungsphase entspricht der durch *stopped-flow* Aktivitätsmessungen (Abb. 27) beobachteten Entfaltungsreaktion. Die relativen Amplituden der für A20P-RNase A mittels *stopped-flow* CD-Spektroskopie beobachteten Entfaltungsreaktion folgten in TFE-Konzentrationen < 55 % (v/v) dem Verlauf der durch Fluoreszenzspektroskopie erhaltenen Amplituden, wichen aber im Bereich des Übergangs der Hauptentfaltungsphase in die schnelle Phase deutlich von den Amplituden der Fluoreszenzspektroskopie ab. Dieses abweichende Verhalten ist auf die unmittelbare Nachbarschaft der Tyrosine 92 und 115 zu den im nativen Zustand in *cis* Konfiguration vorliegenden Prolinen 93 und 114 zurückzuführen (Juminaga et al. 1997). Die Prolinisomerisierung im denaturierten Zustand führt zu einer beträchtlichen Änderung der Fluoreszenzeigenschaften dieser Tyrosine, aber kaum zu einer Absorptionsänderung und dem damit verbundenen CD-Signal (Rehage and Schmid 1982; Juminaga et al. 1997).

Für die Rückfaltungsreaktion wurde für beide Enzyme eine ähnliche Abhängigkeit der relativen Amplituden gefunden, wobei die Amplituden der *stopped-flow* CD-Spektroskopie mit denen der Fluoreszenzspektroskopie übereinstimmten (Abb. 30).

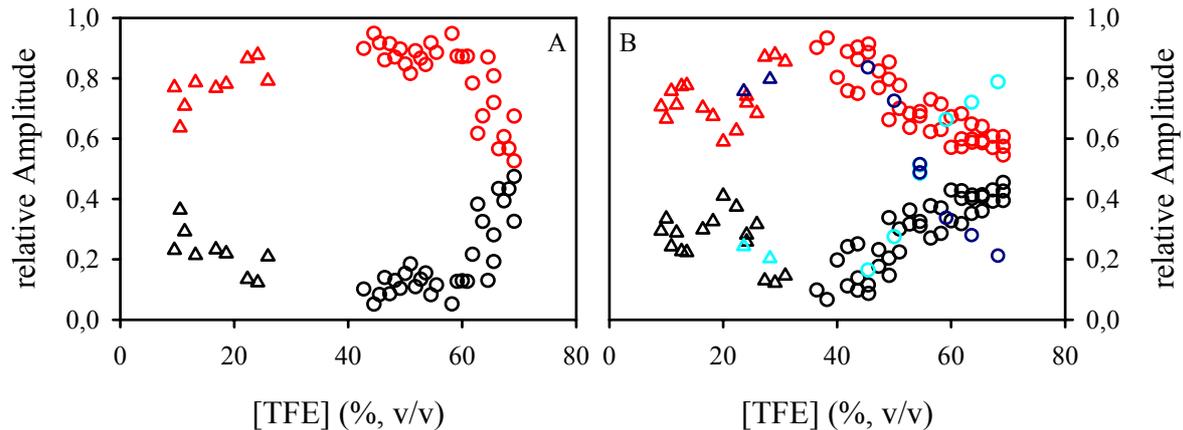


Abb. 30: Relative Amplituden der Faltungsphasen detektiert durch *stopped-flow* CD- und Fluoreszenzspektroskopie.

In (A) sind die relativen Amplituden von RNase A, erhalten durch *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie, gezeigt. In (B) sind die relativen Amplituden für A20P-RNase A, erhalten aus *stopped-flow* CD- und Fluoreszenzspektroskopie, dargestellt.

Entfaltung (Kreis); Rückfaltung (Dreieck); schnelle Phase Fluoreszenz (●, ▲); langsame Phase Fluoreszenz (○, △); schnelle Phase CD (○, △); langsame Phase CD (●, ▲).

4.1.12.5. Bestimmung der Parameter der kinetischen und thermodynamischen Stabilität aus dem Chevron-Plot

Aus den gesamten Daten der Chevron-Plots (Abb. 25, Abb. 27 und Abb. 29B) wurden die Geschwindigkeitskonstanten unter nativen Bedingungen k^0 der Ent- und Rückfaltungsreaktion und die Anstiege m_k nach Gleichung (17) bestimmt. Für die Extrapolation wurde eine lineare Abhängigkeit der freien Aktivierungsenthalpie von der TFE Konzentration angenommen (Gl. 21). Aus den Werten k^0 und m_k wurden nach (19) bzw. (22) die freie Aktivierungsenthalpie unter nativen Bedingungen $\Delta G^{\#0}$ und der Anstieg der jeweiligen Ent- bzw. Rückfaltungsreaktion m_u bzw. m_f ermittelt (Tab. 3). Trotz des schon unter 4.1.12.1. erwähnten Abknickens der Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Rückfaltungsphasen (Abb. 25) in TFE-Konzentrationen < 20 % (v/v) wurde der lineare Bereich zwischen 20 und 30 % (v/v) TFE für die Kalkulation von m_k und k^0 genutzt. Der für RNase A und A20P-RNase A erhaltene Unterschied der extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Rückfaltungsphase ist wahrscheinlich auf die geringe Punktdichte von RNase A im Chevron-Plot zurückzuführen (Abb. 25), weshalb die Parameter der schnellen Rückfaltungsreaktion von RNase A nur eine Schätzung darstellen kann.

Tab. 3: Kinetische Parameter der Faltungsreaktionen von RNase A und A20P-RNase A in TFE.

Die Parameter wurden aus den Daten der Chevron-Plots (Abb. 25, Abb. 27 und Abb. 29) unter Voraussetzung einer linearen Energiebeziehung wie unter 2.1.1.2. beschrieben bestimmt. Hierbei entsprechen k^0 der Geschwindigkeitskonstante unter nativen Bedingungen, m_k dem Anstieg der $\ln k$ -Werte in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration, $\Delta G^{\#0}$ der Aktivierungsenergie unter nativen Bedingungen und $m_{\Delta G^{\#}}$ (m_u bzw. m_f in Gl. (21)) dem Anstieg von $\Delta G^{\#}$ in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration.

Faltungsphase	k^0 (s^{-1})	m_k ($\%^{-1}$)	$\Delta G^{\#0}$ ($kJ \cdot mol^{-1}$)	$m_{\Delta G^{\#}}^*$ ($kJ \cdot mol^{-1} \cdot M^{-1}$)
RNase A				
schnelle Rückfaltung	$(6,7 \pm 1,1) \cdot 10^5$	$-0,464 \pm 0,082$	$39,8 \pm 5,5$	$8,3 \pm 1,5$
langsame Rückfaltung	$0,088 \pm 0,006$	$-0,065 \pm 0,010$	$79,0 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,2$
schnelle Entfaltung	$(7,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-3}$	$0,081 \pm 0,008$	$85,3 \pm 1,2$	$-1,4 \pm 0,2$
langsame Entfaltung	$(20,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$	$0,248 \pm 0,008$	$111,1 \pm 1,1$	$-4,4 \pm 0,2$
A20P-RNase A				
schnelle Rückfaltung	$(5,7 \pm 1,0) \cdot 10^4$	$-0,428 \pm 0,077$	$45,9 \pm 4,9$	$7,2 \pm 1,4$
langsame Rückfaltung	$0,133 \pm 0,008$	$-0,072 \pm 0,006$	$78,0 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,1$
schnelle Entfaltung	$(11,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$0,114 \pm 0,005$	$89,9 \pm 0,7$	$-2,0 \pm 0,1$
langsame Entfaltung	$(30,2 \pm 0,9) \cdot 10^{-7}$	$0,196 \pm 0,007$	$104,5 \pm 0,9$	$-3,5 \pm 0,1$

* 1 % (v/v) TFE entspricht 0,1391 M.

Aus diesen kinetischen Parametern wurden die freie Enthalpie ΔG^0 für die möglichen thermodynamischen Gleichgewichte zwischen den verschiedenen Zuständen, der Anstieg $m_{\Delta G}$ und der $[TFE]_{1/2}$ -Wert nach Gl. (1), (8), (9) und (21) bestimmt (Tab. 4). Auf Grund der Prolinisomerisierung im denaturierten Zustand, die die Rückfaltungsreaktion stark beeinflusst (Wedemeyer et al. 2002), geben diese Parameter die Komplexität des Systems bei der Faltungsreaktion nur unvollständig wider.

Tab. 4: Parameter für die möglichen thermodynamischen Gleichgewichte zwischen den die verschiedenen Faltungsphasen verursachenden Zuständen von RNase A und A20P-RNase A in TFE.

Die thermodynamischen Parameter wurden aus den kinetischen Parametern in Tab. 3 nach Gl. (1), (8), (9) und (21) ermittelt. ΔG^0 ist die freie Enthalpie unter nativen Bedingungen, $m_{\Delta G}$ der Anstieg von ΔG in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration und der $[\text{TFE}]_{1/2}$ -Wert die TFE-Konzentration bei $\Delta G = 0$.

thermodynamisches Gleichgewicht der Faltungsphasen Rückfaltung \rightleftharpoons Entfaltung	ΔG^0 (kJ · mol ⁻¹)	$m_{\Delta G}$ * (kJ · mol ⁻¹ · M ⁻¹)	$[\text{TFE}]_{1/2}$ (%, v/v)
RNase A			
langsam \rightleftharpoons langsam	32,1 ± 1,5	5,6 ± 0,3	41,4 ± 4,4
langsam \rightleftharpoons schnell	6,2 ± 1,6	2,6 ± 0,3	17,3 ± 6,6
schnell \rightleftharpoons langsam	71,3 ± 6,6	12,7 ± 1,6	40,4 ± 8,9
schnell \rightleftharpoons schnell	45,5 ± 6,8	9,7 ± 1,6	33,7 ± 10,6
A20P-RNase A			
langsam \rightleftharpoons langsam	26,5 ± 1,2	4,8 ± 0,2	39,8 ± 3,8
langsam \rightleftharpoons schnell	11,9 ± 1,0	3,3 ± 0,2	25,7 ± 3,7
schnell \rightleftharpoons langsam	58,6 ± 5,9	11,1 ± 1,5	37,9 ± 8,9
schnell \rightleftharpoons schnell	44,1 ± 5,6	9,7 ± 1,5	32,8 ± 9,1

* 1 % (v/v) TFE entspricht 0,1391 M.

4.1.13. Zusammenfassende Diskussion zur Stabilität und Faltung von RNase A und A20P-RNase A

Während die globale Entfaltung die spektroskopischen Eigenschaften eines Proteins signifikant ändert, stellt die Detektion von kleinen Konformationsänderungen der Proteinstruktur, welche sich schon vor einer globalen Entfaltung ereignen können, eine größere Herausforderung dar. So wurde in dieser Arbeit der Einfluss von TFE auf die Konformation von RNase A und A20P-RNase A untersucht, wobei neben den spektroskopischen Methoden die Methode der limitierten Proteolyse zur Detektion lokaler Strukturänderungen im Mittelpunkt stand. Bei Verwendung von RNase A konnten Änderungen in der Flexibilität der *loop*-Region um Ala20 in Abhängigkeit von der TFE-Konzentration mittels limitierter Proteolyse beobachtet werden, während durch die Verwendung der proteaseresistenteren A20P-RNase A die Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeiten unter nativen und nativ-ähnlichen Bedingungen mittels limitierter Proteolyse möglich wurde.

4.1.13.1. TFE-induzierte Strukturänderungen von RNase A und A20P-RNase A im Gleichgewicht

In Übereinstimmung mit der Literatur (Polverino de Laureto et al. 1997; Gast et al. 1999; Sivaraman et al. 1999) wurde durch die CD-Signale im nahen UV-Bereich und durch die Fluoreszenzspektroskopie die Zerstörung der Tertiärstruktur von RNase A und A20P-RNase A in TFE-Konzentrationen > 30 % (v/v) aufgezeigt (Abb. 22A). Während für RNase A CD- und Fluoreszenzspektroskopie gleiche Ergebnisse lieferten, traten bei A20P-RNase A Unterschiede auf (Abb. 22A). Die mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelte Übergangskurve von A20P-RNase A verläuft ähnlich wie die der RNase A, wohingegen das CD-Signal bei 278 nm einen Zusammenbruch der Tertiärstruktur bereits in niedrigeren TFE-Konzentrationen offenbart (Abb. 22A). Die Diskrepanz zwischen CD- und Fluoreszenzspektroskopie könnte auf lokale Störungen der Struktur um Position 20 zurückzuführen sein. So liefert Tyrosin 25, das sich in räumlicher Nähe des in Position 20 eingeführten Prolins befindet, während der Denaturierung einen größeren Beitrag zur Absorptionsänderung und damit wahrscheinlich auch einen größeren Beitrag zur Änderung des CD-Signals als zur Fluoreszenzänderung (Juminaga et al. 1997). Daher könnte die Einführung eines Prolins in Position 20 eine Störung der Struktur um Tyrosin 25 verursachen

(z.B. Prolinisomerisierung), die bereits vor der globalen Denaturierung zu einer lokalen Entfaltung führt. So würde sich die Änderung der CD-Signale aus lokalen und globalen Entfaltungsereignissen zusammensetzen, wohingegen das Fluoreszenzsignal vorwiegend die globale Entfaltung beschreibt. Eine Induktion von helikalen Strukturen, die durch die CD-Signale im fernen UV-Bereich detektierbar sind, ging bei RNase A mit der Zerstörung der Tertiärstruktur einher (Abb. 22). Bei A20P-RNase A hingegen folgte die Helixinduktion der mittels CD-Spektroskopie im nahen UV-Bereich detektierten Übergangskurve, welche sich wie oben diskutiert aus lokaler und globaler Zerstörung der dreidimensionalen Struktur zusammensetzt. Die zwischen 45 und 50 % (v/v) TFE beobachtete Stagnation der Sekundärstrukturinduktion könnte auf die mittels Fluoreszenzspektroskopie detektierte noch vorhandene Tertiärstruktur zurückgeführt werden. Erst nach vollständiger Zerstörung der Tertiärstruktur in TFE-Konzentrationen > 50 % (v/v) konnte durch Erhöhung der TFE-Konzentration eine gleichmäßige Zunahme der Sekundärstruktur beobachtet werden. Die für A20P-RNase A beobachtete geringere Induktion von helikalen Strukturen könnte auf die „Helixbrecher“-Wirkung des Prolins (Fersht 1999) zurückgeführt werden.

Die aus den Fluoreszenz-Übergangskurven (Abb. 22) ermittelten ΔG^0 -Werte (Tab. 2) offenbaren eine gegenüber RNase A um ca. $4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ verminderte Stabilität von A20P-RNase A. Diese Abnahme der Stabilität ist vorwiegend auf eine geringere Kooperativität des Faltungsprozesses von A20P-RNase A und nicht auf einen veränderten $[\text{TFE}]_{1/2}$ -Wert zurückzuführen. Diese geringere Kooperativität in der Fluoreszenz-Übergangskurve (vor allem am Beginn des Übergangsbereichs) könnte, wie schon für die CD-Übergangskurve diskutiert, durch eine lokale Störung der Umgebung von Tyrosin 25 hervorgerufen werden. Zusammenfassend kann jedoch festgehalten werden, dass sich beide Proteine in ihren thermodynamischen Parametern ähneln.

In TFE fällt interessanterweise die Inaktivierung von RNase A mit der Zerstörung ihrer Tertiärstruktur zusammen, wie die in Abb. 31 zusammengefassten Daten demonstrieren. Dieses Verhalten von RNase A unterscheidet sich von der Denaturierung durch GdnHCl, Harnstoff oder erhöhter Temperatur, wo die Abnahme der Aktivität der Zerstörung der Tertiärstruktur vorausgeht (Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000). Dieses ungewöhnliche Verhalten machte es möglich, Ent- und Rückfaltungsreaktionen mittels Aktivitätsmessungen zu verfolgen (Abb. 27). Neben einer geringen Aktivierung - einem Effekt, der auch für andere Enzyme in Gegenwart verschiedener Lösungsmittel beschrieben wurde (Ulbrich-Hofmann and Selisko 1993) - scheinen geringe Konzentrationen von TFE keinen Einfluss auf die Aktivität von RNase A zu haben.

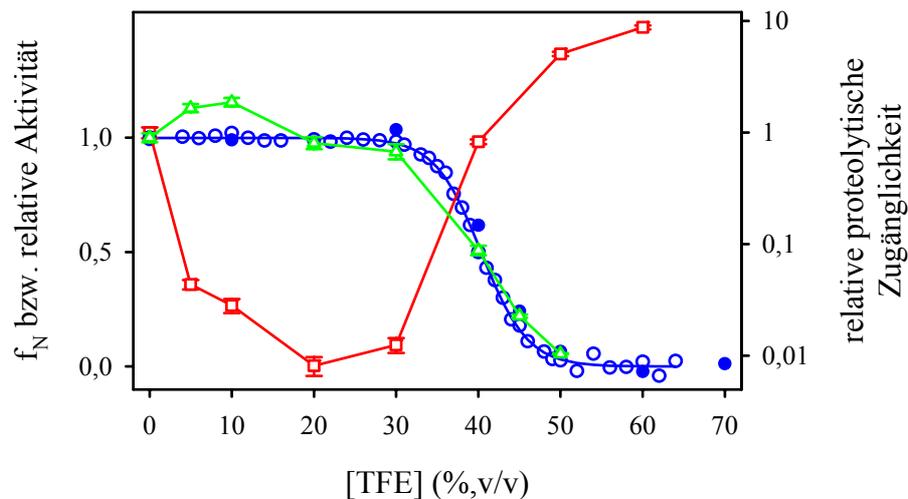


Abb. 31: Konformationsänderung von RNase A in Abhängigkeit von der TFE-Konzentration.

Der Anteil an nativem Protein (f_N) wurde durch Fluoreszenzspektroskopie bei 303 nm (○) oder durch CD-Spektroskopie bei 278 nm (◆) bei 25°C ermittelt. Die relative Aktivität von RNase A (▲) wurde gegenüber cCMP als Substrat bei 25°C bestimmt. Die relative proteolytische Zugänglichkeit von RNase A gegenüber Proteinase K (■) wurde aus der Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse k_p wie unter 3.2.8.2. beschrieben erhalten. Die Daten entsprechen denen aus Abb. 17A, Abb. 22A und Abb. 23.

Die Methode der limitierten Proteolyse lieferte detailliertere Informationen zur Konformationsänderung in TFE. In Abwesenheit von TFE wird RNase A durch Subtilisin Carlsberg und Proteinase K unter Spaltung der Peptidbindung Ala20-Ser21 abgebaut (Abb. 13B; Richards and Vithayathil 1959; Rauber et al. 1978). Diese Spaltung ist auf Grund der hohen Flexibilität der *loop*-Region um diese Peptidbindung möglich (Santoro et al. 1993), wohingegen das übrige RNase A-Molekül für eine proteolytische Spaltung nicht genügend zugänglich ist. Während der proteolytische Abbau von RNase A durch Proteinase K (Abb. 13B) unter nativen Bedingungen sehr schnell erfolgt, konnte durch Einführung eines Prolins in Position 20 (A20P-RNase A) eine starke Abnahme der proteolytischen Angreifbarkeit unter diesen Bedingungen erreicht werden (Abb. 14B; Markert et al. 2001). Eine Bestimmung der primären Spaltstellen war auf Grund des langsamen proteolytischen Abbaus und der dadurch ungenügenden Anreicherung von Fragmenten nicht möglich. Das Fehlen von Fragmenten beim proteolytischen Abbau von RNase A in 5 – 30 % (v/v) TFE (Abb. 13C) ist wie unten diskutiert durch die drastische Abnahme der Proteolysegeschwindigkeit verursacht (Abb. 31). Als Konsequenz der

Tertiärstrukturzerstörung von RNase A in TFE-Konzentrationen $> 30\%$ (v/v) werden neue primäre Spaltstellen (Tyr76-Ser77, Met79-Ser80) zugänglich (Abb. 13D). Diese Peptidbindungen befinden sich in einem *turn* und am Anfang eines β -Faltblattes (Abb. 32), welche zu der Kernregion von RNase A gehören und unter nativen Bedingungen nicht zugänglich sind (Kiefhaber and Baldwin 1996). Das Fragmentmuster für A20P-RNase A und RNase A ist unter denaturierenden Bedingungen identisch (Abb. 14D), was auf ein Vorhandensein der gleichen primären Schnittstellen und damit auf eine Übereinstimmung des proteolytischen Abbauweges schließen lässt. Eine Veränderung des proteolytischen Abbauweges unter denaturierenden Bedingungen durch die Einführung eines Prolins in Position 20 kann daher ausgeschlossen werden. Im Vergleich zur Denaturierung durch GdnHCl oder erhöhte Temperatur (Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000) tritt in TFE eine geringere Anzahl an primären Schnittstellen auf. Dieses Ergebnis reflektiert den unterschiedlichen Sekundärstrukturgehalt von RNase A im denaturierten Zustand, welcher in der Reihenfolge TFE $>$ Temperatur (Navon et al. 2001) $>$ GdnHCl (Takeda et al. 1988) abnimmt. In Übereinstimmung mit dem Auftreten neuer primärer Schnittstellen steigt auch die proteolytische Angreifbarkeit von RNase A in hohen TFE-Konzentrationen stark an (Abb. 31).

Als Grund für die starke Abnahme der proteolytischen Angreifbarkeit von RNase A durch Proteinase K in $5 - 30\%$ (v/v) TFE (Abb. 31) können auf Grund der Ultrazentrifugationsexperimente die Aggregation von RNase A, wie es für Kreatinkinase beschrieben ist (Huang et al. 2001), und die Aktivitätsänderung von Proteinase K ausgeschlossen werden. In diesem TFE-Konzentrationsbereich konnten jedoch keine Änderungen der spektroskopischen Eigenschaften des Proteins beobachtet werden. Da die proteolytische Angreifbarkeit direkt mit der Flexibilität der die primäre Schnittstelle umgebenden Region korreliert (Fontana et al. 1986; Novotny and Bruccoleri 1987), wird die Abnahme der proteolytischen Zugänglichkeit auf eine Abnahme der Flexibilität von RNase A in der *loop*-Region um Ala20, welche sich zwischen Helix I und II von RNase A (Abb. 32) befindet, zurückgeführt. Für das isolierte Fragment 1–19 von RNase A ist die Helixinduktion in niedrigen TFE-Konzentrationen (Nelson and Kallenbach 1986; Storrs et al. 1992) beschrieben, ebenso wie für die Fragmente 21–42 (Jiménez et al. 1988) und 50–61 (Jiménez et al. 1987), welche den Sequenzabschnitten der Helix II bzw. Helix III entsprechen (Abb. 32). Dies lässt den Schluss zu, dass in niedrigen TFE-Konzentrationen geringe Strukturänderungen vor allem im Bereich der Helixenden induziert werden und so zu einer erhöhten Rigidität der *loop*-Region und dadurch zu einem proteolytisch weniger angreifbaren

Zustand der RNase A führt, ohne die globale Struktur des Proteins zu beeinflussen. Während der Effekt der Helixinduktion für Peptide (Luo and Baldwin 1997) und entfaltete Proteine (Sivaraman et al. 1999) gut bekannt ist, wurde eine durch TFE induzierte Stabilisierung und Induktion von Sekundärstrukturelementen in nativ gefalteten Proteinen hier erstmals beschrieben.

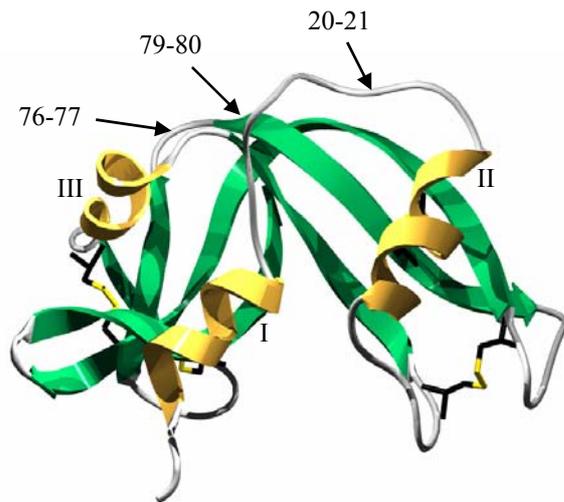


Abb. 32: Tertiärstruktur von RNase A.

Das Modell wurde der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm SwissPDBViewer erstellt. α -Helices und β -Faltblätter sind als Bänder dargestellt. Die primären Schnittstellen sind durch Pfeile markiert. Die Helices sind durch römische Ziffern gekennzeichnet.

4.1.13.2. Entfaltungskinetik von RNase A und A20P-RNase A in TFE

Wie durch *stopped-flow* Experimente gezeigt werden konnte, verhalten sich RNase A und A20P-RNase A bei der Ent- und Rückfaltung in TFE sehr ähnlich (Abb. 33). Die Entfaltungsreaktion besteht aus einer schnellen und einer langsamen Phase. Während die schnelle Phase eine lineare Abhängigkeit im Chevron-Plot aufweist, knickt die durch Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie beobachtete langsame Phase in TFE-Konzentrationen $> 55\%$ (v/v) ab und bleibt weitgehend unverändert (Abb. 34). Dieses Abknicken kann nicht durch Aktivitätsmessungen detektiert werden (Abb. 34) und ist durch die im denaturierten Zustand auftretende Isomerisierung der Proline 93 und 114 (Rehage and Schmid 1982; Juminaga et al. 1997), welche im nativen Proteinmolekül in *cis* Konfiguration vorliegen (Wlodawer et al. 1982), zu erklären. Die für die langsame Entfaltungsphase in hohen TFE-Konzentrationen bestimmten Geschwindigkeitskonstanten von ca. $0,1\text{ s}^{-1}$ beschreiben dabei die *cis/trans* Isomerisierungsreaktion der Peptidbindungen Tyr92-Pro93 und Asn113-Pro114. Die Detektion der Prolinisomerisierung unter denaturierenden Bedingungen wird auf Grund

der direkten Nachbarschaft der Tyrosine 92 und 115 zu den Prolinen 93 und 114 möglich. Dabei ändern sich die Fluoreszenzeigenschaften der Tyrosine durch die Isomerisierung der Proline (Rehage and Schmid 1982; Juminaga et al. 1997), wohingegen das CD-Signal nur wenig beeinflusst wird. Dies spiegelt sich auch in den Amplituden der langsamen Entfaltungsphase in TFE-Konzentrationen $> 55\%$ (v/v) wider, bei denen die Amplitude der Fluoreszenz über 50 % der Gesamtamplitude, die des CD-Signals aber nur 20 % beträgt (Abb. 30B).

Die bei der TFE-induzierten Denaturierung beobachtete schnelle Entfaltungsphase (Abb. 34) sollte der schnellen Phase, die bei der GdnHCl-induzierten Entfaltung in hohen Denaturanskonzentrationen beobachtet wurde (Nall et al. 1978; Kiefhaber and Schmid 1992; Kiefhaber and Baldwin 1995), entsprechen. Das bei der GdnHCl-induzierten Entfaltung beobachtete Auftreten mehrerer Entfaltungsphasen (Kiefhaber and Baldwin 1995) wurde nach dem theoretischen Modell von Kiefhaber et al. (Kiefhaber et al. 1992) durch die eintretende Rückfaltung und die Prolinisomerisierung erklärt, wobei auch eine alternative Erklärung durch eine schnelle Bildung eines Intermediats diskutiert wurde. Nach diesem Modell könnten für ein Protein mit zwei *cis* Prolinen theoretisch 3 Phasen detektiert werden, wobei unabhängig von den Geschwindigkeitsverhältnissen zwischen Prolinisomerisierung und Entfaltungsreaktion nur eine Entfaltungsphase eine lineare Abhängigkeit im Chevron-Plot aufweist. Die beiden anderen Phasen sind jenseits des Übergangsbereichs unabhängig von der Denaturanskonzentration. Da bei der TFE-induzierten Denaturierung aber sowohl die Hauptentfaltungsphase, die mittels Aktivitätsmessungen detektiert werden kann, als auch die schnelle Entfaltungsphase eine lineare Abhängigkeit im Chevron-Plot aufweisen und die durch Proteolyse bestimmten Geschwindigkeitskonstanten nicht der schnellen Entfaltungsphase folgen (Abb. 34), kann das Auftreten der schnellen Phase nicht durch dieses Modell (Kiefhaber et al. 1992) erklärt werden. Vielmehr könnte die schnelle Entfaltungsphase durch eine nativ-ähnliche Spezies von RNase A (bzw. A20P-RNase A) verursacht sein, deren Entfaltung detektiert wurde.

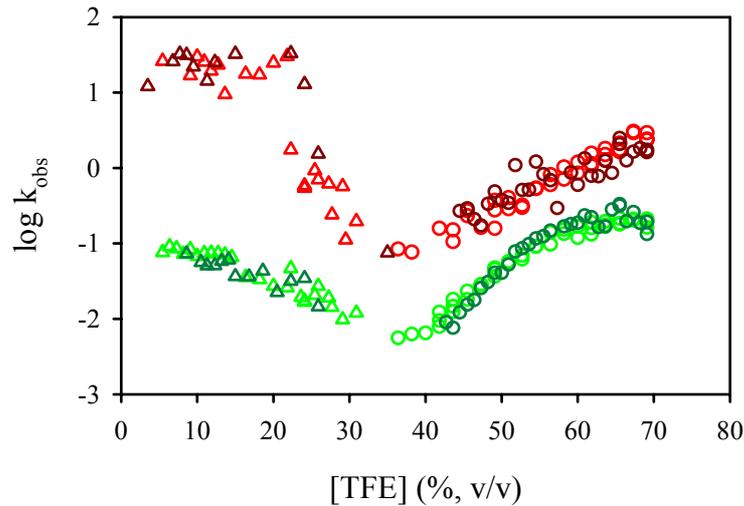


Abb. 33: Chevron-Plot von RNase A und A20P-RNase A in TFE, bestimmt durch *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie.

Dargestellt sind die langsamen (grün, dunkelgrün) und schnellen (rot, dunkelrot) Phasen der Entfaltungsreaktion (Kreise) und der Rückfaltungsreaktion (Dreiecke) von RNase A (dunkelgrün, dunkelrot) und A20P-RNase A (grün, rot). Die Daten entsprechen denen aus Abb. 25.

Im Gegensatz zu *stopped-flow* Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie konnte durch Aktivitätsmessungen keine schnelle Ent- bzw. Rückfaltungsphase beobachtet werden (Abb. 34). Da die durch Aktivitätsmessung bestimmten Geschwindigkeitskonstanten über 55 % (v/v) TFE in die schnelle Phase der Entfaltung übergehen, wäre eine Detektion einer zweiten, schnelleren Phase nur unterhalb dieser TFE-Konzentration möglich. Bei der Nutzung der Aktivität zur Verfolgung von Faltungsreaktionen wird jedoch das Integral des eigentlichen Faltungssignals detektiert (siehe 2.1.1.2., Gl. (16)). So entspricht die mittels Aktivität detektierbare Amplitude dem Quotienten der Amplitude des eigentlichen Faltungssignals und der entsprechenden Geschwindigkeitskonstante. Die sich so für die Verfolgung der schnellen Phase mittels Aktivität ergebende relative Amplitude ($A \sim 0,1$, $k \sim 0,1 \text{ s}^{-1}$) betrüge ca. 1 – 2 % der Gesamtamplitude, was eine Detektion unmöglich macht. Gleiches trifft für die schnelle Rückfaltungsphase zu (siehe 4.1.13.4.).

Die durch *stopped-flow* Aktivitätsmessungen detektierte Entfaltungsreaktion führt entsprechend dem thermodynamischen Gleichgewicht zwischen N und D zur Inaktivierung von RNase und stellt somit die Hauptentfaltungsphase dar. Diese zeigt eine lineare Abhängigkeit im Chevron-Plot und fällt in TFE-Konzentrationen $< 55 \%$ (v/v) mit der durch CD- und Fluoreszenzspektroskopie detektierten langsamen Phase zusammen (Abb. 34), geht

jedoch in TFE-Konzentrationen $> 55\%$ (v/v) in die schnelle Entfaltungsphase über. In hohen TFE-Konzentrationen ist die durch spektroskopische Methoden detektierte langsame Phase wie schon oben diskutiert durch die Prolinisomerisierung im denaturierten Zustand verursacht und spiegelt sich folglich nicht in den Aktivitätsmessungen wider.

Die Ergebnisse der *stopped-flow* Experimente wurden durch Proteolyseexperimente mit A20P-RNase A ergänzt. So konnten Entfaltungsgeschwindigkeiten von A20P-RNase A unter nativen und nativ-ähnlichen Bedingungen bestimmt werden (Abb. 34B), die durch spektroskopische Methoden nicht zugänglich waren. Interessanterweise sind die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion wie die der schnellen Rückfaltungsreaktion bis 20% (v/v) TFE von der TFE-Konzentration unabhängig. Erst über 20% (v/v) TFE konnte eine Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten beobachtet werden. Da im allgemeinen Faltungsreaktionen immer eine Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration aufweisen und die Geschwindigkeitskonstante der globalen Entfaltungsreaktion unter nativen Bedingungen (k_u^0) von A20P-RNase A bei ca. $3 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (Tab. 3) liegen sollte, muss die globale Entfaltungsreaktion als Ursache für die durch Proteolyse beobachteten Entfaltungsreaktionen bis 20% (v/v) TFE ausgeschlossen werden. Diese von der TFE-Konzentration unabhängige Entfaltungsreaktion könnte die Bildung einer zweiten nativen Spezies sein, welche schon proteolytisch angreifbar ist oder durch deren Entfaltung proteolytisch zugänglich wird. Eine lokale Entfaltung, die zur Bildung eines nativ-ähnlichen Zustands führen würde, könnte durch eine *loop*-Bewegung oder auch durch eine Prolinisomerisierung im nativen Zustand hervorgerufen werden (Evans et al. 1989; Truckses et al. 1996). Da die Geschwindigkeitskonstanten der Prolinisomerisierung weitgehend unabhängig von der Denaturationskonzentration sind (Schmid and Baldwin 1979) und nur durch die Rigidität der nativen Proteinstruktur behindert wird, wäre dies eine plausible Erklärung. Ein TFE-spezifischer Effekt, verursacht durch die besonderen Eigenschaften des Lösungsmittels (Buck 1998) muss auf Grund der Tatsache, dass auch in Harnstoff eine denaturationsunabhängige Entfaltungsreaktion für A20P-RNase A mit einer ähnlichen Geschwindigkeitskonstante von $2 - 3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ mittels limitierter Proteolyse beobachtet werden konnte (U. Arnold, Martin-Luther-Universität Halle, persönliche Mitteilung), ausgeschlossen werden. Das so genannte „Atmen“ eines Proteins kann ebenfalls nicht als Ursache für diese Reaktion in Betracht gezogen werden, da diese Prozesse deutlich schneller ablaufen (Shibata et al. 1999) und durch die Methode der limitierten Proteolyse nicht detektierbar sind. Die Entfaltung dieses nativ-ähnlichen Zustands N^* könnte die durch spektroskopische Methoden detektierte schnelle Entfaltungsphase verursachen.

Der Anstieg der durch Proteolyse detektierten Entfaltungskonstanten in TFE-Konzentrationen zwischen 20 und 35 % (v/v) ist wahrscheinlich sowohl auf eine lokale als auch globale Entfaltung von N zurückzuführen, wobei der Anteil der lokalen Entfaltungsreaktionen überwiegt und eine Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration aufweist. Über 35 % (v/v) TFE knicken die durch Proteolyse bestimmten Geschwindigkeitskonstanten ab und gehen in die durch spektroskopische Methoden detektierte langsame Entfaltungsphase über (Abb. 34). Da die durch Proteolyse bestimmten Entfaltungskonstanten nicht denen der schnellen Entfaltungsphase folgen, muss die *Bildung* des nativ-ähnlichen Zustands limitierend sein. Bei einer schnelleren Bildung des nativ-ähnlichen Zustands würden die durch Proteolyse bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase folgen. Daher kann nur der Anteil an N* bei Entfaltungsexperimenten detektiert werden, der bereits unter nativen Bedingungen populiert ist. Zieht man die Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Entfaltungsphase von denen, die mittels limitierter Proteolyse erhalten wurden, im Bereich zwischen 35 – 45 % (v/v) TFE ab, erhält man eine Geschwindigkeitskonstante von $0,014 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$, die der Bildung von N* unter diesen Bedingungen entspricht und in der Größenordnung der *trans*→*cis* Prolinisomerisierung unter denaturierenden Bedingungen liegt (Golbik et al. 1999). Diese Tatsache lässt eine *trans*→*cis* Prolinisomerisierung als Ursache für die TFE-unabhängige Entfaltungsreaktion unter nativen Bedingungen wahrscheinlicher werden.

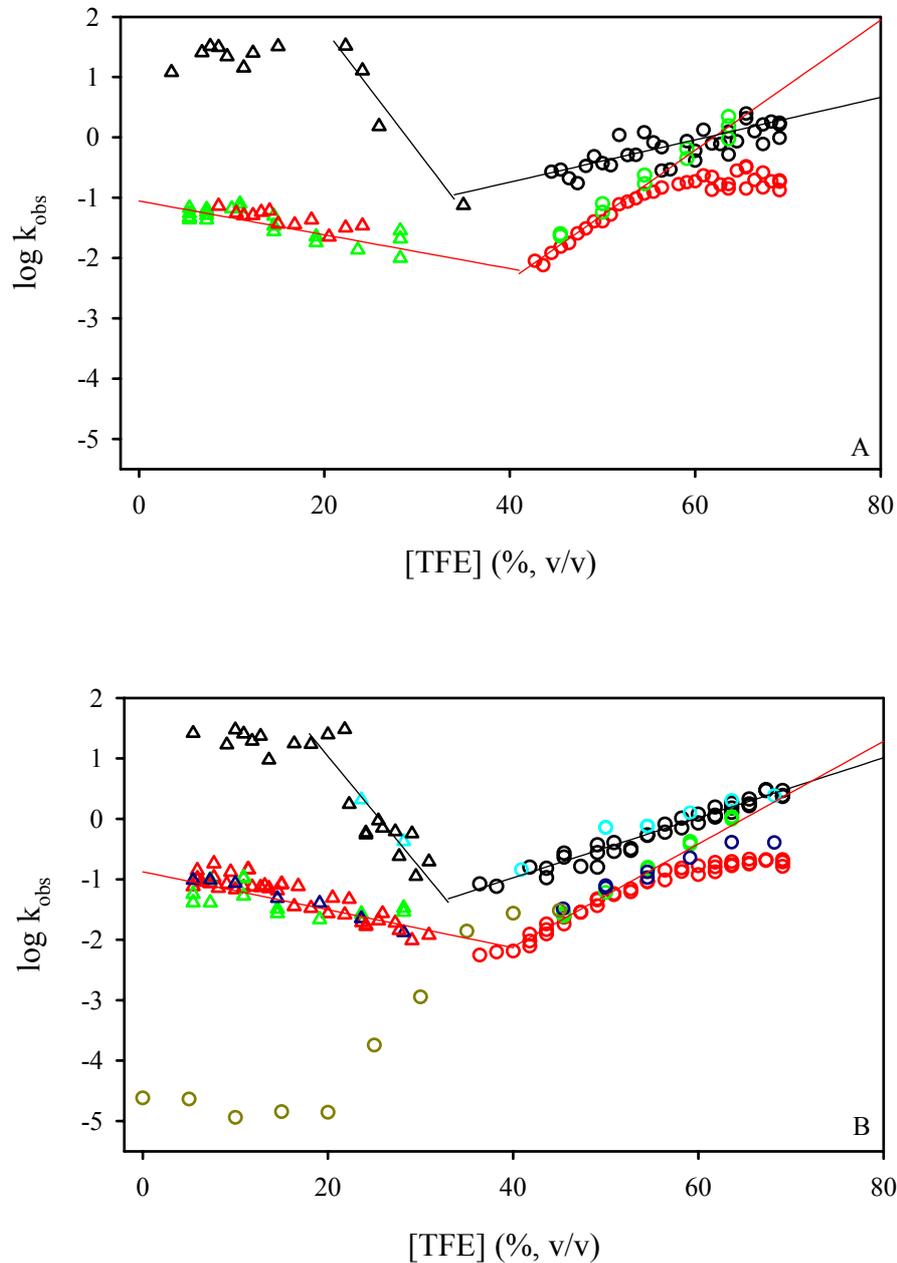


Abb. 34: Chevron-Plot von RNase A (A) und A20P-RNase A (B) in TFE bei 25°C.

Gezeigt sind die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungs- (Kreise) und Rückfaltungsreaktionen (Dreiecke), erhalten durch *stopped-flow* Fluoreszenz- (schnelle Phase \bullet , \blacktriangle ; langsame Phase \circ , \triangle), CD-Spektroskopie (schnelle Phase \circ , \triangle ; langsame Phase \bullet , \blacktriangle), *stopped-flow* Aktivitätsmessungen (\circ , \triangle) und durch limitierte Proteolyse (\circ). Die Daten entsprechen denen in Abb. 17B, Abb. 25, Abb. 27 und Abb. 29B.

4.1.13.3. Modell zur Entfaltung von RNase A

Ausgehend von diesen Überlegungen wird für die Entfaltung von RNase A in TFE folgendes Schema vorgeschlagen (Abb. 35). Unter nativen Bedingungen steht der native Zustand N mit einem nativ-ähnlichen Zustand N* im Gleichgewicht. Der nativ-ähnliche Zustand N* könnte sich durch ein nicht-natives *cis* Prolin vom nativen Zustand unterscheiden. Die Bildung von N*, welche durch Proteolyse verfolgt werden konnte, erfolgt unter nativen bzw. nativ-ähnlichen Bedingungen (< 20 % (v/v) TFE) mit einer Geschwindigkeitskonstante von ca. $2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Mit zunehmender TFE-Konzentration (> 20 %, v/v) wird die Bildung von N* durch die Zunahme der lokalen Flexibilität der Proteinkonformation bis zu einem Maximum von ca. $0,014 \text{ s}^{-1}$ beschleunigt. Dieses Maximum der Geschwindigkeitskonstante ist durch die *trans*→*cis* Prolinisomerisierung unter denaturierenden Bedingungen charakterisiert und somit unabhängig von der Denaturanskonzentration (Schmid and Baldwin 1979). Ob der proteolytische Abbau der intakten RNase A über den nativ-ähnlichen Zustand N* oder nach Entfaltung von N* über den denaturierten Zustand erfolgt, ist nicht geklärt. Jedoch ist ein Abbau über den nativ-ähnlichen Zustand unwahrscheinlich, da die Entfaltung von N* schneller (ca. $1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ unter nativen Bedingungen) als dessen Bildung erfolgt. Unter denaturierenden Bedingungen kann die Entfaltung beider nativen Spezies durch spektroskopische Methoden verfolgt werden, wobei N* auf Grund seiner geringeren kinetischen Stabilität schneller entfaltet. Nach Entfaltung der beiden Spezies erfolgen Prolinisomerisierungen entsprechend des thermodynamischen Gleichgewichts, wobei die Isomerisierung der Proline 93 und 114 (*cis* → *trans*, verfolgt durch Fluoreszenzspektroskopie) mit einer Geschwindigkeitskonstante von ca. $0,1 \text{ s}^{-1}$ bei 25°C erfolgt.

Dass der zunächst für A20P-RNase A mittels Proteolyse identifizierte nativ-ähnliche Zustand N* theoretisch auch durch die Einführung eines Prolins in Position 20 verursacht sein könnte, kann jedoch ausgeschlossen werden, da für RNase A sowohl eine ähnliche Entfaltungsgeschwindigkeit durch Proteolyse in 40 % (v/v) TFE als auch eine ähnliche schnelle Entfaltungsphase detektiert wurde. Somit muss eines der beiden im nativen Zustand in *trans* vorliegenden Proline 42 oder 117 (Wlodawer et al. 1982) in die Bildung von N* involviert sein.

Eine alternative Erklärung für die Bildung von N* durch eine von der Prolinisomerisierung unabhängige lokale Entfaltung von N sollte ausgeschlossen werden können, da eine lokale Entfaltung schneller als die globale Entfaltung erfolgen muss und so

die durch Proteolyse bestimmten Geschwindigkeitskonstanten (Abb. 34) der schnellen Entfaltungsphase folgen müssten.

Das aus den vorliegenden Daten abgeleitete Modell steht im Einklang mit jüngsten Untersuchungen an RNase A mittels Puls- H/D-Austauschexperimenten (Juneja and Udgaonkar 2002), die ebenfalls das Vorhandensein eines nativ-ähnlicher Zustand N_1^* unter nativen Bedingungen detektierten. Dieser Zustand steht mit dem nativen (dominanten) Zustand in Gleichgewicht, wobei die Umwandlung von N zu N_1^* sehr langsam erfolgt, und ist durch das Vorhandensein einiger für den H/D-Austausch voll zugänglicher Amidprotonen gekennzeichnet.

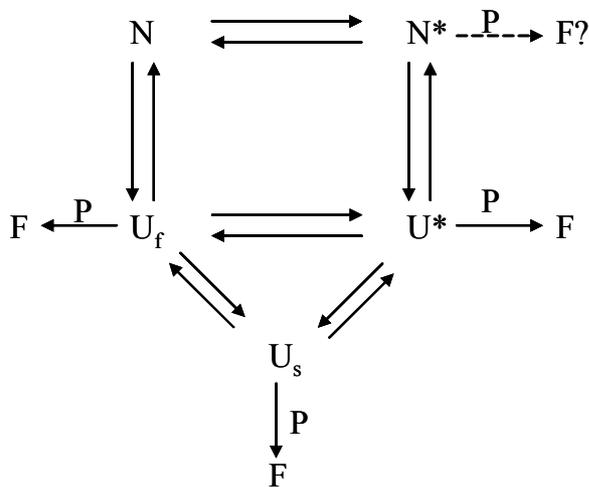


Abb. 35: Schema zur Entfaltung von RNase A.

N - nativer Zustand, N^* - nativ-ähnlicher Zustand, U_f (U_{vf}) - denaturierter Zustand mit allen Prolinen in nativer Konfiguration, U^* - denaturierter Zustand hervorgegangen aus N^* , U_s - Summe denaturierter Zustände mit nicht-nativer Prolinkonfiguration, P - Protease, F - Fragmente.

4.1.13.4. Rückfaltungskinetik von RNase A und A20P-RNase A in TFE

Bei der Rückfaltung von TFE-denaturierter RNase A und A20P-RNase A konnten wie für die Entfaltung zwei Phasen beobachtet werden. Die langsame Phase geht mit der Reaktivierung von RNase A einher (Abb. 34), wohingegen die Detektion der schnellen Phase durch Aktivitätsmessungen möglicherweise durch die sich ergebende kleine Amplitude (wie oben diskutiert) nicht möglich war. Beide Phasen konnten sowohl durch CD- als auch durch Fluoreszenzspektroskopie beobachtet werden. Die Amplitude der schnellen Phase beträgt 20 – 30 % und die der langsamen Phase 70 – 80 % der Gesamtreaktion (Abb. 30), was den in der Literatur beschriebenen Verhältnissen bei der Rückfaltung von RNase A aus GdnHCl entspricht (Garel et al. 1976). Das Auftreten von anderen zusätzlichen Rückfaltungsphase wie bei der Rückfaltung aus GdnHCl (Schmid and Blaschek 1981; Houry and Scheraga 1996a)

konnte nicht beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich auf die hier verwendete höhere Temperatur zurückzuführen, was im Einklang mit der Literatur steht (Nall et al. 1978; Schmid and Blaschek 1981; Houry et al. 1994).

Ausgehend vom aktuellsten Box-Modell der Arbeitsgruppe um H. A. Scheraga (Abb. 10), sind die im nativen Protein in *cis* vorliegenden Proline 93 und 114 und das in *trans* vorliegende Prolin 117 für die langsame Rückfaltung verantwortlich. Diese isomerisieren im denaturierten Zustand entsprechend des thermodynamischen Gleichgewichts, wodurch sich die entsprechenden Rückfaltungsphasen (U_{vf} , U_f , U_m , U_s^{II} und U_s^I) und deren Amplituden ableiten (Abb. 10). Für die Rückfaltung bei 25°C können die Rückfaltungsphasen der Spezies U_{vf} und U_f (Houry et al. 1994; Houry and Scheraga 1996a) bzw. U_s^{II} und U_s^I (Nall et al. 1978) nicht unterschieden werden. Des Weiteren wäre die Detektion der Rückfaltungsphasen von U_{vf} und U_m auf Grund der kleinen Amplituden (Wedemeyer et al. 2002) kaum möglich. Daher würden sich für die Rückfaltung bei 25°C zwei sichtbare Phasen ergeben.

Die bei der Rückfaltung aus TFE beobachtete schnelle Phase sollte der Rückfaltung von U_f und U_{vf} zu N entsprechen. Die langsame Phase sollte durch die Rückfaltung von U_s ($U_s^{II} + U_s^I$ mit U_s^{II} als Hauptphase) verursacht sein, wobei diese wahrscheinlich nicht der Bildung von N sondern der des nativ-ähnlichen Intermediats I_N (Schmid 1983) entspricht, in welchem sich das Prolin 93 noch in der nicht-nativen *trans* Konfiguration befindet.

Unter nativen Bedingungen weichen die schnelle und langsame Rückfaltungsphase von der linearen Abhängigkeit im Chevron-Plot ab (Abb. 34). Diese Abweichung trat bei der langsamen Phase erst in TFE-Konzentrationen < 15 % (v/v) auf und könnte in Analogie zur Rückfaltung aus GdnHCl durch die komplexe Rückfaltung ($U_s^{II} + U_s^I$), wobei verschiedene Intermediate durchlaufen werden, verursacht sein (Schmid 1983). Die schnelle Rückfaltungsphase zeigte in TFE-Konzentrationen < 20 % (v/v) eine von der Denaturationskonzentration unabhängige Geschwindigkeitskonstante. Da diese Phase vorwiegend durch die Rückfaltung von U_f , das durch ein nicht-natives *trans* Pro114 charakterisiert ist (Abb. 10), verursacht sein sollte, könnte die TFE-unabhängige Reaktion auf die Prolinisomerisierung von Pro114 zurückzuführen sein. Diese *trans*→*cis* Isomerisierung wäre deutlich schneller als unter denaturierenden Bedingungen und würde durch die native Struktur erzwungen werden. Interessanterweise sind die Beträge der Anstiege der schnellen Rückfaltungsphase ($m_{k_f} = -0,43$) und der durch limitierte Proteolyse bestimmten Entfaltungsgeschwindigkeit ($m_{k_u} = 0,45$) zwischen 20 und 35 % (v/v) TFE sehr ähnlich (Abb. 34), wodurch beide Phasen Hin- und Rückreaktion eines thermodynamischen Gleichgewichts darstellen könnten. Da beide Reaktionen möglicherweise durch die *cis/trans*

Prolinisomerisierung geprägt sind (Rückfaltung: Bildung des nativen *cis* Pro114; Entfaltung: Bildung eines nicht-nativen *cis* Prolins), könnte die Gemeinsamkeit beider Phasen auch auf eine Abhängigkeit der Prolinisomerisierung von der Stabilität der nativen (lokalen) Struktur zurückzuführen sein. Mit steigender TFE-Konzentration sinkt die Stabilität der nativen (lokalen) Struktur, wodurch die Geschwindigkeitskonstanten der Prolinisomerisierung sich denen in unstrukturierten Peptiden bzw. entfalteten Proteinen annähern. In TFE-Konzentrationen < 20 % (v/v) würde danach die lokale native Struktur ihre maximale Stabilität besitzen (alle die zur Stabilisierung notwendigen Wechselwirkungen sind vorhanden), wodurch eine weitere Beschleunigung bzw. Hemmung der Prolinisomerisierungsreaktion nicht möglich wäre.

4.1.13.5. Energieprofil für die Faltung von A20P-RNase A

Aus den Daten der Chevron-Plots (Abb. 34) wurden für die verschiedenen Faltungsreaktionen die Geschwindigkeitskonstanten k^0 und die freien Aktivierungsenthalpien $\Delta G^{\#0}$ unter nativen Bedingungen ermittelt (Tab. 3). Dabei handelt es sich, wie bereits erläutert, bei der schnellen Entfaltungsphase um die Entfaltung von N^* , bei der Hauptentfaltungsphase um die Entfaltung von N , bei der schnellen bzw. langsamen Rückfaltungsphase um die Rückfaltung von U_f ($U_f + U_{vf}$) bzw. von U_s ($U_s^{II} + U_s^I$). Während die für die schnelle Rückfaltungsphase erhaltene Geschwindigkeitskonstante k^0 weit außerhalb des für die Proteinfaltung bekannten Bereichs liegt, wurde für die Geschwindigkeitskonstante der langsamen Rückfaltungsphase ein Wert in der für RNase A bekannten Größenordnung erhalten (Nall et al. 1978). Die für die Hauptentfaltungsphase von RNase A bestimmten Geschwindigkeitskonstanten unter nativen Bedingungen (Tab. 3) stimmen mit den Daten in der Literatur überein (Arnold and Ulbrich-Hofmann 2001). Die für RNase A und A20P-RNase A erhaltenen Ergebnisse (Abb. 34, Tab. 3) unterstreichen das ähnliche kinetische Verhalten von RNase A und A20P-RNase A.

Aus den freien Aktivierungsenthalpien wurden die freien Enthalpien zwischen den verschiedenen Zuständen kalkuliert (Tab. 4) Für A20P-RNase A wurde stellvertretend das sich aus den freien Enthalpien der verschiedenen Zustände ergebende Energieprofil erstellt (Abb. 36). Auf eine Darstellung des Energieprofils für die verschiedenen Zustände von RNase A wurde auf Grund der hohen Ähnlichkeit zu A20P-RNase A verzichtet. Die Aktivierungsenergie zwischen N und N^* wurde aus der unter nativen Bedingungen mittels Proteolyse bestimmten Geschwindigkeitskonstante von $ca. 2 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ ermittelt und für die Bestimmung der Aktivierungsenergie zwischen U_f und U_s wurde eine

Geschwindigkeitskonstante der *trans*→*cis* Prolinisomerisierung von ca. $0,01 \text{ s}^{-1}$ angenommen (Golbik et al. 1999).

Auf Grund der Prolinisomerisierung im denaturierten Zustand, die die Rückfaltungsreaktion stark beeinflusst (Wedemeyer et al. 2002), und der Existenz mehrerer Intermediate gibt das Energieprofil die Komplexität der Faltungsreaktionen nur unvollständig wider.

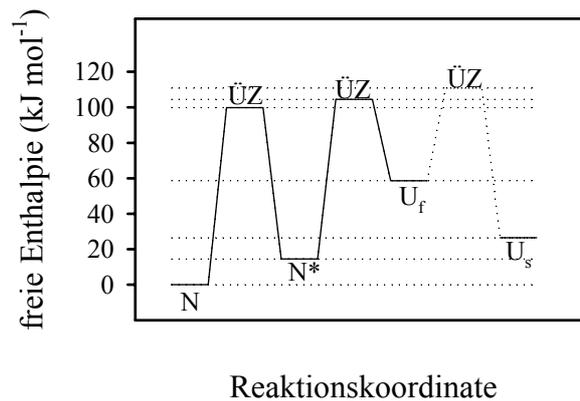


Abb. 36: Energieprofil für die Faltung von A20P-RNase A bei 25°C.

Das Energieprofil der Zustände N, N*, U_f (U_f + U_{vf}), U_s (U_s^{II} + U_s^I) und der Übergangszustände (ÜZ) wurden aus den kinetischen bzw. thermodynamischen Daten in Tab. 3 und Tab. 4 erzeugt. Die freie Enthalpie von N wurde dabei willkürlich auf $0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ gesetzt. Die freie Aktivierungsenthalpie zwischen N und N* wurde aus der unter nativen Bedingungen durch Proteolyse ermittelten Geschwindigkeitskonstante bestimmt und die zwischen U_f und U_s aus der Geschwindigkeitskonstante der *trans*→*cis* Prolinisomerisierung bei 25°C von ca. $0,01 \text{ s}^{-1}$ (Golbik et al. 1999).

4.2. *Einfluss von Mutationen in proteolytisch angreifbaren Regionen von RNase A auf ihre thermodynamische Stabilität*

Die Stabilisierung von Proteinen durch ihre Immobilisierung führte zur Entwicklung des Modells der Entfaltungsregion (Ulbrich-Hofmann et al. 1999). Zur Identifizierung solcher für die Stabilität des Proteins wichtiger Regionen wurden Untersuchungen an verschiedenen Proteinen, unter anderem an RNase A, durchgeführt. Dabei wurde bei der thermischen Denaturierung von RNase A die Region Lys31 – Phe46, die durch Entfaltung von RNase A als erste für die Proteasen Trypsin und Thermolysin zugänglich wird, als Entfaltungsregion identifiziert (Arnold et al. 1996). Während diese Region erst durch Entfaltung proteolytisch zugänglich wird, ist die *loop*-Region um Ala20 bereits unter nativen Bedingungen durch verschiedene unspezifische Proteasen wie Subtilisin Carlsberg (Richards and Vithayathil 1959), Proteinase K (Rauber et al. 1978) und Elastase (Klee 1965) zugänglich. So kommt beiden Regionen eine beachtliche Rolle für die proteolytische Stabilität von RNase A zu, jedoch ist ihre Bedeutung für die thermodynamische Stabilität von RNase A noch weitgehend unbekannt. Daher wurde im folgenden der Einfluss von Mutationen in diesen beiden Regionen auf die thermodynamische Stabilität von RNase A untersucht.

Für diese Mutationsstudien wurden durch ortsgerichtete Mutagenese die entsprechenden Mutationen im *rnase*-Gen eingeführt (3.2.1.). Anschließend wurden die mutierten Gene überexprimiert. Die resultierenden RNase A-Varianten, welche als *inclusion bodies* anfielen, wurden rückgefaltet und gereinigt (3.2.4.).

4.2.1. **Auswahl der Mutationen**

Die Positionen der Mutationen in den zwei proteolytisch angreifbaren Regionen wurden in erster Linie nach den bekannten primären Schnittstellen für die jeweilige Protease ausgewählt. So wird RNase A bereits unter nativen Bedingungen durch Spaltung von Peptidbindungen um Ala20 durch Proteinase K (Ala20–Ser21, Rauber et al. 1978), Subtilisin Carlsberg (Ala20–Ser21, Richards and Vithayathil 1959) und Elastase (Ser21–Ser22, Markert et al. 2001) abgebaut. Unter denaturierenden Bedingungen werden in RNase A die Peptidbindungen Asn34–Leu35 und Thr45–Phe46 durch Thermolysin (Arnold et al. 1996) bzw. die Peptidbindungen Lys31–Ser32 und Arg33–Asn34 durch Trypsin (Ooi et al. 1963) als erste proteolytisch zugänglich. Daher wurden die Positionen 20, 21, 31, 33, 34, 35 und 46 für

Mutationsstudien ausgewählt (Abb. 37). Dabei wurden die Mutationen A20P, S21P, A20P/S21P, K31A/R33S, L35S, L35A, F46Y, N34D, L35S/F46Y, L35A/F46Y und K31A/R33S/F46Y durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführt (3.2.1.). Die Auswahl der einzuführenden Aminosäuren erfolgte mit Ausnahme von N34D, mit der der Einfluss einer Deamidierung in der postulierten Entfaltungsregion auf die Gesamtstabilität untersucht werden sollte, mit dem Ziel, primäre Schnittstellen der entsprechenden Proteasen zu entfernen bzw. zusätzliche potentielle Schnittstellen einzufügen. Um die Gesamtintegrität der Proteinstruktur zu gewährleisten, erfolgte die Auswahl der Mutationen nach den allgemeinen Regeln für Mutationsstudien (Fersht 1999).

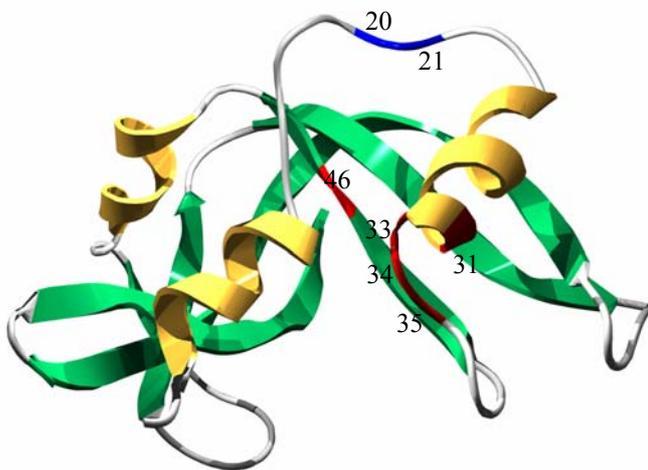


Abb. 37: Tertiärstruktur von RNase A.

Das Modell wurde der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm SwissPDBViewer erstellt. α -Helices und β -Faltblätter sind als Bänder dargestellt. Die Positionen der Aminosäureaustausche sind blau für die Region um Ala20 und rot für die postulierte Entfaltungsregion markiert.

4.2.2. CD-Spektren von RNase A und ihren Varianten

Zur Untersuchung des Einflusses der Mutationen auf die Struktur von RNase A wurden CD-Spektren im nahen und fernen UV-Bereich aufgenommen (Abb. 38). Alle RNase A-Varianten zeigten eine RNase A-ähnliche Tertiär- (Abb. 38A) und Sekundärstruktur (Abb. 38B). Während geringe Abweichungen in der Intensität des CD-Signals auf eine eventuell fehlerbehaftete Proteinkonzentrationsbestimmung zurückzuführen sind, weisen Abweichungen in der Form der CD-Spektren, aber auch größere Intensitätsänderungen des CD-Signals auf lokale Störungen der Wechselwirkungen im Proteinmolekül hin. Dies wurde bei der Variante A20P/S21P im fernen UV-Bereich (Abb. 38B) beobachtet, wobei diese Störungen der lokalen Struktur nicht die Bildung einer aktiven und somit nativen Konformation verhindert (siehe 4.2.3.). Die Abweichungen der CD-Spektren im nahen

UV-Bereich für die F46Y-Varianten (F46Y-, L35S/F46Y-, L35A/F46Y- und K31A/R33S/F46Y-RNase A) sind auf den zusätzlichen Signalbeitrag des eingeführten Tyrosins zurückzuführen, was mit einer stärkeren negativen Elliptizität einhergeht.

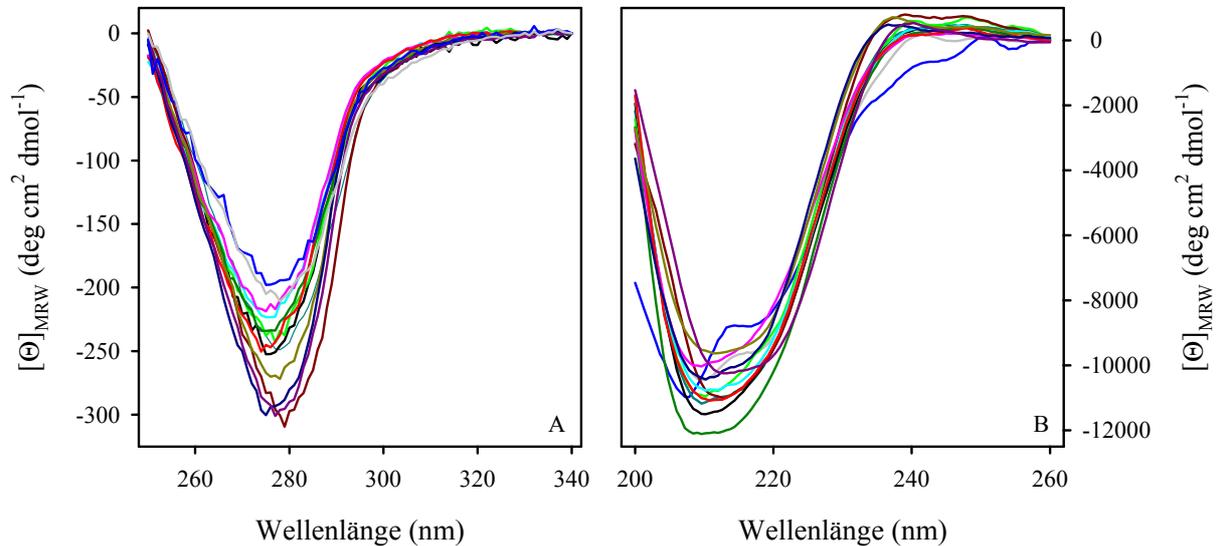


Abb. 38: CD-Spektren von RNase A und ihren Varianten.

Gezeigt sind die CD-Spektren von RNase A (—) und ihren Varianten A20P (—), S21P (—), A20P/S21P (—), S21L (—), N34D (—), K31A/R33S (—), L35S (—), L35A (—), F46Y (—), L35A/F46Y (—), L35S/F46Y (—) und K31A/R33S/F46Y (—) im nahen (A) und fernen (B) UV-Bereich. Die CD-Spektren wurden in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, bei 25°C wie unter 3.2.11. beschrieben aufgenommen.

4.2.3. Aktivität von RNase A und ihren Varianten

Während die CD-Spektroskopie mehr globale Strukturänderungen detektiert, kann die Aktivität schon durch kleinste lokale Störungen beeinflusst werden. Daher wurde die Aktivität von RNase A und ihren Varianten gegenüber IDT2 als Substrat bestimmt (3.2.9.2.). Die ermittelten $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte sind in Tabelle 5 dargestellt. Der für RNase A bestimmte $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $(3,9 \pm 0,7) \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ stimmt mit dem von Kelemen et al. (1999) von $(3,6 \pm 0,4) \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ überein. Wie in Abb. 39 in Form der relativen Aktivität demonstriert, waren alle RNase A-Varianten aktiv, wobei die Aktivität der Varianten sehr unterschiedlich ausfiel. Während die Aktivität durch Mutationen in der *loop*-Region um Ala20 weniger beeinflusst wurde (alle RNase A-Varianten wiesen eine relative Aktivität $> 60\%$ auf), nahm sie mit Ausnahme von L35A- und N34D-RNase A durch Mutationen in der postulierten Entfaltungsregion stärker ab. Dabei zeigten die Varianten L35S/F46Y und L35A/F46Y mit ca. 20% die geringste relative Aktivität.

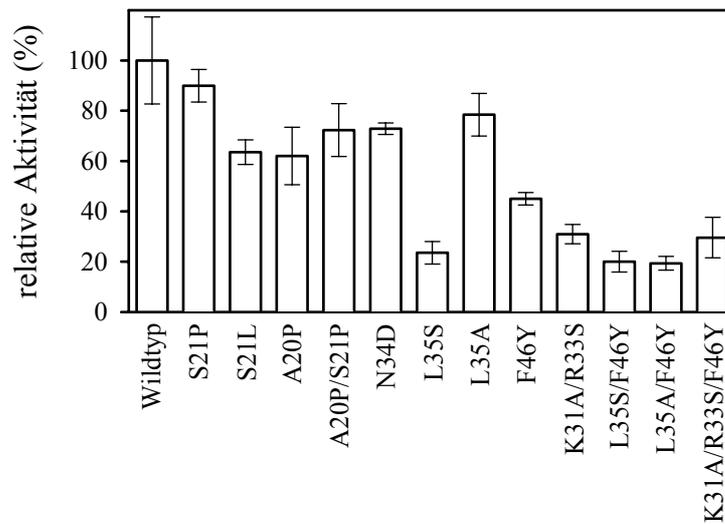


Abb. 39: Aktivität von RNase A und ihren Varianten gegenüber IDT2 als Substrat.

Die Aktivität wurde in 100 mM MES/NaOH, pH 6,0, in Gegenwart von 100 mM NaCl und 50 nM IDT2 wie unter 3.2.9.2. beschrieben bei 25°C bestimmt.

4.3.4. Thermodynamische Stabilität von RNase A und ihren Varianten

Um den Einfluss der Mutationen in den zwei proteolytisch zugänglichen Regionen auf die thermodynamische Stabilität zu untersuchen, wurden GdnHCl-induzierte Übergangskurven der RNase A-Varianten wie unter 3.2.12.2. beschrieben aufgenommen (Abb. 40). Aus diesen Übergangskurven wurde für das jeweilige Enzym der $[GdnHCl]_{1/2}$ -Wert, der $m_{\Delta G}$ -Wert (2.1.1.1.) und die freie Enthalpie in Abwesenheit des Denaturans ΔG^0 bestimmt (Tab. 5).

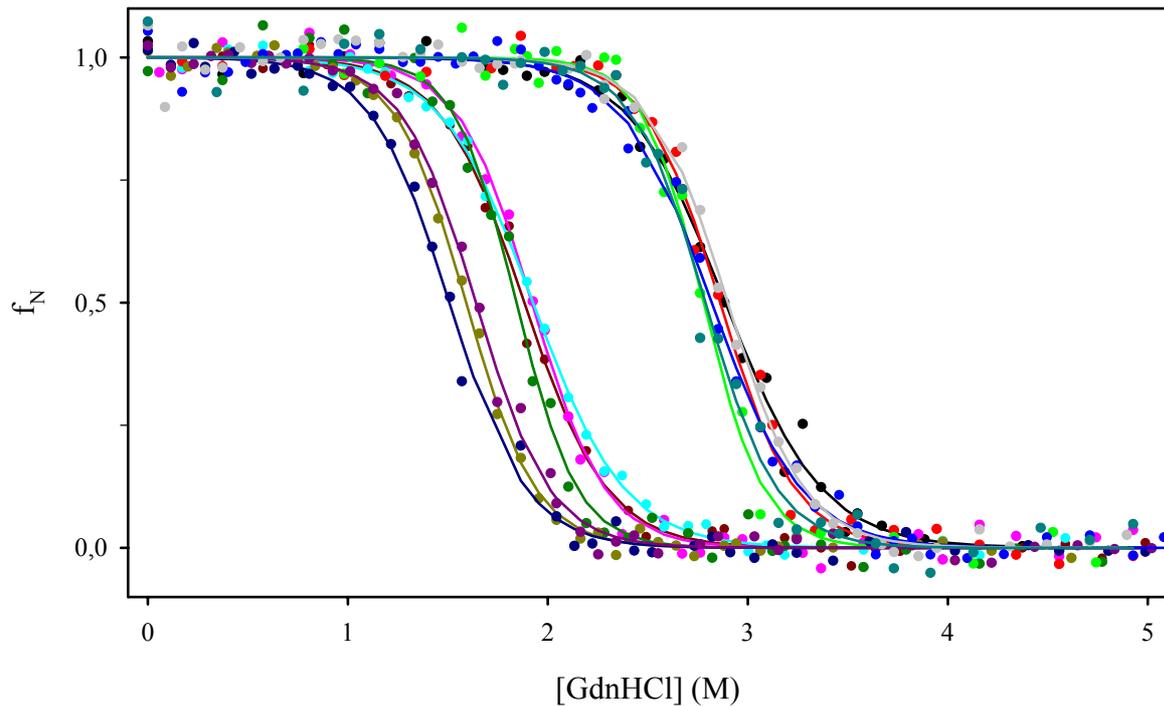


Abb. 40: GdnHCl-induzierte Übergangskurven von RNase A und ihren Varianten.

Gezeigt sind die GdnHCl-induzierten Übergangskurven von RNase A (—) und ihren Varianten A20P (—), S21P (—), A20P/S21P (—), S21L (—), N34D (—), K31A/R33S (—), L35S (—), L35A (—), F46Y (—), L35A/F46Y (—), L35S/F46Y (—) und K31A/R33S/F46Y (—). Die Übergangskurven wurden in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, wie unter 3.2.12.2. beschrieben mittels Fluoreszenzspektroskopie bei 25°C aufgenommen.

Interessanterweise bildeten die RNase A-Varianten in den in Abb. 40 dargestellten Übergangskurven 3 Gruppen. Die 1. Gruppe der Varianten wies keine signifikante Änderung der GdnHCl-induzierten Entfaltung auf, was durch die ähnlichen $[GdnHCl]_{1/2}$ -Werte im Bereich von $2,85 \pm 0,10$ M (Tab. 5) belegt wurde. Mit Ausnahme von N34D enthielt diese Gruppe ausschließlich Mutationen in der *loop*-Region um Ala20. Die 2. Gruppe von Varianten zeigte eine drastische Abnahme der $[GdnHCl]_{1/2}$ -Werte auf $1,85 \pm 0,10$ M (Tab. 5). Bei diesen Varianten befanden sich die Mutationen in der postulierten Entfaltungsregion. Die 3. Gruppe von Varianten wurde durch Kombination verschiedener destabilisierender Mutationen erhalten. Diese Gruppe von Enzymen wies eine weitere Destabilisierung auf. So lag der $[GdnHCl]_{1/2}$ -Wert für diese Varianten bei $1,59 \pm 0,10$ (Tab. 5). Abweichungen in den für die jeweilige Gruppe von RNasen ermittelten ΔG -Werten (Tab. 5) sind auf unterschiedliche Kooperativitäten in den Übergangskurven, die durch den Anstieg $m_{\Delta G}$ zum Ausdruck gebracht werden, zurückzuführen.

Tab 5: Aktivität und thermodynamische Parameter von RNase A und ihren Varianten bei 25°C.

Die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte wurden wie unter 3.2.9.2. beschrieben gegenüber IDT2 als Substrat in 100 mM MES/NaOH, pH 6,0 in Gegenwart von 100 mM NaCl ermittelt. Die thermodynamischen Parameter wurden aus den GdnHCl-induzierten Übergangskurven (Abb. 39) wie unter 3.2.13. beschrieben bestimmt.

Variante	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert ($\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1} \cdot 10^7$)	$[\text{GdnHCl}]_{1/2}$ (M)	$m_{\Delta G}$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)	ΔG ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
RNase A	$3,9 \pm 0,7$	$2,79 \pm 0,03$	$13,7 \pm 1,6$	$38,3 \pm 4,8$
A20P	$2,4 \pm 0,4$	$2,89 \pm 0,03$	$10,2 \pm 0,9$	$29,5 \pm 2,8$
S21P	$3,5 \pm 0,3$	$2,90 \pm 0,02$	$13,0 \pm 0,8$	$37,7 \pm 2,6$
A20P/S21P	$2,8 \pm 0,4$	$2,82 \pm 0,02$	$11,1 \pm 0,8$	$31,2 \pm 2,3$
S21L	$2,5 \pm 0,2$	$2,78 \pm 0,02$	$16,4 \pm 1,8$	$45,4 \pm 5,4$
N34D	$2,9 \pm 0,1$	$2,86 \pm 0,02$	$13,1 \pm 1,2$	$37,6 \pm 3,9$
L35A	$3,1 \pm 0,3$	$1,93 \pm 0,02$	$10,8 \pm 0,6$	$20,7 \pm 1,3$
L35S	$0,9 \pm 0,2$	$1,84 \pm 0,02$	$16,1 \pm 1,9$	$29,7 \pm 3,8$
F46Y	$1,8 \pm 0,1$	$1,88 \pm 0,02$	$11,9 \pm 0,9$	$22,5 \pm 2,0$
K31A/R33S	$1,2 \pm 0,2$	$1,92 \pm 0,02$	$13,5 \pm 1,3$	$25,8 \pm 2,8$
L35A/F46Y	$0,8 \pm 0,1$	$1,59 \pm 0,01$	$14,1 \pm 0,6$	$22,4 \pm 1,2$
L35S/F46Y	$0,8 \pm 0,2$	$1,51 \pm 0,02$	$12,8 \pm 1,1$	$19,2 \pm 2,0$
K31A/R33S/F46Y	$1,2 \pm 0,3$	$1,64 \pm 0,02$	$13,4 \pm 0,9$	$22,0 \pm 1,7$

4.2.5. Zusammenfassende Diskussion des Einflusses von Mutationen in proteolytisch angreifbaren Regionen von RNase A auf ihre thermodynamische Stabilität

Da die RNase A-Varianten, welche zur RNase A eine vergleichbare thermodynamische Stabilität (Abb. 40) aufweisen, sich mit Ausnahme von N34D nur in der *loop*-Region um Ala20 befinden, scheint diese Region nur einen unbedeutenden Beitrag für die thermodynamische Stabilität des Gesamtproteins zu liefern. Dies steht in Einklang mit der hohen Flexibilität dieser *loop*-Region (Santoro et al. 1993), welche auch einen Angriff unspezifischer Proteasen ermöglicht. So wird sogar die Einführung zweier Prolinreste in

unmittelbarer Nachbarschaft zueinander (A20P/S21P) in dieser Region ohne wesentliche Beeinträchtigung der Stabilität von RNase A toleriert.

Da die RNase A-Variante N34D, an deren Position in RNase B ein Kohlenhydratrest gebunden ist, keine Abnahme der Stabilität aufweist, führt eine Deamidierung, wie sie bei der Alterung von Proteinen beobachtet werden kann, des sich in der Entfaltungsregion befindlichen Asn34 in RNase A im Gegensatz zu Asn67 (Orru et al. 2000) zu keiner Abnahme der Proteinstabilität. Dies steht im Einklang mit der guten Lösungsmittelzugänglichkeit der Asn34-Seitenkette (Tab. 6) und dem Fehlen von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Asn34-Seitenkette und anderen Aminosäureresten (Analyse mit dem Programm *WHAT IF*, Vriend 1990). In anderen Fällen können Deamidierungen von Aminosäureseitenketten zur Destabilisierung des Gesamtproteins führen und Ausgang für Umlagerungsreaktionen sein, die zu Isopeptidbindungen und zur anschließenden Spaltung des Proteinrückgrats führen (Zale and Klibanov 1986).

Tab. 6: Lösungsmittelzugänglichkeit der für die Mutationsstudien ausgewählten Aminosäurereste von RNase A.

Die Ermittlung der Parameter erfolgte mit dem Programm *WHAT IF* (Vriend 1990), wobei die Lösungsmittelzugänglichkeit (in Å²) mit steigenden Wert zunimmt. Der Wert 0 entspricht einer vollständigen Unzugänglichkeit.

Aminosäurerest	Totale Zugänglichkeit	Zugänglichkeit des Peptidrückgrats	Zugänglichkeit der Seitenkette
Ala20	4,3297	3,8055	0,5242
Ser21	31,5189	11,4322	20,0868
Lys31	30,7935	0,1559	30,6377
Arg33	17,6927	0,8737	16,8190
Asn34	21,5284	2,3256	19,2028
Leu35	4,6253	3,7516	0,8737
Phe46	0,0000	0,0000	0,0000

Die starke Abnahme der thermodynamischen Stabilität der RNase A-Varianten der Gruppen 2 und 3, die ausschließlich durch Mutationen in der Entfaltungsregion erhalten wurden, zeigt den beträchtlichen Beitrag dieser Region zur thermodynamischen Stabilität des Gesamtproteins. Die bei den Übergangskurven erhaltene Clusterung der RNase A-Varianten deutet auf gemeinsame komplexe Interaktionen der beteiligten Aminosäurereste hin. Wird eine dieser Interaktionen gestört (durch Mutation), so führt dies zwangsläufig zur Störung aller anderen Wechselwirkungen (Abb. 41). Die Destabilisierung von RNase A durch Mutationen in dieser Region werden auch durch die Experimente von Chatani et al. (Chatani et al. 2002) unterstützt, die ebenfalls eine beträchtliche Abnahme der Stabilität von RNase A durch Mutation des Phe46 beobachteten. Phe46 spielt eine bedeutende Rolle während der Faltung durch Ausbildung hydrophober Interaktionen und der korrekten Seitenkettenpackung zwischen zwei strukturellen Domänen (Chatani et al. 2002). Unsere Studien legen auch für Leu35, dessen Seitenkette sich wie die von Phe46 im Inneren des Moleküls befindet (Tab. 6), eine für die Ausbildung von hydrophoben Interaktionen mit Phe46 bedeutende Rolle nahe (Abb. 41). Untersuchungen dieser Region mittels *molecular modeling* durch Dr. G. Vriend (University of Nijmegen/ NL; persönliche Mitteilung) führten zu dem Schluss, dass jede Mutation in Position 35 auf Grund komplexer Interaktionen zwischen verschiedenen Aminosäuren zu einer Destabilisierung des Proteins führt. So sind wahrscheinlich nicht nur hydrophobe Wechselwirkungen sondern auch die optimale Packung der Seitenketten für die Stabilität dieser Region von Bedeutung. Neben diesen hydrophoben Interaktionen wird die Stabilität dieser Region auch durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der Seitenkette des Arg33 und dem Peptidrückgrat von Met13 und Arg10 (3 Wasserstoffbrücken) und einer Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette des Arg10 und dem Peptidrückgrat des Arg33 an der Oberfläche des Proteins unterstützt (Abb. 41). Für die Seitenkette von Lys31 wurden keine möglichen Wasserstoffbrückenbindungen identifiziert (Analyse mittels *WHAT IF*). So sollte die destabilisierende Wirkung der Mutation K31A/R33S vorwiegend auf die Mutation des Arg33 zurückzuführen sein. Insgesamt wird der Übergang der Helix 2 zum β -Faltblatt 1 durch eine Vielzahl komplexer Interaktionen stabilisiert. Solche Übergänge zwischen verschiedenen Strukturmotiven stellen in vielen Proteinen eine für die Stabilität kritische Strukturregion dar (Gilquin et al. 2000), die die Gesamtstabilität eines Proteins limitieren können.

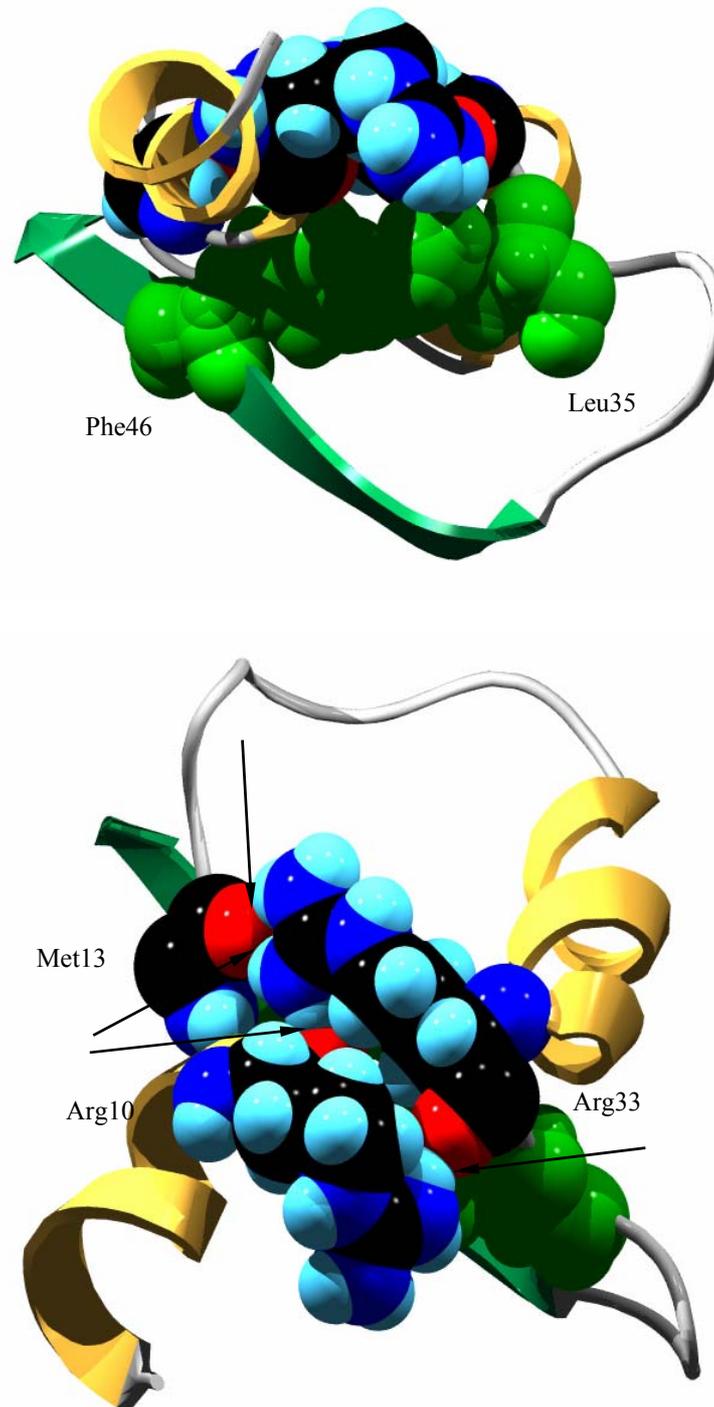


Abb. 41: Ausschnitt aus der Tertiärstruktur von RNase A.

Gezeigt sind der hydrophobe Kern (oben) bestehend aus Phe46 und Leu35 (grün) und das Wasserstoffbrückennetz gebildet aus den Seitenketten von Arg33, Arg10 und den Peptidrückgrat von Arg33, Arg10 und Met13 (unten). Die Wasserstoffbrücken sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Atome der Aminosäuren Arg33, Arg10 und des Peptidrückgrats von Met13 sind zur besseren Übersicht in verschiedenen Farben dargestellt. Kohlenstoff schwarz, Stickstoff blau, Sauerstoff rot und Wasserstoff hellblau.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass die Region Lys31–Phe46, die unter thermischer Denaturierung als erste proteolytisch zugänglich wird (Arnold et al. 1996), einen beträchtlichen Beitrag zur Gesamtstabilität des Proteinmoleküls beisteuert und unterstützen damit das Modell der Entfaltungsregion (Ulbrich-Hofmann et al. 1999).

5. Zusammenfassung

Im 1. Teil dieser Arbeit wurde die Stabilität und Faltung von RNase A und A20P-RNase A in TFE untersucht. Neben der Charakterisierung der Proteine durch spektroskopische Methoden wurde die Methode der limitierten Proteolyse zur Detektion lokaler Strukturänderungen und zur Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeiten unter nativen bzw. nativ-ähnlichen Bedingungen gewählt. Letztere wurde durch die Erweiterung der bisher verwendeten Gleichung (Imoto et al. 1986), wodurch der proteolytische Abbau des nativen Zustands berücksichtigt wurde, und durch das Design einer proteaseresistenteren RNase A-Variante, der A20P-RNase A (Markert et al. 2001), ermöglicht.

Während für RNase A durch spektroskopische Methoden keine Strukturänderungen in geringen TFE-Konzentrationen ($\leq 30\%$, v/v) beobachtet wurden, konnten durch Untersuchungen mittels limitierter Proteolyse eine Abnahme der Flexibilität der *loop*-Region um Ala20 bis 20% (v/v) TFE detektiert werden, die auf eine Stabilisierung der den *loop* um Ala20 einschließenden Helices durch TFE zurückgeführt wurde. So wurde hier erstmals eine Stabilisierung von Sekundärstrukturelementen im nativen Protein durch TFE nachgewiesen.

Neben einer genauen Charakterisierung des thermodynamischen Gleichgewichts wurden für RNase A und A20P-RNase A erstmalig die Ent- und Rückfaltungsreaktionen in TFE untersucht. Dazu dienten sowohl *stopped-flow* Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie als auch *stopped-flow* Aktivitätsmessungen. Diese Untersuchungen wurden zur Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeiten in TFE-Konzentrationen zwischen $0 - 45\%$ (v/v) durch die Methode der limitierten Proteolyse ergänzt. Die Kombination dieser Methoden, insbesondere die Bestimmung von Entfaltungsgeschwindigkeiten unter nativen und nativ-ähnlichen Bedingungen, führte zur Identifizierung einer nativ-ähnlichen Spezies. Diese wird bereits unter nativen Bedingungen populiert und wahrscheinlich durch eine Prolinisomerisierung verursacht.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an RNase A und A20P-RNase A unterstreichen das Leistungsvermögen der Methode der limitierten Proteolyse in Kombination mit spektroskopischen Methoden für die Untersuchung von Struktur und Faltung von Proteinen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Mutationen in proteolytisch sensitiven Regionen der RNase A auf die Gesamtstabilität des Enzyms untersucht. Bei den Regionen handelte es sich einerseits um die *loop*-Region um Ala20, die schon unter nativen Bedingungen durch unspezifische Proteasen proteolytisch zugänglich ist und andererseits um die Region Lys31-Phe46, die unter denaturierenden Bedingungen als erstes für die Proteasen

Trypsin und Thermolysin zugänglich wird (Arnold et al. 1996). Während die Region um Ala20 kaum einen Einfluss auf die thermodynamische Gesamtstabilität von RNase A hat, führten die Mutationen in der postulierten Entfaltungsregion zu einer drastischen Destabilisierung des Gesamtmoleküls. So wurde diese Region als ein besonders kritischer Bereich für die Stabilität des Gesamtproteins identifiziert.

6. Literaturverzeichnis

- Alexandrescu, A.T., Ng, Y.L., and Dobson, C.M. 1994. Characterization of a trifluoroethanol-induced partially folded state of alpha-lactalbumin. *J. Mol. Biol.* **235**: 587-599.
- Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230.
- Arnold, U., Hinderaker, M.P., Köditz, J., Golbik, R., Ulbrich-Hofmann, R., and Raines, R.T. 2003. Protein prosthesis: a nonnatural residue accelerates folding and increases stability. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 7500-7501.
- Arnold, U., Hinderaker, M.P., Nilsson, B.L., Huck, B.R., Gellman, S.H., and Raines, R.T. 2002. Protein prosthesis: a semisynthetic enzyme with a beta-peptide reverse turn. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 8522-8523.
- Arnold, U., Rücknagel, K.P., Schierhorn, A., and Ulbrich-Hofmann, R. 1996. Thermal unfolding and proteolytic susceptibility of ribonuclease A. *Eur. J. Biochem.* **237**: 862-869.
- Arnold, U., Schierhorn, A., and Ulbrich-Hofmann, R. 1998. Influence of the carbohydrate moiety on the proteolytic cleavage sites in ribonuclease B. *J. Protein Chem.* **17**: 397-405.
- Arnold, U., Schierhorn, A., and Ulbrich-Hofmann, R. 1999. Modification of the unfolding region in bovine pancreatic ribonuclease and its influence on the thermal stability and proteolytic fragmentation. *Eur. J. Biochem.* **259**: 470-475.
- Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. 1997. Kinetic and thermodynamic thermal stabilities of ribonuclease A and ribonuclease B. *Biochemistry* **36**: 2166-2172.
- Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. 2000. Differences in the denaturation behavior of ribonuclease A induced by temperature and guanidine hydrochloride. *J. Protein Chem.* **19**: 345-352.
- Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. 2001. Proteolytic degradation of ribonuclease A in the pretransition region of thermally and urea-induced unfolding. *Eur. J. Biochem.* **268**: 93-97.
- Bajorath, J., Saenger, W., and Pal, G.P. 1988. Autolysis and inhibition of proteinase K, a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album Limber*. *Biochim. Biophys. Acta* **954**: 176-182.
- Baldwin, R.L. 1993. Pulsed H/D-exchange studies of folding intermediates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**: 84-91.
- Benz, F.W., and Roberts, G.C. 1973. NMR Studies of the unfolding of ribonuclease by guanidine hydrochloride. Evidence for intermediate states. *FEBS Lett.* **29**: 263-266.
- Betzl, C., Pal, G.P., Struck, M., Jany, K.D., and Saenger, W. 1986. Active-site geometry of proteinase K. Crystallographic study of its complex with a dipeptide chloromethyl ketone inhibitor. *FEBS Lett.* **197**: 105-110.
- Björk, I., and Pol, E. 1992. Biphasic transition curve on denaturation of chicken cystatin by guanidinium chloride. Evidence for an independently unfolding structural region. *FEBS Lett.* **299**: 66-68.
- Blake, C.C., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C., Phillips, D.C., and Sarma, V.R. 1965. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* **206**: 757-761.
- Blanco, F.J., Herranz, J., Gonzales, C., Jiménez, M.A., Rico, M., Santoro, J., and Nieto, J.L. 1992. NMR chemical shifts: a tool to characterize distortions of peptide and protein helices. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 9676-9677.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, J.H. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.

- Brandts, J.F., Halvorson, H.R., and Brennan, M. 1975. Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**: 4953-4963.
- Braunitzer, G., Gehring-Mueller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V., and Wittmann-Liebold, B. 1961. Structure of normal adult human hemoglobins. *Z. Physiol. Chem.* **325**: 283-286.
- Brömme, P.K., Fink, S., and Fittkau, S. 1986. Enzyme-substrate interactions in the hydrolysis of peptide substrates by thermitase, subtilisin BPN', and proteinase K. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**: 439-446.
- Brooks, C.L. 1993. Promotion of helix formation in peptides dissolved in alcohol and water-alcohol mixtures. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 11034-11035.
- Buck, M. 1998. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q. Rev. Biophys.* **31**: 297-355.
- Buck, M., Radford, S.E., and Dobson, C.M. 1993. A partially folded state of hen egg white lysozyme in trifluoroethanol: structural characterization and implications for protein folding. *Biochemistry* **32**: 669-678.
- Buck, M., Schwalbe, H., and Dobson, C.M. 1995. Characterization of conformational preferences in a partly folded protein by heteronuclear NMR spectroscopy: assignment and secondary structure analysis of hen egg-white lysozyme in trifluoroethanol. *Biochemistry* **34**: 13219-13232.
- Buck, M., Schwalbe, H., and Dobson, C.M. 1996. Main-chain dynamics of a partially folded protein: ¹⁵N NMR relaxation measurements of hen egg white lysozyme denatured in trifluoroethanol. *J. Mol. Biol.* **257**: 669-683.
- Buckler, D.R., Haas, E., and Scheraga, H.A. 1995. Analysis of the structure of ribonuclease A in native and partially denatured states by time-resolved nonradiative dynamic excitation energy transfer between site-specific extrinsic probes. *Biochemistry* **34**: 15965-15978.
- Budisa, N., Minks, C., Alefelder, S., Wenger, W., Dong, F., Moroder, L., and Huber, R. 1999. Toward the experimental codon reassignment in vivo: protein building with an expanded amino acid repertoire. *Faseb J.* **13**: 41-51.
- Budisa, N., Minks, C., Medrano, F.J., Lutz, J., Huber, R., and Moroder, L. 1998. Residue-specific bioincorporation of non-natural, biologically active amino acids into proteins as possible drug carriers: structure and stability of the per-thiaproline mutant of annexin V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**: 455-459.
- Budisa, N., Rubini, M., Bae, J.H., Weyher, E., Wenger, W., Golbik, R., Huber, R., and Moroder, L. 2002. Global replacement of tryptophan with aminotryptophans generates non-invasive protein-based optical pH sensors. *Angew. Chem.* **41**: 4066-4069.
- Burton, S.G., Cowan, D.A., and Woodley, J.M. 2002. The search for the ideal biocatalyst. *Nat. Biotechnol.* **20**: 37-45.
- Chaloin, L., Vidal, P., Heitz, A., Van Mau, N., Mery, J., Divita, G., and Heitz, F. 1997. Conformations of primary amphipathic carrier peptides in membrane mimicking environments. *Biochemistry* **36**: 11179-11187.
- Chatani, E., Nonomura, K., Hayashi, R., Balny, C., and Lange, R. 2002. Comparison of heat- and pressure-induced unfolding of ribonuclease A: the critical role of phe46 which appears to belong to a new hydrophobic chain-folding initiation site. *Biochemistry* **41**: 4567-4574.
- Chen, M.C., and Lord, R.C. 1976. Laser Raman spectroscopic studies of the thermal unfolding of ribonuclease A. *Biochemistry* **15**: 1889-1897.
- Chiti, F., Taddei, N., Webster, P., Hamada, D., Fiaschi, T., Ramponi, G., and Dobson, C.M. 1999a. Acceleration of the folding of acylphosphatase by stabilization of local secondary structure. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 380-387.

- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C.M. 1999b. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**: 3590-3594.
- Chitra, R., and Smith, P.E. 2002. Molecular association in solution: a Kirkwood-Buff analysis of sodium chloride, ammonium sulfate, guanidinium chloride, urea, and 2,2,2-trifluoroethanol in water. *J. Phys. Chem.* **106**: 1491-1500.
- Cook, K.H., Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. 1979. Role of proline isomerization in folding of ribonuclease A at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **76**: 6157-6161.
- Crook, E.M., Mathias, A.P., and Rabin, B.R. 1960. Spectrophotometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of cytidine 2':3'-phosphate. *Biochem. J.* **74**: 234-238.
- Cuchillo, C.M., Moussaoui, M., Barman, T., Travers, F., and Nogues, M.V. 2002. The exo- or endonucleolytic preference of bovine pancreatic ribonuclease A depends on its subsites structure and on the substrate size. *Protein Sci.* **11**: 117-128.
- Cuchillo, C.M., Pares, X., Guasch, A., Barman, T., Travers, F., and Nogues, M.V. 1993. The role of 2',3'-cyclic phosphodiester in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products? *FEBS Lett.* **333**: 207-210.
- Cuchillo, C.M., Vilanova, M., and Nogues, M.V. 1997. Pancreatic ribonucleases. In *Ribonucleases Structures and Functions*. (eds. G. D'Alessio, and J.F. Riordan), pp. 271-303.
- Curtil, C., Channac, L., Ebel, C., and Masson, P. 1994. Cold-induced conformational changes of ribonuclease A as investigated by subzero transverse temperature gradient gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **1208**: 1-7.
- De Filippis, V., Sander, C., and Vriend, G. 1994. Predicting local structural changes that result from point mutations. *Protein Eng.* **7**: 1203-1208.
- De Loof, H., Nilsson, L., and Rigler, R. 1992. Molecular dynamics simulation of galanin in aqueous and nonaqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 4028-4035.
- delCardayré, S.B., and Raines, R.T. 1994. Structural determinants of enzymatic processivity. *Biochemistry* **33**: 6031-6037.
- delCardayré, S.B., and Raines, R.T. 1995. A residue to residue hydrogen bond mediates the nucleotide specificity of ribonuclease A. *J. Mol. Biol.* **252**: 328-336.
- delCardayré, S.B., Ribo, M., Yokel, E.M., Quirk, D.J., Rutter, W.J., and Raines, R.T. 1995. Engineering ribonuclease A: production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein Eng.* **8**: 261-273.
- Dodge, R.W., Laity, J.H., Rothwarf, D.M., Shimotakahara, S., and Scheraga, H.A. 1994. Folding pathway of guanidine-denatured disulfide-intact wild-type and mutant bovine pancreatic ribonuclease A. *J. Protein Chem.* **13**: 409-421.
- Dodge, R.W., and Scheraga, H.A. 1996. Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* **35**: 1548-1559.
- Dong, A., Matsuura, J., Manning, M.C., and Carpenter, J.F. 1998. Intermolecular beta-sheet results from trifluoroethanol-induced nonnative alpha-helical structure in beta-sheet predominant proteins: infrared and circular dichroism spectroscopic study. *Arch. Biochem. Biophys.* **355**: 275-281.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H.D., and Lang, H. 1974. Proteinase K from *Tritirachium album Limber*. *Eur. J. Biochem.* **47**: 91-97.
- Eijsink, V.G., Veltman, O.R., Aukema, W., Vriend, G., and Venema, G. 1995. Structural determinants of the stability of thermolysin-like proteinases. *Nat. Struct. Biol.* **2**: 374-379.

- Evans, P.A., Kautz, R.A., Fox, R.O., and Dobson, C.M. 1989. A magnetization-transfer nuclear magnetic resonance study of the folding of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **28**: 362-370.
- Evans, T.C., Jr., Benner, J., and Xu, M.Q. 1998. Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Sci.* **7**: 2256-2264.
- Fagain, C.O. 1995. Understanding and increasing protein stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**: 1-14.
- Fersht, A. 1999. *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Fischer, G., and Bang, H. 1985. The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* **828**: 39-42.
- Fischer, G., and Schmid, F.X. 1990. The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry* **29**: 2205-2212.
- Fontana, A., Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M., and Zambonin, M. 1986. Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry* **25**: 1847-1851.
- Fontana, A., Zambonin, M., De Filippis, V., Bosco, M., and Polverino de Laureto, P. 1995. Limited proteolysis of cytochrome c in trifluoroethanol. *FEBS Lett.* **362**: 266-270.
- Fregeau Gallagher, N.L., Sailer, M., Niemczura, W.P., Nakashima, T.T., Stiles, M.E., and Vederas, J.C. 1997. Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* **36**: 15062-15072.
- Fu, D., Chen, L., and O'Neill, R.A. 1994. A detailed structural characterization of ribonuclease B oligosaccharides by ¹H NMR spectroscopy and mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* **261**: 173-186.
- Fujii, M., Takagi, M., Imanaka, T., and Aiba, S. 1983. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in a vector plasmid and its expression in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **154**: 831-837.
- Galat, A. 1985. Early stages in the trifluoroethanol-induced unfolding of hen egg-white lysozyme and its complex with (GlcNAc)₃. *Biochim. Biophys. Acta* **827**: 221-227.
- Garel, J.R., and Baldwin, R.L. 1973. Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 3347-3351.
- Garel, J.R., Nall, B.T., and Baldwin, R.L. 1976. Guanidine-unfolded state of ribonuclease A contains both fast- and slow refolding species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1853-1857.
- Gast, K., Zirwer, D., Müller-Frohne, M., and Damaschun, G. 1999. Trifluoroethanol-induced conformational transitions of proteins: insights gained from the differences between alpha-lactalbumin and ribonuclease A. *Protein Sci.* **8**: 625-634.
- Gilquin, B., Guilbert, C., and Perahia, D. 2000. Unfolding of hen egg lysozyme by molecular dynamics simulations at 300K: insight into the role of the interdomain interface. *Proteins* **41**: 58-74.
- Gokhale, R.S., Agarwalla, S., Santi, D.V., and Balaram, P. 1996. Covalent reinforcement of a fragile region in the dimeric enzyme thymidylate synthase stabilizes the protein against chaotrope-induced unfolding. *Biochemistry* **35**: 7150-7158.
- Golbik, R., Fischer, G., and Fersht, A.R. 1999. Folding of barstar C40A/C82A/P27A and catalysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerization by human cytosolic cyclophilin (Cyp18). *Protein Sci.* **8**: 1505-1514.
- Grandori, R. 2002. Detecting equilibrium cytochrome c folding intermediates by electrospray ionisation mass spectrometry: two partially folded forms populate the molten-globule state. *Protein Sci.* **11**: 453-458.

- Guo, H., and Karplus, M. 1994. Solvent influence on the stability of the peptide hydrogen bond: a supramolecular cooperative effect. *J. Phys. Chem.* **98**: 7104-7105.
- Hamada, D., Chiti, F., Guijarro, J.I., Kataoka, M., Taddei, N., and Dobson, C.M. 2000. Evidence concerning rate-limiting steps in protein folding from the effects of trifluoroethanol. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 58-61.
- Hamada, D., and Goto, Y. 1997. The equilibrium intermediate of beta-lactoglobulin with non-native alpha-helical structure. *J. Mol. Biol.* **269**: 479-487.
- Hermans, J.J., and Scheraga, H.A. 1961. Structural studies of ribonuclease. V. Reversible change of configuration. *J. Am. Chem. Soc.* **83**: 3283-3292.
- Hilz, H., Wieggers, U., and Adamietz, P. 1975. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: Application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. *Eur. J. Biochem.* **56**: 103-108.
- Hirota, N., Mizuno, K., and Goto, Y. 1997. Cooperative alpha-helix formation of beta-lactoglobulin and melittin induced by hexafluoroisopropanol. *Protein Sci.* **6**: 416-421.
- Hirs, C.H.W., Moore, S., and Stein, W.H. 1960. The sequence of the amino acid residues in performic acid-oxidized ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **235**: 633-647.
- Hong, D.-P., Hoshino, M., Kuboi, R., and Goto, Y. 1999. Clustering of fluorine-substituted alcohols as a factor responsible for their marked effects on proteins and peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 8427-8433.
- Hoshino, M., Hagihara, Y., Hamada, D., Kataoka, M., and Goto, Y. 1997. Trifluoroethanol-induced conformational transition of hen egg-white lysozyme studied by small-angle X-ray scattering. *FEBS Lett.* **416**: 72-76.
- Houry, W.A., Rothwarf, D.M., and Scheraga, H.A. 1994. A very fast phase in the refolding of disulfide-intact ribonuclease A: implications for the refolding and unfolding pathways. *Biochemistry* **33**: 2516-2530.
- Houry, W.A., Rothwarf, D.M., and Scheraga, H.A. 1996. Circular dichroism evidence for the presence of burst-phase intermediates on the conformational folding pathway of ribonuclease A. *Biochemistry* **35**: 10125-10133.
- Houry, W.A., and Scheraga, H.A. 1996a. Nature of the unfolded state of ribonuclease A: effect of cis-trans X-Pro peptide bond isomerization. *Biochemistry* **35**: 11719-11733.
- Houry, W.A., and Scheraga, H.A. 1996b. Structure of a hydrophobically collapsed intermediate on the conformational folding pathway of ribonuclease A probed by hydrogen-deuterium exchange. *Biochemistry* **35**: 11734-11746.
- Howarth, O.W. 1979. The thermal unfolding of ribonuclease A. A ¹³C NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* **576**: 163-175.
- Huang, K., Park, Y.D., Cao, Z.F., and Zhou, H.M. 2001. Reactivation and refolding of rabbit muscle creatine kinase denatured in 2,2,2-trifluoroethanol solutions. *Biochim. Biophys. Acta* **1545**: 305-313.
- Hubbard, S.J. 1998. The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1382**: 191-206.
- Huyghues-Despointes, B.M., Scholtz, J.M., and Pace, C.N. 1999. Protein conformational stabilities can be determined from hydrogen exchange rates. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 910-912.
- Imoto, T., Yamada, H., and Ueda, T. 1986. Unfolding rates of globular proteins determined by kinetics of proteolysis. *J. Mol. Biol.* **190**: 647-649.
- Iwasaki, K., and Fujiyama, T. 1977. Light-scattering study of clathrate hydrate formation in binary mixtures of tert-butyl alcohol and water. *J. Phys. Chem.* **81**: 1908-1912.
- Jaenicke, R. 1981. Enzymes under extremes of physical conditions. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**: 1-67.

- Jaenicke, R., and Böhm, G. 1998. The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 738-748.
- Jiménez, M.A., Nieto, J.L., Herranz, J., Rico, M., and Santoro, J. 1987. ¹H NMR and CD evidence of the folding of the isolated ribonuclease 50-61 fragment. *FEBS Lett.* **221**: 320-324.
- Jiménez, M.A., Rico, M., Herranz, J., Santoro, J., and Nieto, J.L. 1988. ¹H-NMR assignment and folding of the isolated ribonuclease 21-42 fragment. *Eur. J. Biochem.* **175**: 101-109.
- Jones, W. 1920. The action of boiled pancreas extract on yeast nucleic acid. *Am. J. Physiol.* **52**: 203-207.
- Juminaga, D., Wedemeyer, W.J., Garduno-Juarez, R., McDonald, M.A., and Scheraga, H.A. 1997. Tyrosyl interactions in the folding and unfolding of bovine pancreatic ribonuclease A: a study of tyrosine-to-phenylalanine mutants. *Biochemistry* **36**: 10131-10145.
- Juneja, J., and Udgaonkar, J.B. 2002. Characterization of the unfolding of ribonuclease A by a pulsed hydrogen exchange study: evidence for competing pathways for unfolding. *Biochemistry* **41**: 2641-2654.
- Kartha, G. 1967. Tertiary structure of ribonuclease. *Nature* **214**: 234 passim.
- Kelemen, B.R., Klink, T.A., Behlke, M.A., Eubanks, S.R., Leland, P.A., and Raines, R.T. 1999. Hypersensitive substrate for ribonucleases. *Nucleic Acids Res.* **27**: 3696-3701.
- Kendrew, J.C. 1963. Myoglobin and the structure of proteins. *Science* **139**: 1259-1266.
- Kentsis, A., and Sosnick, T.R. 1998. Trifluoroethanol promotes helix formation by destabilizing backbone exposure: desolvation rather than native hydrogen bonding defines the kinetic pathway of dimeric coiled coil folding. *Biochemistry* **37**: 14613-14622.
- Kiefhaber, T., and Baldwin, R.L. 1995. Kinetics of hydrogen bond breakage in the process of unfolding of ribonuclease A measured by pulsed hydrogen exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2657-2661.
- Kiefhaber, T., and Baldwin, R.L. 1996. Hydrogen exchange and the unfolding pathway of ribonuclease A. *Biophys. Chem.* **59**: 351-356.
- Kiefhaber, T., Kohler, H.H., and Schmid, F.X. 1992. Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. I. Theoretical models. *J. Mol. Biol.* **224**: 217-229.
- Kiefhaber, T., Labhardt, A.M., and Baldwin, R.L. 1995. Direct NMR evidence for an intermediate preceding the rate-limiting step in the unfolding of ribonuclease A. *Nature* **375**: 513-515.
- Kiefhaber, T., and Schmid, F.X. 1992. Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. II. Folding of ribonuclease A and ribonuclease T1. *J. Mol. Biol.* **224**: 231-240.
- Kim, P.S., and Baldwin, R.L. 1980. Structural intermediates trapped during the folding of ribonuclease A by amide proton exchange. *Biochemistry* **19**: 6124-6129.
- Klee, W.A. 1965. Ribonuclease E, an intermediate in the degradation of ribonuclease by porcine elastase. *J. Biol. Chem.* **240**: 2900-2906.
- Klee, W.A. 1967. Intermediate stages in the thermally induced transconformation reactions of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* **6**: 3736-3742.
- Klibanov, A.M. 1989. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 141-144.
- Klink, T.A., Woycechowsky, K.J., Taylor, K.M., and Raines, R.T. 2000. Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A. *Eur. J. Biochem.* **267**: 566-572.
- Köditz, J. 1998. Diplomarbeit: Studien zur Entfaltung von RNase A und RNase B in organischen Lösungsmitteln mittels limitierter Proteolyse. In *Fachbereich Biochemie/Biotechnologie*, pp. 1-75. Martin-Luther-Universität, Halle.

- Köditz, J., Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. 2002. Dissecting the effect of trifluoroethanol on ribonuclease A. Subtle structural changes detected by nonspecific proteases. *Eur. J. Biochem.* **269**: 3831-3837.
- Konno, T. 1998. Conformational diversity of acid-denatured cytochrome c studied by a matrix analysis of far-UV CD spectra. *Protein Sci.* **7**: 975-982.
- Kovrigin, E.L., and Potekhin, S.A. 1997. Preferential solvation changes upon lysozyme heat denaturation in mixed solvents. *Biochemistry* **36**: 9195-9199.
- Kumaran, S., and Roy, R.P. 1999. Helix-enhancing propensity of fluoro and alkyl alcohols: influence of pH, temperature and cosolvent concentration on the helical conformation of peptides. *J. Pept. Res.* **53**: 284-293.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.* **30**: 291-310.
- Kuprin, S., Graslund, A., Ehrenberg, A., and Koch, M.H. 1995. Nonideality of water-hexafluoropropanol mixtures as studied by X-ray small angle scattering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**: 1151-1156.
- Kypr, J., Chladkova, J., Zimulova, M., and Vorlickova, M. 1999. Aqueous trifluoroethanol solutions simulate the environment of DNA in the crystalline state. *Nucleic Acids Res.* **27**: 3466-3473.
- Labhardt, A.M. 1982. Secondary structure in ribonuclease: 1. equilibrium folding transitions seen by amide circular dichroism. *J. Mol. Biol.* **157**: 331-355.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lang, K., and Schmid, F.X. 1986. Use of a trypsin-pulse method to study the refolding pathway of ribonuclease. *Eur. J. Biochem.* **159**: 275-281.
- Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S.F., and Wyss, M. 2000. The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1543**: 408-415.
- Lehmann, M.S., Mason, S.A., and McIntyre, G.J. 1985. Study of ethanol-lysozyme interactions using neutron diffraction. *Biochemistry* **24**: 5862-5869.
- Lehrman, S.R., Tuls, J.L., and Lund, M. 1990. Peptide alpha-helicity in aqueous trifluoroethanol: correlations with predicted alpha-helicity and the secondary structure of the corresponding regions of bovine growth hormone. *Biochemistry* **29**: 5590-5596.
- Liang, C.J., Yamashita, K., and Kobata, A. 1980. Structural study of the carbohydrate moiety of bovine pancreatic ribonuclease B. *J. Biochem. (Tokyo)* **88**: 51-58.
- Lin, L.N., and Brandts, J.F. 1983. Isomerization of proline-93 during the unfolding and refolding of ribonuclease A. *Biochemistry* **22**: 559-563.
- Lin, L.N., and Brandts, J.F. 1984. Involvement of prolines-114 and -117 in the slow refolding phase of ribonuclease A as determined by isomer-specific proteolysis. *Biochemistry* **23**: 5713-5723.
- Lipscomb, W.N., Coppola, J.C., Hartsuck, J.A., Ludwig, M.L., Muirhead, H., Searl, J., and Steitz, T.A. 1966. The structure of carboxypeptidase A. III. molecular structure at 6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **19**: 423-441.
- Llinás, M., and Klein, M.P. 1975. Charge relay at the peptide bond. A proton magnetic resonance study of solvation effects on the amide electron density distribution. *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 4731-4737.
- Lu, H., Buck, M., Radford, S.E., and Dobson, C.M. 1997. Acceleration of the folding of hen lysozyme by trifluoroethanol. *J. Mol. Biol.* **265**: 112-117.
- Luo, P., and Baldwin, R.L. 1997. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry* **36**: 8413-8421.

- Luo, Y., and Baldwin, R.L. 1998. Trifluoroethanol stabilizes the pH 4 folding intermediate of sperm whale apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **279**: 49-57.
- Main, E.R., and Jackson, S.E. 1999. Does trifluoroethanol affect folding pathways and can it be used as a probe of structure in transition states? *Nat. Struct. Biol.* **6**: 831-835.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B.W., Veltman, O.R., Van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R., and Eijsink, V.G. 1997. Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. *J. Biol. Chem.* **272**: 11152-11156.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Van den Burg, B., Eijsink, V.G., and Ulbrich-Hofmann, R. 1999. Probing the unfolding region in a thermolysin-like protease by site-specific immobilization. *Biochemistry* **38**: 8240-8245.
- Markert, Y., Köditz, J., Mansfeld, J., Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. 2001. Increased proteolytic resistance of ribonuclease A by protein engineering. *Protein Eng.* **14**: 791-796.
- Matheson, R.R., Jr., and Scheraga, H.A. 1979. Steps in the pathway of the thermal unfolding of ribonuclease A. A nonspecific photochemical surface-labeling study. *Biochemistry* **18**: 2437-2445.
- Mayo, S.L., and Baldwin, R.L. 1993. Guanidinium chloride induction of partial unfolding in amide proton exchange in RNase A. *Science* **262**: 873-876.
- Mayr, L.M., Odefey, C., Schutkowski, M., and Schmid, F.X. 1996. Kinetic analysis of the unfolding and refolding of ribonuclease T1 by a stopped-flow double-mixing technique. *Biochemistry* **35**: 5550-5561.
- Merrifield, B. 1986. Solid phase synthesis. *Science* **232**: 341-347.
- Moore, S., and Stein, W.H. 1973. Chemical structures of pancreatic ribonuclease and deoxyribonuclease. *Science* **180**: 458-464.
- Motoshima, H., Ueda, T., and Imoto, T. 1996. Analysis of the transition state in the unfolding of hen lysozyme by introduction of Gly-Pro and Pro-Gly sequences at the same site. *J. Biochem. (Tokyo)* **119**: 1019-1023.
- Mozhaev, V.V. 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends Biotechnol.* **11**: 88-95.
- Mui, P.W., Konishi, Y., and Scheraga, H.A. 1985. Kinetics and mechanism of the refolding of denatured ribonuclease A. *Biochemistry* **24**: 4481-4489.
- Muir, T.W. 2003. Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 249-289.
- Muir, T.W., Sondhi, D., and Cole, P.A. 1998. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**: 6705-6710.
- Müller, A., Hinrichs, W., Wolf, W.M., and Saenger, W. 1994. Crystal structure of calcium-free proteinase K at 1.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **269**: 23108-23111.
- Nall, B.T., and Baldwin, R.L. 1977. Thermal unfolding transition of ribonuclease A measured by 2'-CMP binding. *Biochemistry* **16**: 3572-3576.
- Nall, B.T., Garel, J.-R., and Baldwin, R.L. 1978. Test of the extended two-state model for the kinetic intermediates observed in the folding transition of ribonuclease A. *J. Mol. Biol.* **118**: 317-330.
- Narhi, L.O., Philo, J.S., Li, T., Zhang, M., Samal, B., and Arakawa, T. 1996. Induction of alpha-helix in the beta-sheet protein tumor necrosis factor-alpha: thermal- and trifluoroethanol-induced denaturation at neutral pH. *Biochemistry* **35**: 11447-11453.
- Nash, D., Lee, B.S., and Jonas, J. 1996. Hydrogen-exchange kinetics in the cold denatured state of ribonuclease A. *Biochim. Biophys. Acta* **1297**: 40-48.

- Navon, A., Ittah, V., Laity, J.H., Scheraga, H.A., Haas, E., and Gussakovsky, E.E. 2001. Local and long-range interactions in the thermal unfolding transition of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* **40**: 93-104.
- Neira, J.L., and Rico, M. 1997. Folding studies on ribonuclease A, a model protein. *Fold. Des.* **2**: R1-11.
- Nelson, J.W., and Kallenbach, N.R. 1986. Stabilization of the ribonuclease S-peptide alpha-helix by trifluoroethanol. *Proteins* **1**: 211-217.
- Nöppert, A., Gast, K., Muller-Frohne, M., Zirwer, D., and Damaschun, G. 1996. Reduced-denatured ribonuclease A is not in a compact state. *FEBS Lett.* **380**: 179-182.
- Novotny, J., and Brucoleri, R.E. 1987. Correlation among sites of limited proteolysis, enzyme accessibility and segmental mobility. *FEBS Lett.* **211**: 185-189.
- Ooi, T., Rupley, J.A., and Scheraga, H.A. 1963. Structural studies of ribonuclease. VIII. Tryptic hydrolysis of ribonuclease A at elevated temperatures. *Biochemistry* **2**: 432-437.
- Orru, S., Vitagliano, L., Esposito, L., Mazzarella, L., Marino, G., and Ruoppolo, M. 2000. Effect of deamidation on folding of ribonuclease A. *Protein Sci.* **9**: 2577-2582.
- Pace, C.N. 1986. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. In *Methods in Enzymology*, pp. 266-280. Academic Press, New York.
- Pace, C.N. 1990. Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotechnol.* **8**: 93-98.
- Pace, C.N., and Laurents, D.V. 1989. A new method for determining the heat capacity change for protein folding. *Biochemistry* **28**: 2520-2525.
- Pace, C.N., Laurents, D.V., and Thomson, J.A. 1990. pH dependence of the urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease A and ribonuclease T1. *Biochemistry* **29**: 2564-2572.
- Pähler, A., Banerjee, A., Dattagupta, J.K., Fujiwara, T., Lindner, K., Pal, G.P., Suck, D., Weber, G., and Saenger, W. 1984. Three-dimensional structure of fungal proteinase K reveals similarity to bacterial subtilisin. *Embo J.* **3**: 1311-1314.
- Panick, G., and Winter, R. 2000. Pressure-induced unfolding/refolding of ribonuclease A: static and kinetic Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochemistry* **39**: 1862-1869.
- Perutz, M.F. 1963. X-ray analysis of hemoglobin. *Science* **140**: 863-869.
- Peters, K., Pauli, D., Hache, H., Boteva, R.N., Genov, N.C., and Fittkau, S. 1989. Subtilisin DY-Kinetic characterization and comparison with related proteinases. *Curr. Microbiol.* **18**: 171-177.
- Pfeil, W. 2002. The influence of glycosylation on the thermal stability of ribonuclease. *Thermochimica Acta* **382**: 169-174.
- Phillips, C.M., Mizutani, Y., and Hochstrasser, R.M. 1995. Ultrafast thermally induced unfolding of RNase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**: 7292-7296.
- Plummer, J.T.H., and Hirs, C.H.W. 1963. The isolation of ribonuclease B, a Glycoprotein, from bovine pancreatic Juice. *J. Biol. Chem.* **238**: 1396-1401.
- Plummer, T.H., Jr. 1968. Glycoproteins of bovine pancreatic juice. Isolation of ribonucleases C and D. *J. Biol. Chem.* **243**: 5961-5966.
- Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Di Bello, M., Zambonin, M., and Fontana, A. 1995. Probing the molten globule state of alpha-lactalbumin by limited proteolysis. *Biochemistry* **34**: 12596-12604.
- Polverino de Laureto, P., Scaramella, E., De Filippis, V., Bruix, M., Rico, M., and Fontana, A. 1997. Limited proteolysis of ribonuclease A with thermolysin in trifluoroethanol. *Protein Sci.* **6**: 860-872.

- Price, N.C., and Johnson, C.M. 1990. Proteinases as probes of conformation of soluble proteins. In *Proteolytic enzymes. A practical approach.* (eds. R.J. Beynon, and J.S. Bond), pp. 163-180. IRL Press, Oxford.
- Quirk, D.J., Park, C., Thompson, J.E., and Raines, R.T. 1998. His...Asp catalytic dyad of ribonuclease A: conformational stability of the wild-type, D121N, D121A, and H119A enzymes. *Biochemistry* **37**: 17958-17964.
- Raines, R.T. 1998. Ribonuclease A. *Chem. Rev.* **98**: 1045-1066.
- Rajan, R., and Balaram, P. 1996. A model for the interaction of trifluoroethanol with peptides and proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* **48**: 328-336.
- Ramos, C.H., and Baldwin, R.L. 2002. Sulfate anion stabilization of native ribonuclease A both by anion binding and by the Hofmeister effect. *Protein Sci.* **11**: 1771-1778.
- Raschke, T.M., and Marqusee, S. 1998. Hydrogen exchange studies of protein structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 80-86.
- Ratnaprabha, C., and Sasidhar, Y.U. 1998. Conformational features of disulfide intact and reduced forms of hen egg white lysozyme in aqueous solution in the presence of trifluoroethanol (TFE): implications for protein folding intermediates. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **94**: 3631-3637.
- Rauber, N.R., Jany, K.D., and Pfeleiderer, G. 1978. Ribonuclease A digestion by proteinase K. *Z. Naturforsch. [C]* **33**: 660-663.
- Rehage, A., and Schmid, F.X. 1982. Fast- and slow-refolding forms of unfolded ribonuclease A differ in tyrosine fluorescence. *Biochemistry* **21**: 1499-1505.
- Reinstädler, D., Fabian, H., Backmann, J., and Naumann, D. 1996. Refolding of thermally and urea-denatured ribonuclease A monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **35**: 15822-15830.
- Richards, F.M. 1997. Protein stability: still an unsolved problem. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**: 790-802.
- Richards, F.M., and Vithayathil, P.J. 1959. The preparation of subtilisin-modified ribonuclease and the separation of the peptide and protein components. *J. Biol. Chem.* **234**: 1459-1465.
- Rico, M., Bruix, M., Santoro, J., Gonzalez, C., Neira, J.L., Nieto, J.L., and Herranz, J. 1989. Sequential ¹H-NMR assignment and solution structure of bovine pancreatic ribonuclease A. *Eur. J. Biochem.* **183**: 623-638.
- Robertson, A.D., and Baldwin, R.L. 1991. Hydrogen exchange in thermally denatured ribonuclease A. *Biochemistry* **30**: 9907-9914.
- Robertson, A.D., Purisima, E.O., Eastman, M.A., and Scheraga, H.A. 1989. Proton NMR assignments and regular backbone structure of bovine pancreatic ribonuclease A in aqueous solution. *Biochemistry* **28**: 5930-5938.
- Rudd, P.M., Scragg, I.G., Coghill, E., and Dwek, R.A. 1992. Separation and analysis of the glycoform populations of ribonuclease B using capillary electrophoresis. *Glycoconj. J.* **9**: 86-91.
- Rupley, J.A., and Scheraga, H.A. 1963. Structural studies of ribonuclease. VII. Chymotryptic hydrolysis of ribonuclease A at elevated temperatures. *Biochemistry* **2**: 421-431.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL*, second edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F. 1959. Chemistry of insulin: determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science* **129**: 1340-1344.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

- Santoro, J., Gonzalez, C., Bruix, M., Neira, J.L., Nieto, J.L., Herranz, J., and Rico, M. 1993. High-resolution three-dimensional structure of ribonuclease A in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **229**: 722-734.
- Santoro, M.M., and Bolen, D.W. 1988. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**: 8063-8068.
- Saunders, M., Wishnia, A., and Kirkwood, J.G. 1957. The nuclear magnetic resonance spectrum of ribonuclease. *J. Am. Chem. Soc.* **79**: 3289-3290.
- Schägger, H., and von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Schechter, I., and Berger, A. 1967. On the size of the active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**: 157-162.
- Schellenberger, A., and Ulbrich, R. 1989. Protein stabilization by blocking the native unfolding nucleus. *Biomed. Biochim. Acta* **48**: 63-67.
- Schmid, F.X. 1981. A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 1. Detection by tyrosine fluorescence changes. *Eur. J. Biochem.* **114**: 105-109.
- Schmid, F.X. 1983. Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates. *Biochemistry* **22**: 4690-4696.
- Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. 1978a. Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **75**: 4764-4768.
- Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. 1978b. Nature of the slow-folding species of ribonuclease A. *Proceedings of the FEBS-meeting* **52**: 173-185.
- Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. 1979. The rate of interconversion between the two unfolded forms of ribonuclease A does not depend on Guanidinium chloride concentration. *J. Mol. Biol.* **133**: 285-287.
- Schmid, F.X., and Blaschek, H. 1981. A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 2. Comparison of its properties to native ribonuclease A. *Eur. J. Biochem.* **114**: 111-117.
- Schönbrunner, N., Wey, J., Engels, J., Georg, H., and Kiefhaber, T. 1996. Native-like beta-structure in a trifluoroethanol-induced partially folded state of the all-beta-sheet protein tendamistat. *J. Mol. Biol.* **260**: 432-445.
- Schultz, D.A., and Baldwin, R.L. 1992. Cis proline mutants of ribonuclease A. I. Thermal stability. *Protein Sci.* **1**: 910-916.
- Schultz, D.A., Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. 1992. Cis proline mutants of ribonuclease A. II. Elimination of the slow-folding forms by mutation. *Protein Sci.* **1**: 917-924.
- Schultz, L.W., Hargraves, S.R., Klink, T.A., and Raines, R.T. 1998. Structure and stability of the P93G variant of ribonuclease A. *Protein Sci.* **7**: 1620-1625.
- Segawa, S., Fukuno, T., Fujiwara, K., and Noda, Y. 1991. Local structures in unfolded lysozyme and correlation with secondary structures in the native conformation: helix-forming or -breaking propensity of peptide segments. *Biopolymers* **31**: 497-509.
- Sela, M., and Anfinsen, C.B. 1957. Some spectrophotometric and polarimetric experiments with ribonuclease. *Biochim. Biophys. Acta* **24**: 229-235.
- Shibata, Y., Takahashi, H., Kaneko, R., Kurita, A., and Kushida, T. 1999. Conformational fluctuation of native-like and molten-globule-like cytochrome c observed by time-resolved hole burning. *Biochemistry* **38**: 1802-1810.

- Shimotakahara, S., Rios, C.B., Laity, J.H., Zimmerman, D.E., Scheraga, H.A., and Montelione, G.T. 1997. NMR structural analysis of an analog of an intermediate formed in the rate-determining step of one pathway in the oxidative folding of bovine pancreatic ribonuclease A: automated analysis of ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignments for wild-type and [C65S, C72S] mutant forms. *Biochemistry* **36**: 6915-6929.
- Shiraki, K., Nishikawa, K., and Goto, Y. 1995. Trifluoroethanol-induced stabilization of the alpha-helical structure of beta-lactoglobulin: implication for non-hierarchical protein folding. *J. Mol. Biol.* **245**: 180-194.
- Siddiqui, K.S., Rangarajan, M., Hartley, B.S., Kitmitto, A., Panico, M., Blench, I.P., and Morris, H.R. 1993. Arthrobacter D-xylose isomerase: partial proteolysis with thermolysin. *Biochem. J.* **289**: 201-208.
- Sivaraman, T., Kumar, T.K., Hung, K.W., and Yu, C. 1999. Influence of disulfide bonds on the induction of helical conformation in proteins. *J. Protein Chem.* **18**: 481-488.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- Smyth, D.G., Stein, W.H., and Moore, S. 1963. The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and conformations. *J. Biol. Chem.* **238**: 227-234.
- Sönnichsen, F.D., Van Eyk, J.E., Hodges, R.S., and Sykes, B.D. 1992. Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry* **31**: 8790-8798.
- Sosnick, T.R., and Trehwella, J. 1992. Denatured states of ribonuclease A have compact dimensions and residual secondary structure. *Biochemistry* **31**: 8329-8335.
- Sridevi, K., and Udgaonkar, J.B. 2002. Unfolding rates of barstar determined in native and low denaturant conditions indicate the presence of intermediates. *Biochemistry* **41**: 1568-1578.
- Srinivas, V., Santhoshkumar, P., and Sharma, K.K. 2002. Effect of trifluoroethanol on the structural and functional properties of alpha-crystallin. *J. Protein Chem.* **21**: 87-95.
- Storrs, R.W., Truckses, D., and Wemmer, D.E. 1992. Helix propagation in trifluoroethanol solutions. *Biopolymers* **32**: 1695-1702.
- Strausberg, S.L., Alexander, P.A., Gallagher, D.T., Gilliland, G.L., Barnett, B.L., and Bryan, P.N. 1995. Directed evolution of a subtilisin with calcium-independent stability. *Biotechnology (N Y)* **13**: 669-673.
- Takeda, K., Sasa, K., Nagao, M., and Batra, P.P. 1988. Secondary structural changes of non-reduced and reduced ribonuclease A in solutions of urea, guanidine hydrochloride and sodium dodecyl sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* **957**: 340-344.
- Takeda, N., Kato, M., and Taniguchi, Y. 1995a. Pressure- and thermally-induced reversible changes in the secondary structure of ribonuclease A studied by FT-IR spectroscopy. *Biochemistry* **34**: 5980-5987.
- Takeda, N., Kato, M., and Taniguchi, Y. 1995b. Pressure-induced secondary structure changes of ribonuclease A and ribonuclease S studied by FTIR spectroscopy. *Biospectroscopy* **1**: 207-216.
- Teschner, W., and Rudolph, R. 1989. A carboxypeptidase Y pulse method to study the accessibility of the C-terminal end during the refolding of ribonuclease A. *Biochem. J.* **260**: 583-587.
- Thannhauser, T.W., Konishi, Y., and Scheraga, H.A. 1984. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Anal. Biochem.* **138**: 181-188.
- Thomas, P.D., and Dill, K.A. 1993. Local and nonlocal interactions in globular proteins and mechanisms of alcohol denaturation. *Protein Sci.* **2**: 2050-2065.

- Torrent, J., Rubens, P., Ribo, M., Heremans, K., and Vilanova, M. 2001. Pressure versus temperature unfolding of ribonuclease A: an FTIR spectroscopic characterization of 10 variants at the carboxy-terminal site. *Protein Sci.* **10**: 725-734.
- Truckses, D.M., Somoza, J.R., Prehoda, K.E., Miller, S.C., and Markley, J.L. 1996. Coupling between trans/cis proline isomerization and protein stability in staphylococcal nuclease. *Protein Sci.* **5**: 1907-1916.
- Tsong, T.Y., Baldwin, R.L., and Elson, E.L. 1971. The sequential unfolding of ribonuclease A: detection of a fast initial phase in the kinetics of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **68**: 2712-2715.
- Udgaonkar, J.B., and Baldwin, R.L. 1988. NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* **335**: 694-699.
- Udgaonkar, J.B., and Baldwin, R.L. 1990. Early folding intermediate of ribonuclease A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 8197-8201.
- Udgaonkar, J.B., and Baldwin, R.L. 1995. Nature of the early folding intermediate of ribonuclease A. *Biochemistry* **34**: 4088-4096.
- Ulbrich, R., Schellenberger, A., and Damerau, W. 1986. Studies on the thermal inactivation of immobilized enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 511-522.
- Ulbrich-Hofmann, R., Arnold, U., and Mansfeld, J. 1999. The concept of the unfolding region for approaching the mechanisms of enzyme stabilization. *J. Mol. Catalysis* **7**: 125-131.
- Ulbrich-Hofmann, R., Golbik, R., and Damerau, W. 1993. Fixation of the unfolding region - a hypothesis of enzyme stabilization. In *Stability and stabilization of enzymes*. (eds. W.J.J. van den Tweel, A. Harder, and R.M. Buitelaar), pp. 497-504. Elsevier, Amsterdam.
- Ulbrich-Hofmann, R., Mansfeld, J., Fittkau, S., and Damerau, W. 1995. Structural flexibility in extremely stable carrier-bound chymotrypsin. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **22**: 75-94.
- Ulbrich-Hofmann, R., and Selisko, B. 1993. Soluble and immobilized enzymes in water-miscible organic solvents: glucoamylase and invertase. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 33-41.
- van Buuren, A.R., and Berendsen, H.J.C. 1993. Molecular dynamics simulation of the stability of a 22-residue alpha-helix in water and 30% trifluoroethanol. *Biopolymers* **33**: 1159-1166.
- Vriend, G. 1990. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**: 52-56.
- Vriend, G., and Eijsink, V. 1993. Prediction and analysis of structure, stability and unfolding of thermolysin-like proteases. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **7**: 367-396.
- Walgers, R., Lee, T.C., and Cammers-Goodwin, A. 1998. An indirect chaotropic mechanism for the stabilization of helix conformation of peptides in aqueous trifluoroethanol and hexafluoro-2-propanol. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 5073-5079.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E., and Scheraga, H.A. 2002. Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry* **41**: 14637-14644.
- Westh, P., and Koga, Y. 1997. Intermolecular interactions of lysozyme and small alcohols: a calorimetric investigation. *J. Phys. Chem. B* **101**: 5755-5758.
- Westmoreland, D.G., and Matthews, C.R. 1973. Nuclear magnetic resonance study of the thermal denaturation of ribonuclease A: implications for multistate behavior at low pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **70**: 914-918.
- Williams, R.L., Greene, S.M., and McPherson, A. 1987. The crystal structure of ribonuclease B at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **262**: 16020-16031.
- Winchester, B.G., Mathias, A.P., and Rabin, B.R. 1970. Study of the thermal denaturation of ribonuclease A by differential thermal analysis and susceptibility to proteolysis. *Biochem. J.* **117**: 299-307.

- Wlodawer, A., Bott, R., and Sjolín, L. 1982. The refined crystal structure of ribonuclease A at 2.0 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **257**: 1325-1332.
- Wong, S.S., and Wong, L.J. 1992. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 866-874.
- Woodward, C.K. 1994. Hydrogen exchange rates and protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**: 112-116.
- Yamada, H., Ueda, T., and Imoto, T. 1993. Thermodynamic and kinetic stabilities of hen-egg lysozyme and its chemically modified derivatives: analysis of the transition state of the protein unfolding. *J. Biochem. (Tokyo)* **114**: 398-403.
- Yang, H.J., and Tsou, C.L. 1995. Inactivation during denaturation of ribonuclease A by guanidinium chloride is accompanied by unfolding at the active site. *Biochem. J.* **305**: 379-384.
- Yang, Y., Barker, S., Chen, M.J., and Mayo, K.H. 1993. Effect of low molecular weight aliphatic alcohols and related compounds on platelet factor 4 subunit association. *J. Biol. Chem.* **268**: 9223-9229.
- Yao, M., and Bolen, D.W. 1995. How valid are denaturant-induced unfolding free energy measurements? Level of conformance to common assumptions over an extended range of ribonuclease A stability. *Biochemistry* **34**: 3771-3781.
- Zale, S.E., and Klibanov, A.M. 1986. Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures? *Biochemistry* **25**: 5432-5444.
- Zerovnik, E., Virden, R., Jerala, R., Kroon-Zitko, L., Turk, V., and Waltho, J.P. 1999. Differences in the effects of TFE on the folding pathways of human stefins A and B. *Proteins* **36**: 205-216.
- Zerovnik, E., Virden, R., Jerala, R., Turk, V., and Waltho, J.P. 1998. On the mechanism of human stefin B folding: I. comparison to homologous stefin A. Influence of pH and trifluoroethanol on the fast and slow folding phases. *Proteins* **32**: 296-303.
- Zhao, H., and Arnold, F.H. 1999. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Eng.* **12**: 47-53.

Anhang

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Halle, den

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann für das Ermöglichen dieser Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe, für das ständige Interesse am Voranschreiten der Arbeit, die stetige Diskussionsbereitschaft, für das entgegengebrachte Vertrauen und für die kollegiale Zusammenarbeit.

Herrn Dr. U. Arnold danke ich für die Unterstützung, die hilfreichen Diskussionen und für die ausgezeichnete und fruchtbare Zusammenarbeit.

Frau Dipl.-Biochem. Y. Markert danke ich für die Herstellung der RNase A-Varianten A20P, S21P, A20P/S21P und für die hervorragende Zusammenarbeit.

Herrn Dr. R. Golbik danke ich für die Durchführung der *stopped-flow* CD-Spektroskopie, für die Einführung in die *stopped-flow* Technik, für die ständige Diskussionsbereitschaft und die sehr gute Kooperation.

Herrn Dr. H. Lilie danke ich für die Durchführung der Analytischen Ultrazentrifugation.

Herrn Prof. Dr. G. Vriend (Center for Molecular and Biomolecular Informatics, University of Nijmegen, Niederlande) danke ich für die Untersuchungen mittels *molecular modeling*.

Herrn Prof. Dr. R. T. Raines (Department of Biochemistry, University of Wisconsin, Madison, WI, USA) danke ich für die Bereitstellung des pBXR-Vektors.

Der Arbeitsgruppe „Technische Enzymologie“ danke ich für das gute Miteinander während der gesamten Zeit.

Besonders danke ich meiner Familie, durch deren ständige Unterstützung und Verständnis das Anfertigen dieser Arbeit erst möglich wurde.

Lebenslauf

Name: Köditz
Vorname: Jens
Geburtsdatum: 27.06.1973
Geburtsort: Ilmenau
Wohnanschrift: Carl-Robert-Str. 21, 06114 Halle
Familienstand: verheiratet
Anzahl der Kinder: 2 (13 und 1 Jahr)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

Sep. 1980 - Juli 1990 Besuch der Polytechnischen Oberschule in Ilmenau mit 10. Klasse-Abschluss (Prädikat: „Ausgezeichnet“)

Sep. 1990 - Juli 1991 Abitur als Student am Institut zur Vorbereitung auf das Auslandsstudium der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Sep. 1991 - Juli 1992 Fortsetzung des Abiturs am Gymnasium am Reileck in Halle mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife (Durchschnittsnote: 1,1)

Sep. 1992 - Okt. 1993 und Juli 1994 – Sep. 1994 Zivildienst im Pflegeheim „Hüttenholz“ in Ilmenau

Studium

Okt. 1993 - Juli 1998 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit zum Thema „Studien zur Entfaltung von RNase A und RNase B in organischen Lösungsmitteln mittels limitierter Proteolyse“ in der Abteilung „Technische Enzymologie“ des Instituts für Biotechnologie bei Prof. R. Ulbrich-Hofmann
Abschluss: Diplom Biochemiker (Prädikat: „Sehr Gut“)

seit Aug. 1998	Promotion Biochemie bei Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann in der Abteilung „Technische Enzymologie“ des Instituts für Biotechnologie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Okt. 1998 – Sep. 2000	Stipendiat nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt
seit Okt. 2000	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung „Technische Enzymologie“ des Instituts für Biotechnologie
Sep. 2002	Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. T. Raines (Department of Biochemistry, University of Wisconsin, Madison, WI, USA)
Auszeichnungen:	Forschungsstipendium der Max-Buchner-Stiftung (Mai 2000 – Mai 2002) DECHEMA-Studentenpreis für Biotechnologie 1999

Unterschrift