Molekulare Ursachen der Kataraktentstehung – Einfluss von UV-B Strahlung und Interaktion einzelner Kristalline

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät II Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Susanne Weininger, geb. Link geb. am 5. Januar 1985 in Bietigheim-Bissingen

Tag der Verteidigung: 10.03.2021

Gutachter:

- (1) Prof. Dr. rer. nat. Jochen Balbach
- (2) Prof. Dr. rer. nat. Kay Saalwächter
- (3) Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Oschkinat (FU Berlin)

Inhalt		
1.	Einleitung	1
1.1.	Die Augenlinse	1
1.2.	Linsenkristalline	2
1.2.1.	α-Kristallin	2
1.2.2.	$\beta\gamma$ -Superfamilie	4
1.3.	Wildtyp hγD-Kristallin und seine Varianten	5
1.3.1.	W43R hγD	6
1.3.2.	Ε107Α hγD	8
1.3.3.	Isolierte Einzeldomänen	8
1.4.	Katarakt	9
1.4.1.	Angeborene Katarakt	9
1.4.2.	Altersbedingte Katarakt	10
1.5.	UV-B Strahlung und Katarakt	11
1.5.1.	UV-B Effekt <i>in vivo</i>	11
1.5.2.	Absorptions- und Deaktivierungsprozesse in Proteinen	12
1.5.3.	UV-induzierte Modifikationen von Proteinen	14
1.5.4.	Desaktivierungsprozess von hγD	14
1.5.5.	UV induzierte Aggregation von hγD	15
1.6.	Aufgabenstellung & Zielstellung	17
2.	Material	18
2.1.	Linsenmaterial und rekombinant erzeugte Proteine	
2.2.	Bakterienstämme, Plasmide, verwendete Kits und Enzyme	
2.3.	Nährmedien	19
2.4.	Chemikalien & Verbrauchsmaterialien	20
2.5.	Geräte & Software	21
3.	Methoden	22
3.1.	Molekularbiologische Arbeiten	22
3.2.	Proteinexpression und -reinigung	24
3.3.	Gewinnung und Charakterisierung von Kristallinen aus Linsenmaterial	
3.4.	Spektroskopische Methoden	27
3.4.1.	Absorptionsspektroskopie zur Konzentrationsbestimmung	27
3.4.2.	Aggregationskinetiken - UV/VIS	
3.4.3.	Fluoreszenzspektroskopie	
3.5.	UV-B Bestrahlung	
3.6.	NMR-Spektroskopie	29
3.6.1.	¹ H - ¹⁵ N/ ¹³ C HSQC Korrelationsexperimente	30
3.6.2.	Experimente zur Rückgratzuordnung	

	3.6.3.	Experimente zur aromatischen Seitenkettenzuordnung	35
4.		Ergebnisse	37
2	4.1.	Zuordnung der NMR Spektren	37
	4.1.1.	Rückgratzuordnung von h γ D-Kristallin und seinen unterschiedlichen Varianten	37
	4.1.2.	Zuordnung der aromatischen Ringe von hγD	45
	4.1.3.	Vergleich der aromatischen Spektren verschiedener Varianten von h γ D	47
4	4.2.	Kristallinzusammensetzung boviner und humaner Augenlinsen	52
2	4.3.	Interaktionseffekte zwischen einzelnen Kristallinen	54
	4.3.1.	Mischung der Augenlinsenkristalline und α -Kristallin: Chaperonaktivität und thermi Stabilität mittels Lichtstreuung	sche 55
	4.3.2.	hγD- und α -Kristallin: Chaperonaktivität und thermische Stabilität mittels Lichtstreu	ung 57
	4.3.3.	Interaktionsstudien von Wildtyp h γ D-Kristallin und seiner Variante E107A mit unterschiedlichen Interaktionspartnern mittels NMR-Spektroskopie	58
2	4.4.	Einfluss von UV-B Strahlung auf Aggregationsanfälligkeit und Fluoreszenz von hγD Kristallin und seinen Varianten)- 64
	4.4.1.	Aggregationsanfälligkeit	64
	4.4.2.	Fluoreszenz	66
	4.5.	Einfluss von UV-B Strahlung auf Wildtyp h γ D-Kristallin auf atomarer Ebene	68
	4.5.1.	Unveränderte Amidsignale des Proteins	68
	4.5.2.	Veränderungen der aromatischen Ringsystemen nach UV-B Bestrahlung	70
	4.5.2.1	. Charakterisierung von UV-B Zustand B	71
	4.5.2.2	. Identifizierung betroffener Aminosäuren	74
	4.5.3.	Wildtyp h γ D-Kristallin in Mischung der Kristalline aus humaner Augenlinse	77
	4.6.	Einfluss von UV-B Strahlung auf weitere Varianten auf atomarer Ebene	81
	4.6.1.	UV-B Effekt auf W43R hγD	81
	4.6.2.	UV-B Effekt auf E107A hγD	85
5.		Diskussion	91
	5.1.	Interaktionseffekte zwischen verschiedenen Kristallinen	91
	5.1.1.	Biochemische und strukturelle Gegenüberstellung von h γD und E107A	91
	5.1.2.	Schwache Wechselwirkung von α -Kristallin mit Wildtyp h γ D-Kristallin und seiner Variante E107A unter physiologischen Bedingungen	92
	5.1.3.	Schwache Wechselwirkung von α -Kristallin mit Wildtyp hyD-Kristallin und seiner Variante E107A unter mildem thermischen Stress	93
	5.1.4.	Wechselwirkung von bovinem und humanem Linsenhomogenat mit $\alpha\text{-}$ und $\gamma\text{-}$ Kristallinen	93
	5.1.5.	Entstehung von Katarakt durch die Variante E107A	94
	5.2.	Einfluss von UV-B Strahlung auf Wildtyp h γ D-Kristallin	96
	5.2.1.	Biophysikalisch detektierbare Änderungen	97
	5.2.2.	NMR-spektroskopisch detektierbare Änderungen	97

	5.2.2.1	. Rückgrat & Aliphatische Seitenketten	98
	5.2.2.2	2. Aromatische Seitenketten	99
	5.2.2.3	B. Charakterisierung von Zustand B	99
	5.2.2.4	I. Identifikation von Y17 und Y29 als betroffene Aminosäuren	. 102
	5.2.3.	hγD in Anwesenheit einer Kristallinmischung aus humanen Augenlinsen	. 106
	5.3.	Einfluss von UV-B Strahlung auf weitere Katarakt verursachende Varianten von h γ	D
			. 107
	5.3.1.	W43R hγD	. 107
	5.3.2.	Ε107Α hγD	. 110
	5.3.3.	Die isolierten Einzeldomänen Ntd und Ctd	. 112
6.		Zusammenfassung & Ausblick	. 114
7.		Summary and Outlook	. 115
8.		Abkürzungsverzeichnis	. 117
9.		Anhang	. 120
	9.1.	Viskosität der Kristallinmischung aus bovinen Linsen	. 120
	9.2.	Thermische Interaktion	. 121
	9.2.1.	B γ B und b α : Chaperonaktivität und thermische Stabilität	. 121
	9.2.2.	Chemische Verschiebungen $\Delta\delta$ von h γ D & E107A	. 122
	9.2.3.	Relative Intensitätsänderungen von Wildtyp hγD-Kristallin & E107A	. 123
	9.3.	Vergleich des Rückgrates von Wildtyp h γ D-Kristallin mit weiteren Varianten	. 129
	9.4.	Zuordnung der aromatische Ringe von Wildtyp hγD-Kristallin	134
	9.4.1.	Zuordnung von Kohlenstoffpositionen durch selektiv markierte Glukose	. 134
	9.4.2.	Zuordnung der aromatischen Aminosäuren der Einzeldomänen	. 135
	9.4.3.	Zuordnung der aromatischen Aminosäuren durch Punktmutationen	. 137
	9.5.	Vergleich der aromatischen Ringsysteme von h γ D mit weiteren Varianten	. 138
	9.6.	Vergleich weiterer Varianten vor und nach UV-B Bestrahlung	. 142
	9.6.1.	Rückgrat weiterer Varianten	. 142
	9.6.2.	Aromatische Ringsysteme weiterer Varianten	. 147
	9.6.3.	Relative Intensitätsänderungen der aromatischen Aminosäuren von Wildtyp hyD- Kristallin und weiterer Varianten	151
	9.7.	Aliphatische Spektren der h γ D Varianten E107A, Ntd und Ctd	. 155
	9.8.	Abbildungen & Tabellen	. 159
	9.9.	Publikationen	. 164
	9.10.	Lebenslauf	. 165
	9.11.	Eidesstaatliche Erklärung	. 166
	9.12.	Danksagung	. 167
	9.13.	Literaturverzeichnis	. 168

1. Einleitung

Katarakt, die Trübung der Augenlinse, ist die Hauptursache von Blindheit weltweit. Mehr als 50% aller Erblindungen sind darauf zurückzuführen [1], wobei sich die Krankheit hauptsächlich im Laufe des Lebens durch eine komplexe Wechselwirkung zwischen genetischen und umweltbedingten Risikofaktoren ausbildet [2]. Zusätzlich zu dem altersbedingten Katarakt, von dem 50% aller Menschen mit einem Alter über 75 Jahren betroffen sind [3], kann sich die Linsentrübung schon während der Kindheit entwickeln. In diesem Fall spricht man von angeborenen bzw. kongenitalen Katarakt. Bis jetzt ist die einzige erfolgreiche Behandlungsmethode das operative Ersetzen der erkrankten Linse durch eine Kunstlinse.

1.1. Die Augenlinse

Die Linse bildet sich bereits während der embryonalen Entwicklung aus Epithelzellen, die sich in längliche Fasern umwandeln, ihren Kern und Organellen verlieren und somit metabolisch inaktiv sind. Diese ordnen sich, vergleichbar mit dem Aufbau einer Zwiebel, an den älteren Fasern von außen an (Abb. 1). Die Proliferation der Epithelzellen aus der Äquatorregion unter der Linsenkapsel findet das gesamte Leben statt. Dabei wird der komplette Teil der Linse bis zur Geburt Linsenkern bzw. Nukleus genannt, während sich der Kortex bzw. die Rinde nach der Geburt entwickelt. Da die ausgereiften primären und sekundären Linsenfasern keinen Protein- und Metabolitenumsatz haben, müssen die Linsenproteine, auch Kristalline genannt, ein Leben lang stabil und funktional sein. Zusätzlich wird die Aufrechterhaltung der Zellregulierung durch ein aufwendiges System an *thin* und *gap junctions* ermöglicht, welche die Zell-Zellkommunikation und den Transport von Wassermolekülen, Ionen, Sekundärboten, Metaboliten und Stoffwechselprodukten zwischen den einzelnen Linsenfasern und der umschließenden Linsenkapsel mit dem Kammerwasser ermöglicht [4].



Abb. 1: Aufbau der Augenlinse. (a) Querschnitt durch eine Linse. (b) Querschnitt durch Linsenfasern [5]. (c) Atomar aufgelöste Kristalline der Augenlinse [6].

Aufgrund der strukturierten Anordnung der nuklei- und organellenfreien Linsenfasern in Kombination mit den dicht gepackten Proteinen innerhalb der Fasern kann die elastische Linse Licht mit einer Wellenlänge von 390 bis 1200 nm streuungsfrei transmittieren und auf die Retina fokussieren. Dabei nimmt der Brechungsindex mit 1,38 von der Linsenrinde zu 1,41 im Linsenkern leicht zu, wobei sich im Linsenkern Proteine mit einer Konzentration von bis zu 450 mg/ml befinden [7]. Um eine lebenslange Transparenz und den hohen Brechungsindex in der Linse ohne zusätzlichen Protein Metabolismus aufrecht zu erhalten, müssen die Linsenproteine, insbesondere die Kristalline, langlebig und in hohen Konzentrationen löslich sein [8, 9].

1.2. Linsenkristalline

Die Augenlinsen von Vertebraten bestehen hauptsächlich aus einer hoch konzentrierten Mischung aus α -, β - und γ -Kristalline, die etwa 80 - 90% aller löslichen Linsenproteine ausmachen [7] und ein monomeres Molekulargewicht von rund 20 kDa aufweisen. α -Kristalline umfassen ca. 40% aller Linsenkristalline und gehören zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine (sHsps). Sie bilden große Komplexe mit einer Größenverteilung von 300 - 1200 kDa aus [9, 10]. Die β - und γ -Kristalline gehören zu einer Superfamilie mit ähnlichen globulären, zentralen Domänen und unterschiedlichen C- und N-Termini. β -Kristalline bilden kleine Oligomere aus, während γ -Kristalline im nativen Zustand nur als Monomere vorliegen [9].

1.2.1. α-Kristallin

Das α -Kristallin besteht aus einem Komplex von α A- und α B-Kristallinen, dessen Verhältnis je nach Linsenbereich zwischen 3:1 und 2:1 variieren kann [11]. α A wurde bis jetzt fast ausschließlich in der Linse gefunden, während sich α B z.B. auch im Herz, in der Lunge oder im Gehirn befindet. Zusätzlich wurde eine Korrelation zwischen erhöhten Konzentrationen von α B in Zusammenhang mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer festgestellt [12].

Aufbau & Oligomerisierung

Die humanen α A- und α B-Kristalline (h α A und h α B) gehören zu den sHsps und bestehen wie alle sHsps aus einer zentralen α -Kristallin Domäne (ACD), die von den N- und Cterminalen Regionen (NTR & CTR) flankiert werden. Dabei weisen die beiden α -Kristalline eine 57% ige Sequenzidentität auf [13]. Die ACD ist in allen sHsps konserviert, besteht fast vollständig aus β -Faltblättern und bildet hydrophobe Furchen aus [13-17]. Im Gegensatz zur ACD haben die sie flankierenden NTR und CTR der unterschiedlichen sHsps kaum Sequenzähnlichkeiten [13]. Die NTR ist teilweise ungeordnet und existiert in unterschiedlichen Konformationen [18]. Für die flexible CTR mit ihrem konservierten IPI Motiv wurden mindestens zwei verschiedene Zustände identifiziert, die untereinander im chemischen Austausch stehen [18, 19]. Zur Formierung des α -Kristallin Komplexes bzw. Quartärstruktur ist ein Zusammenspiel aller drei genannter Domänen nötig [20]. Die Wechselwirkung zwischen den einzelnen α -Untereinheiten hängt dabei von äußeren Bedingungen wie z.B. Temperatur und pH ab und bildet Komplexe mit einer kurzen Lebenszeit aus [18, 19, 21-23].

Wie in Abb. 2(a) zu sehen ist, geht man bei der Ausbildung eines h α B 24-mers davon aus, dass sich asymmetrische Dimere durch die Wechselwirkung der ACD bilden und sich diese zu einem hexameren Ring bestehend aus drei Dimeren zusammenlagern. Die Ringuntereinheiten werden dabei durch die Verankerung des IPI Motivs der CTR an den hydrophoben Furchen der ACD von den benachbarten Dimeren stabilisiert. Vier hexamere Ringe lagern sich dann durch die Wechselwirkung von der NTR symmetrisch zu einer tetraedrischen Struktur zusammen [18, 22, 24].



Abb. 2: Oligomerisierung und Chaperonaktivität von α **-Kristallin.** (a) Oligomerisierung des α -Kristallins durch Interaktion von unterschiedlichen Domänen nach *Delbecq et al.* [20]. (b) Verhinderung lichtstreuender Aggregate von teilweise entfalteten amorphen und amyloiden Proteinen nach *Mainz et al.* [18].

Chaperonaktivität

Prinzipiell besitzen alle sHsps den gleichen Schutzmechanismus bezüglich anderer Proteine auf Stress: eine erhöhte Expression der sHsps und Ausbildung von löslichen Komplexen durch Interaktion an hydrophoben Oberflächen mit teilweise entfalteten Proteinen, wodurch deren irreversible Aggregation verhindert wird [13, 25]. Durch die dynamische Quartärstruktur der α -Kristalline. kann deren Funktion abhängig von den Umgebungsbedingungen und Anforderungen variiert werden [26]. So interagiert das h α B-Kristallin nicht nur mit Zytoskelettproteinen [4], sondern erkennt auch unterschiedliche strukturelle Motive von Aggregationsspezien wie amorphe oder amyloide Aggregate [18, 27-31]. In Abb. 2(b) sind die Vorgänge zur Verhinderung von lichtstreuenden Aggregaten schematisch dargestellt. Das Fibrillen ausformende Alzheimer Aβ 1 - 40 Peptid bindet an den Rand von dem zentralen β -sandwich der ACD, während aggregierendes Lysozym an die ungeordnete, hydrophobe NTR des haB bindet. Natives Lysozym zeigt keine Interaktion mit $h\alpha B$ [18]. Zusätzlich ist unter Auftreten von physiologischem Stress eine erhöhte Expression von h α B beobachtet worden [12, 32].

Thermischer Stress

Die Quartärstruktur und der Austausch von Monomeren des α -Kristallins ist abhängig von äußeren Einflüssen wie pH, Ionenstärke, Proteinkonzentration und thermischen Stress [33]. Je nach Temperaturbereich weisen die beiden α -Kristalline unterschiedliche Stabilitäten bzgl. Aggregation, Konformationen und Größen auf, was eine Chaperonfunktion über einen großen Temperaturspanne ermöglicht [9].

Das α A-Kristallin hat zwei thermisch induzierte Konformationsübergänge [34], zeigt bei erhöhten Temperaturen eine stabilere Konformation mit größerer Chaperonaktivität und verhindert die thermische Aggregation von unterschiedlichen Proteinen [34, 35]. Das α B ist im Gegensatz zum α A bei physiologischen Temperaturen hydrophober und besitzt eine größere Chaperonaktivität. Diese verliert das α B bei 52°C und es aggregiert bei 62°C irreversibel [34-36]. Eine Mischung aus α A- und α B-Kristallin, das so genannte α -Kristallin, ist bis zu Temperaturen von 100°C stabil [9, 36, 37] und hat zwei Übergänge bei unterschiedlichen Temperaturen, die zur Exposition von hydrophoben Oberflächen führen. Die erste ist zwischen 30 - 40°C und die zweite je nach Literaturangabe zwischen 60 - 62°C bzw. 50 - 70°C [35, 38, 39]. Beim zweiten Übergang ist das α -Kristallin gering entfaltet, weist eine größere Anzahl an Untereinheiten und somit auch ein größeres Molekulargewicht auf [9, 37, 38, 40]. Die Konformation hat sich gering verändert [39-41]. Ob dabei die Sekundärstruktur unverändert bleibt [42] oder der β -Faltblattanteil abnimmt und der α -Helixanteil zunimmt [35] ist nicht eindeutig geklärt.

Durch die irreversible Konformationsänderung bei erhöhter Temperatur [41] und die damit verbundene vergrößerte hydrophobe Oberfläche des α -Kristallins [38] findet eine größere Interaktion mit teilweise entfaltetem Protein statt. So kann z.B. die thermische Aggregation von β - und γ -Kristallinen für T > 60°C durch die Bildung von vergrößerten, löslichen β - α -bzw. γ - α -Kristallinkomplexen verhindert werden [9].

1.2.2. βγ-Superfamilie

Die $\beta\gamma$ -Kristalline umfassen insgesamt etwa 60% aller Linsenproteine [43, 44], 35% β -Kristalline und 25% γ -Kristalline. Die β -Kristallin Familie kann in vier saure (β A1, β A2, β A3, β A4) und drei basische (β B1, β B2, β B3) β -Kristalline aufgeteilt werden. Die γ -Kristallin Familie beinhaltet sieben unterschiedliche Proteine (γ A, γ B, γ C, γ D, γ E, γ F, γ S) [43-45]. In der humanen Linse kommen hauptsächlich γ C, γ D und γ S vor, während γ E und γ F nicht codiert und somit nicht vorhanden sind [46].

Die Struktur von $\beta\gamma$ -Kristallinen ist hoch symmetrisch und beinhaltet zwei globuläre Domänen. Wie in Abb. 3 zu sehen ist, besitzt jede Domäne zwei *greek key* Motive mit jeweils vier antiparallelen β -Strängen und zwei konservierten β -hairpins [9, 43, 47, 48]. Die Domänen besitzen jeweils einen hydrophoben Kern mit zwei hoch konservierten Tryptophanen (Trp, W) in der räumlichen Nähe zu jeweils zwei Tyrosinen (Tyr, Y) und einem Histidin (His, H) (Abb. 6 (b)). Die hohe Anzahl an aromatischen Aminosäuren fungiert als Schutzfunktion der Retina vor UV-B Schäden [43, 47, 48]. Der Hauptunterschied zwischen den monomeren γ -Kristallinen und den oligomeren β -Kristallinen besteht aus den N- und Cterminalen Verlängerungen der β -Kristalline, die zu einer Oligomerisierung durch *domain*

swapping führen kann [9]. Charakteristisch für die γ -Kristalline sind große Oberflächenladungen bei einem annähernd neutralen isoelektrischen Punkt (pl).[48] und attraktive Wechselwirkungen zwischen den y-Kristallinen. Dies kann zu einer Reduktion des osmotischen Drucks in der Linse aber auch zu einer höheren Anfälligkeit für Aggregationen und Phasentrennung führen [49]. Zusätzlich befindet sich eine hohe Anzahl an Cysteinen (Cys, C) der γ -Kristalline im reduzierten Zustand. Eine Modifikation an den Cysteinen wie z.B. Oxidation, führt zu veränderten Wechselwirkungen und hochmolekularen Aggregaten [49-51].



Abb. 3: Aufbau der $\beta\gamma$ -Kristalline. (a) zwei *greek key* Motive aus jeweils vier antiparallelen β -Strängen einer Domäne. (b) Struktur des Wildtyp h γ D-Kristallins (pdb-code 2klj; dargestellt mit PyMOL).

Die β - und γ -Kristalline besitzen zwar die gleiche, sich ineinander einfügenden dicht gepackten *greek key* Motive, die zu einer hohen intrinsischen Stabilität beitragen [44, 48], unterscheiden sich aber in ihrer thermodynamischen Stabilität. γ -Kristalline sind extrem stabil mit apparenten Schmelztemperaturen von bis zu 80°C und Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischer Entfaltung von bis zu 2 - 3 M Guanidinium Chlorid [52], während β -Kristalline eine höhere Anfälligkeit gegenüber thermischer und chemischer Denaturierung aufweisen [53, 54]. Es scheint so, dass nicht nur eine, sondern viele unterschiedliche Wechselwirkungen zu der großen Gesamtstabilität der Kristalline beitragen: Ionenpaare, Salzbrücken, hydrophobe Effekte, aromatisches *stacking*, Van-der-Waals-Wechselwirkung und Wasserstoffbrücken [48].

1.3. Wildtyp hγD-Kristallin und seine Varianten

Das in dieser Dissertation hauptsächlich untersuchte humane γ D Protein (h γ D) ist eines der am häufigsten auftretenden γ -Kristalline in der menschlichen Linse, welches sich hauptsächlich im Nukleus der Linse befindet. [55]. Es eignet sich aufgrund seines Molekulargewichts von 21 kDa [56] und dem Vorhandensein von mind. 24 unterschiedlichen identifizierten Varianten beim vererbbaren Katarakt [2] zur biochemischen, und auch NMRspektroskopischen Untersuchung des Mechanismus von Kataraktausbildung [56]. Zusätzlich konnte der Entfaltungsmechanismus von h γ D aufgeklärt werden. Die N-terminale Domäne (Ntd) entfaltet vor der C-terminalen Domäne (Ctd) und wird durch dessen Interface stabilisiert. Eine Störung des Interfaces zwischen der Ntd und Ctd destabilisiert die Nterminale Domäne viel stärker als die C-terminale Domäne [57-59]. Durch Untersuchungen an unterschiedlichen Varianten konnte gezeigt werden, dass die strukturelle Stabilität eines Proteins nicht direkt mit dessen Löslichkeit korreliert und dass die partielle Entfaltung der Nterminalen Domäne bei gefalteter C-terminaler Domäne ein Hauptweg der Aggregation von partiell gefalteten Intermediaten ist [48].

Im Folgenden werden unterschiedliche identifizierte pathogene Varianten von hγD zusammengefasst. Dabei ist zu beachten, dass die in dieser Dissertation verwendete Nummerierung der Aminosäuren mit dem N-terminalen Methionin (Met, M) als Nummer eins startet. Es ist auffallend, dass sich fast alle, für vererbbaren Katarakt identifizierten Punktmutationen des hyD in der N-terminalen Domäne in der Nähe der für die strukturelle Stabilität wichtige β-Faltblätter befinden, während verkürzte Konstrukte und frameshifts hauptsächlich in der C-terminalen Domäne zu finden sind. Die Varianten R15C und P24T, welche sich beide an der Oberfläche des Proteins befinden, weisen im Vergleich zum Wildtyp sowohl eine ähnliche thermische und chemische Stabilität wie auch fast keine Tertiärstruktur, Veränderungen in der Sekundärund aber eine veränderte Oberflächeneigenschaft der lokalen Ladung und Hydrophibizität auf. Dies führt zu einer erhöhten attraktiven Wechselwirkung der Proteine und somit zu einer deutlich verringerten Löslichkeit um den Faktor 4 bis 7 [60-64]. Die Varianten R37S und R59H haben im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls eine ähnliche thermische und chemische Stabilität und fast identische Konformationen, weisen aber eine stark verringerte Löslichkeit und ein verändertes Phasenverhalten auf, was zur Ausbildung von Kristallen führt [65-68]. Die Varianten R77S und E107A haben bis auf den veränderten pl die gleichen thermodynamischen Stabilitäten, identische Strukturen und keine Änderungen in der Löslichkeit. Aufgrund des veränderten isoelektrischen Punktes bzw. einer geringfügig erhöhten Hydrophibizität kann es zu einer erhöhten Wechselwirkung mit anderen Proteinen, insbesondere mit dem Chaperon αB , kommen [69-71]. Die Variante W43R hat i.V. zum Wildtyp eine fast identische Sekundär- und Tertiärstruktur. Jedoch können in Lösung mit ANS ein erhöhter Anteil an oberflächenexponierten hydrophoben Seitenketten gezeigt werden, was zu einer geringeren Löslichkeit, thermischen Stabilität und erhöhten Aggregationsanfälligkeit bei UV-Bestrahlung führt [72]. Die Mutation verursacht zusätzlich eine Destabilisierung der N-terminalen Domäne und somit Proteinaggregation [73]. Zusätzlich wurden noch verkürzte Konstrukte (nonsense Mutationen) und frameshifts identifiziert. Sie beinhalten Y56X, Y134X, R140X, W157X und G165AfsX3 [69, 70, 74-77].

1.3.1. W43R hγD

Die pathogene, vererbbare Variante W43R verursacht bereits im Säuglingsalter eine Linsentrübung in dem mit $h\gamma D$ Kristallin angereicherten Nukleus. Sie wird als UV-C bestrahlte, nachahmende Variante von $h\gamma D$ postuliert [72, 73, 78, 79]. Dabei wurde im hydrophoben Kern der N-terminalen Domäne das hydrophobe Tryptophan mit Arginin, welches eine Seitenkette mit positiver Ladung besitzt, ersetzt. Dies führt zu einer strukturellen Destabilisierung, wobei W43R i.V. zum Wildtyp eine ähnliche Sekundär- und Tertiärstruktur besitzt [72, 73]. Obwohl sich das Rückgrat, vor allem in der N-terminalen Domäne, insbesondere am Interface zur C-terminalen Domäne i.V. zum Wildtyp stark verändert hat [73], ergeben sich in der Röntgenkristallstruktur bis auf eine leicht

unterschiedliche Orientierung der beiden Domänen keine deutlichen strukturellen Änderungen [73].

Die Variante W43R besitzt i.V. zum Wildtyp eine erniedrigte thermische Stabilität [72] und ist anfälliger gegenüber Proteaseverdau. Dies deutet auf eine erhöhte Population aus teilweise entfaltetem Protein hin, die zugänglicher für Proteasen ist und wurde von *Ji* & *Gronenborn et al.* [73] mittels NMR-spektroskopischen Methoden und Gleichgewichtsentfaltung identifiziert. Dabei handelt es sich um ein Intermediat aus entfalteter Ntd und gefalteter Ctd, dessen Population etwa 10% der Gesamtpopulation von W43R entspricht.

Zusätzlich zur Faltung/Rückfaltung unterscheidet sich auch das Fluoreszenzverhalten der Variante W43R bzw. W43F vom Wildtypprotein $h\gamma D$ [73, 80]. Die stark verringerte Fluoreszenzintensität von W43R i.V. zum Wildtyp spiegelt das Quenchingverhalten von $h\gamma D$ durch Intradomänen FRET (Förster Resonanzenergietransfer) und Energiedissipation am Akzeptor wieder. In der N-terminalen Domäne ist W43 der Donor und W69 der Akzeptor. Durch die Punktmutation W43R wird nur noch W69 angeregt, wobei das blauverschobene Fluoreszenzspektrum von W43 [80], welches im Wildtyp zusätzlich W69 anregt, nicht vorhanden ist. Dadurch absorbiert und emittiert der Donor W69 in der Variante W43R einen geringeren Anteil als im Wildtyp $h\gamma D$. Der Intradomänen FRET in der Ctd findet dabei unabhängig von der in der Ntd statt [80].

Für die Aggregationsanfälligkeit und Löslichkeit von W43R gibt es unterschiedliche Angaben [72, 73, 78]. Dabei scheint die Anwesenheit eines N-terminalen His₆-Tags die Aggregationsanfälligkeit zu verringern und die Proteinlöslichkeit zu erhöhen. Zusätzlich weist die Variante W43R i.V. zum Wildtyp eine erhöhte UV-C induzierte Aggregation auf [72].

Für die Variante W43R wurde eine oxidationsabhängige Aggregation unter physiologischer Temperatur und pH gezeigt. Es wird argumentiert, dass die Ausbildung einer internen Disulfidbindung zwischen den Cysteinen C33 und C42 dabei zu einer Stabilisierung von einem Intermediat führt. Dieses Intermediat besitzt eine teilweise entfaltete Ntd, dessen nicht nativ ähnlicher β-Strang mit der Ctd eines anderen Monomers durch intermolekulare Wechselwirkungen für die Dimerbildung und Aggregation verantwortlich ist [78]. Für die Variante W43Q konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich eine redoxaktive, interne Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C109 und C111 im Wildtyp hyD im dynamischen Austausch mit anderen hyD Molekülen befindet und im Wildtyp keinen Einfluss auf dessen Aggregation hat. Befindet sich jedoch die Variante W43Q in Anwesenheit von oxidiertem Wildtyp, wird das oxidierte hyD reduziert, und eine Aggregation der Variante W43Q durch die Oxidation, analog zur Variante W43R, hervorgerufen [78, 79, 81]. Es ist also anzunehmen, dass auch die pathogene Variante W43R durch die Anwesenheit von oxidiertem hyD aggregiert. Weiterhing wurden im Rahmen von unterschiedlichen Simulationen eine oxidationsunabhängige Aggregation der Variante W43R bei hohen Proteinkonzentrationen von bis zu 200 mg/ml gezeigt. Dabei nimmt das Kristallin eine veränderte Konformation mit unveränderter Sekundärstruktur und geänderter Tertiärstruktur an. Durch den Verlust des nativen Interfaces zwischen den beiden Domänen Ntd und Ctd wird das Protein gestreckt und hydrophobe Regionen lösungsmittelexponiert. Dabei führen unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den einzelnen monomeren Domänen, insbesondere zwischen deren N-terminalen Domänen, zur Ausbildung von Dimeren und Aggregaten [82].

1.3.2. E107A hγD

Die pathogene, vererbbare Variante E107A verursacht bereits im Kindesalter eine Linsentrübung im Nukleus und somit Katarakt [71]. E107A hat im Vergleich zum Wildtyp nur minimale Veränderungen bzgl. der Struktur und Stabilität. Weder die durch Circulardichroismus bestimmte β -Faltblatt reiche Sekundär- und Tertiärstruktur, noch die Tryptophan Fluoreszenz, Proteinlöslichkeit oder die chemische und thermische Denaturierung und Rückfaltung unterscheiden sich deutlich vom Wildtyp [69, 83]. *Banerjee et al.* [69] detektierten weiterhin einen geringen Anstieg der Oberflächenhydrophibizität und eine drastische Erhöhung des isoelektrischen Punktes von pl_{hyD}=7,2 auf pl_{E107A}=8,2. Der Anstieg des isoelektrischen Punktes um eine Einheit führt zu einer erhöhten positiven Ladung von E107A bei physiologischem pH, was zu einer veränderten elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der Variante selber bzw. zwischen unterschiedlichen Kristallinen wie z.B. dem negativ geladenen α -Kristallin führen kann. Dabei scheint sich die homologe Interaktion zwischen hyD und hyD bzw. E107A und E107A nicht zu verändern, sondern eine erhöhte attraktive Wechselwirkung zwischen der Variante zu führen [69].

Vendra et al. [46] haben im Gegensatz zu der Veröffentlichung von *Banerjee et al.* [69] und der Masterarbeit von *Robert Broneske* [83] eine starke Verringerung der thermischen Stabilität um etwa 10°C, eine erhöhte Hydrophibizität um den Faktor zwei, eine Tendenz zur Aggregation und Proteinpräzipation und eine stark erniedrigte Löslichkeit um den Faktor 100 der Variante E107A festgestellt. Dabei ist zu beachten, dass der von *Vendra et al.* verwendete Puffer mit 2mM MOPS pH 7,3 eine zu geringe Pufferkapazität aufweisen kann, um den zuvor eingestellten pH-Wert in Anwesenheit des Proteins aufrecht zu erhalten. Dies kann zu teilweise erheblichen pH-Änderungen und somit drastisch veränderten Messbedingungen geführt haben. Somit ist davon auszugehen, dass sowohl die Struktur als auch die biochemischen Eigenschaften bis auf den geänderten pl von Wildtyp hyD und seiner pathogenen Variante E107A so gut wie identisch sind.

1.3.3. Isolierte Einzeldomänen

Beide isolierte Einzeldomänen von $h\gamma D$ existieren als Monomere und sind mit einem erhöhten β -Faltblattanteil strukturell ähnlich zum Wildtyp $h\gamma D$ mit leichten Änderungen in der Sekundär und Tertiärstruktur. Dabei ist die N-terminale Domäne i.V. zum Wildtyp und der C-terminalen Domäne strukturell etwas ungeordneter mit einem leicht erhöhten Anteil an α -Helices und Random-Coil Segmenten [43, 116, 160, 161]. Die thermische und biochemische Stabilität der Einzeldomänen sind i.V. zum Wildtyp verringert. Dabei weist die Ntd i. Vgl. zur Ctd und dem Wildtyp die geringsten Stabilitäten auf. Zusätzlich zeigen beide Einzeldomänen genau wie der Wildtyp i.V. zum entfalteten Protein ein gequenchtes Fluoreszenzverhalten. Dabei hat die Ntd eine erhöhte Quantenausbeute und ist somit als Einzeldomäne nicht so stark wie die Ctd oder der Wildtyp gequenched [43].

Es scheint, als ob sich die Einzeldomänen unabhängig voneinander korrekt falten können, wobei die Wechselwirkungen am Interface zwischen Ntd und Ctd die gefaltete Ntd stabilisiert und somit zur thermodynamischen Stabilität von hγD beiträgt [43, 47, 156, 157].

1.4. Katarakt

Eine Störung der komplexen Wechselwirkungen der Linsenkomponenten, der Verlust der Linsenmikroarchitektur, z.B. durch Ausbildung von Vakuolen oder ungeordneten Linsenfasernzellen bzw. hochmolekulare Proteinaggregationen können zu Fluktuationen in der Proteindichte oder Lichtstreuungen und somit zu Katarakt führen [7, 84]. Bis jetzt gibt es kein allgemein akzeptiertes Klassifikationssystem der unterschiedlichen Kataraktformen, häufig wird aber nach der Lage der Trübung in der Linse unterschieden. Dabei sind drei Hauptarten identifizierbar: (I) Nukleare Katarakt (Abb. 4 (a)), die häufigste altersbedingte Trübung der Linse, bei der sich der embryonale Linsenkern verfestigt und mit der Zeit gelb wird. (II) Kortikale Katarakt (Abb. 4 (b)), die an Radspeichen erinnernde weißliche Flächen am Kortex der Linse hervorrufen und (III) posterior subkapsuläre Katarakt (Abb. 4 (c)), bei der sich trübe Flächen hinter der Linsenkapsel bilden. Diese Kararaktarten können vereinzelt oder in Kombination auftreten [7, 85].



Abb. 4: Linsen mit unterschiedlichen Katarakterkrankungen. (a) dichte nukleare Katarakt [7]. (b) weiße kortikale Katarakt [86]. (c) reflektierte Aufnahme von posterior subkapsuläre Katarakt [7].

Die Augenerkrankung kann prinzipiell in zwei Gruppen, der angeborene und der altersbedingte, senile Katarakt, unterteilt werden [2, 4, 7, 85]. Die angeborene Katarakt bildet sich bereits im frühen Säuglingsalter aus und wird hauptsächlich durch Mutationen, die die Kristalline betreffen, hervorgerufen [85]. Die altersbedingte Katarakt entwickelt sich im Laufe der Zeit und ist stark von äußeren Umwelteinflüssen abhängig [2]. Dabei kann sich bereits nach 40 Jahren eine detektierbare Trübung der Linsen ausbilden [87].

1.4.1. Angeborene Katarakt

Die angeborene Katarakt wird hauptsächlich durch vererbbare Mutationen einzelner Genloci hervorgerufen, wobei 50 - 70% [2] der Erkrankungen auf Mutationen der Kristalline zurückzuführen sind [88]. Diese führen entweder direkt zu Aggregationen (angeborene Katarakt) oder zu einer erhöhten Anfälligkeit der Proteine gegenüber umweltbedingtem Stress wie UV-B Strahlung oder oxidativem Stress (altersbedingte Katarakt) [7].

Die angeborene Katarakt tritt dabei sowohl in Verbindung mit anderen Augen- und/oder Systemerkrankungen als auch als isoliertes Phänomen auf [2]. Sie weist ein großes Spektrum an Phänotypen auf (Abb. 4): Mutationen in den gleichen Genen können unterschiedliche Phänotypen hervorrufen, während Mutationen in unterschiedlichen Genen im gleichen Phänotyp resultieren können. Bereits im späten 18. Jahrhundert wurde der Zusammenhang zwischen vererbbarer Katarakt und den Mendelschen Vererbungslehren festgestellt. Bis heute gibt es dazu über 700 Einträge in der "*Online Mendelian Inheritance in Man*" Datenbank (www.omim.org). Insgesamt wurden 42 Genloci identifiziert, davon 12 ohne identifizierte, zugeordnete Gene. Die 30 bekannten, kodierende Gene können dabei in vier Gruppen eingeteilt werden: Zytoplasmatische Kristalline, Membranproteine, Zytoskelettproteine und DNA/RNA-bindende Proteine bzw. Transkriptionsfaktoren [85]. Dabei werden etwa 70% aller Fälle von autosomaler dominanter Katarakt durch *missense coding* in Kristallinen und Membranproteine kodierenden Genen verursacht [2].

Mutationen in den α -Kristallinen führen hauptsächlich zu einer verringerten Chaperonaktivität oder Bildung von Inklusionskörpern innerhalb der Linse, während Mutationen in den β - und γ -Kristallinen zu einer verringerten Löslichkeit oder einer instabilen Proteinstruktur führen können. Mutationen in den Membranproteinen wie z.B. MIPs (*major intrinsic protein* -Aquaporin 0 Wasserkanal) oder *gap-junction* Proteinen können einen Einfluss auf intrazelluläre Kommunikation, Wassertransport, Zell-Zell-Adhäsion und somit auf die Linsenintegrität und Transparenz haben. Weiterhin können Mutationen in den Zytoskelettproteinen wie BFSP 1 & 2 (*beaded filament structrual protein* 1&2) deren Wechselwirkung mit dem α -Kristallin verändern und somit einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion der Linse haben. Mutationen in den Transkriptionsfaktoren haben hingegen einen Einfluss in der embryonalen Entwicklung der Linse, wie z.B. Regulation der Transkription von sHSPs inklusive α B-Kristallin [7, 85, 88].

1.4.2. Altersbedingte Katarakt

Die altersbedingte Katarakt ist i.V. zur angeborenen Katarakt weniger phänotypisch variabel und bildet sich hauptsächlich im Nukleus oder in der Linsenrinde aus [2, 85, 87]. Bei dieser Erkrankung beeinflussen sich Gene und Umwelteinflüsse gegenseitig [7]. Abschätzungen zu Folge sind dabei etwa maximal 50% der Fälle erblicht bedingt [85]. Umweltbedingte Risikofaktoren beinhalten u.a. Rauchen, Fettleibigkeit, erhöhte Glukosewerte im Blut, UV-Bestrahlung und übermäßigen Alkoholkonsum [87].

Durch den Alterungsprozess treten eine Vielzahl an Veränderungen an den Linsenproteinen wie Proteolyse, eine erhöhte Anzahl an Disulfidbrückenbindungen, Phosphorylierung und nichtenzymatische Glykolisylierung auf, die durch oxidativen, osmotischen oder anderen Stress beschleunigt werden. Das Chaperon α -Kristallin bindet die geschädigte β/γ -Kristalline und verhindert somit lichtstreuende Aggregate. Da aber in den Linsenfasern keine Proteinexpression mehr stattfindet, ist es wahrscheinlich, dass sich im Laufe der Zeit ein gesättigtes Bindungsgleichgewicht zwischen den verfügbaren α -Kristallinen mit der steigenden Anzahl an schadhaften β/γ -Kristallinen einstellt. Die Komplexe werden größer und es kommt zu lichtstreuenden Aggregaten der geschädigten β/γ -Kristallinen bzw. der α - & β/γ - Komplexe [87]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass sich altersbedingte Katarakt durch eine metabolische Fehlfunktion der Linsenepithelzellen ausbilden kann [89]. Inzwischen gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass mehrere Gene wie z.B. CRYAA und EPHA2, die bei vererbbarer Katarakt involviert sind, auch einen Einfluss auf die Anfälligkeit für altersbedingte Katarakt haben. Zusätzlich wurden Variationen in mindesten 10 anderen

Genen gefunden, die nicht in Verbindung mit vererbbarer Katarakt stehen. Diese spielen z.B. eine Rolle im Metabolismus von Antioxidantien, Folsäure und Laktose und dem Lipid/Cholesterol Transport [2, 85].

Eine Zusammenfassung aller bisher gefundenen Gene und Loci von vererbbarer und altersbedingter Katarakt in Menschen und Mäusen und deren Referenzen lassen sich auf der Online Chromosomen Karte von Shiels, Bennett und Hejtmancik finden (Cat-Map) [2].

1.5. UV-B Strahlung und Katarakt

Das von der Sonne ausgestrahlte Licht enthält elektromagnetische Wellen im UV-A (λ = 320 - 400 nm), UV-B (λ = 290 - 320 nm) und UV-C (λ < 290 nm) Bereich. Bereits in der Atmosphäre wird die gesamte energiereiche UV-C Strahlung durch die Ozonschicht absorbiert, während die UV-B zum größten Teil und die UV-A Strahlung überhaupt nicht absorbiert wird [90, 91]. Somit erreicht nur ein geringer Anteil an UV-B Strahlung, der von den Proteinen durch die aromatischen Aminosäuren absorbiert werden kann [92, 93], das Auge. Dabei kann extensive UV-B Bestrahlung sowohl die Metaboliten in der Linse modifizieren [94-96] als auch zu oxidativen Schäden an unterschiedlichen Seitenketten der Aminosäuren der Linsenproteine [51, 97-100] und/oder zur Ausbildung von freien Radikalen [51, 101-103] und somit zu Katarakt führen. Für energiearmes Licht im UV-A Bereich, welches nicht von den Aminosäuren absorbiert wird, konnte kein Zusammenhang zwischen Bestrahlung, Proteinschädigung und Katarakt nachgewiesen werden [51, 90, 92, 93, 101, 102, 104-106].

1.5.1. UV-B Effekt in vivo

Eine Vielzahl an epidemiologischen Untersuchungen und Tierversuchen stellen einen klaren Zusammenhang zwischen UV-B Bestrahlung und der Entstehung von Katarakt, insbesondere in der nasalen Region der Linse, dar. Laut unterschiedlichen Abschätzungen sind 10 - 20% der weltweit bekannten Blindheitsfälle auf die UV-B Bestrahlung zurückzuführen. Dabei ist die Effizienz an der Verursachung von Katarakt stark von der eingestrahlten Wellenlänge abhängig. Diese erhöht sich zwischen 310 nm und 300 nm um den Faktor 10 [104, 107]. Eine Abschätzung der tatsächlich im Auge bzw. in der Linse akkumulierten UV-B Dosis gestaltet sich als schwierig. Sie ist u. a. abhängig von der Wellenlänge, dem Sonnenstand, der Pupillenöffnung, der Stellung der Augenlieder und vor allem dem Reflexionsgrad der Umgebung ab. Somit wird der Anteil an UV-Licht, das das Auge erreicht, bereits um den Faktor 18 durch ein individuelles Verhalten beeinflusst [90, 105]. Abhängig von der Wellenlänge des emittierten Lichts wird ein unterschiedlich großer Anteil von den Kompartimenten des Auges, wie Hornhaut und Linse, absorbiert, bevor es die Retina erreicht [90, 91, 108]. So wird ein Großteil der UV-B Strahlung bereits von der Hornhaut absorbiert, während bei der UV-A Strahlung bis zu 50% die Linse erreichen (Abb. 5) [90]. Mit dem Alter verschiebt sich das Spektrum des transmittierten Lichts durch die Linse zu höheren Wellenlängen [109, 110]. Einer Abschätzung von David H. Sliney zufolge beträgt

die Strahlungsstärke der Linse bei λ = 300 nm rund 0,08 mJ/cm² pro Tag, was in 80 Jahren Lebenszeit eine akkumulierte Strahlenbelastung von etwa 2,34 J/cm² entspricht [91].



Abb. 5: Relative UV-Absorption der unterschiedlichen Augenkompartimente bei variierenden Wellenlängen. Abb. nach [91].

UV-B Strahlung, die auf die Linse trifft, kann nicht nur zu Seitenkettenmodifikationen und Oxidation der Kristalline führen, sondern auch zu den chemischen Veränderungen der über 50 unterschiedlichen Metaboliten in der Linse. Dabei lässt sich aus der metabolischen Zusammensetzung von gesunden, an Katarakt erkannten und UV-B bestrahlten Linsen ein direkter Zusammenhang zwischen den an Katarakt erkannten und bestrahlten Linsen herstellen [95, 97]. Von den Metaboliten sind insbesondere zwei Gruppen wichtig für den Schutz der Kristalline gegenüber UV-induzierten Modifikationen: UV-Filter wie Kynurenine (Kyn) und deren Folgeprodukte, die Licht mit einer Wellenlänge von 300 - 400 nm absorbieren und dabei die absorbierte Energie in Wärme umwandeln, sowie Antioxidantien wie reduzierte Glutathione (GSH), die reaktive Sauerstoffspezies deaktivieren. Die Konzentrationen von fast allen Metaboliten, insbesondere von Antioxidantien, UV-Filter und Osmolyten, sind dabei in der gesunden Linse im Vergleich zur erkrankten Linse höher [89]. Dies könnte zu einer beschleunigten photooxidativen Schädigung der Linse bzw. Linsenkristallinen im Alter führen [94].

1.5.2. Absorptions- und Deaktivierungsprozesse in Proteinen

Ein Protein kann UV-Licht unterschiedlicher Wellenlängen absorbieren. Das Peptidrückgrat absorbiert Licht in dem Wellenlängenbereich von 190 - 230 nm der UV-C Strahlung, während das UV-B Licht in unterschiedlichen Anteilen durch die drei aromatischen Aminosäuren Trp, Tyr und Phe absorbiert wird. Das Absorptionsmaximum von Phe beträgt 250 nm, von Tyr 274 nm und von Trp 280 nm [92, 93]. Bei der Absorption wird das Molekül aus dem elektronischen Singulett-Grundzustand S₀ auf das angeregte, diskrete Energieniveau S₁ angehoben. Der angeregte Zustand kann durch unterschiedliche Desaktivierungsprozesse in den Grundzustand zurückfallen und dabei die aufgenommene Energie wieder abgeben. Dabei gehen alle Relaxationsprozesse vom niedrigsten Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustandes S₁ (v'=0) aus. Alle höheren

Schwingungszustände wurden zuvor bei der Inneren Umwandlung (IC) durch strahlungslose Abgabe der überschüssigen Energie an umgebenede Lösungsmittelmoleküle nach v⁺=0 relaxiert. Bei den direkten und indirekten Desaktivierungsprozessen von S₁, v⁺=0 in den Grundzustand S₀ handelt es sich um IC, Quenching, Fluoreszenz, Interkombinationsübergang (ISC) oder Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) auf einen Akzeptor [92, 93].

Die Löschung der Fluoreszenz von angeregten Molekülen kann über zwei Hauptwege stattfinden. Bei der Stoßlöschung/dynamisches Quenching wird der angeregte Fluorophor bei Kontakt mit anderen Molekülen deaktiviert bzw. die Anregungsenergie auf diesen übertragen und strahlungslos als Wärme abgegeben. Beim statischen Quenching bilden die Fluorophore nicht fluoreszierende Komplexe mit Quenchern im Grundzustand. Zusätzlich ist die Bildung von Excimeren möglich, bei denen die gebildeten Dimere im Vergleich zum Monomer bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren [92, 93, 111]. Quencher können ein benachbartes Molekül oder das Lösungsmittel sein. Die Wechselwirkung zwischen dem angeregten Fluorophor und dem Quenchpartner sind dabei stark von deren Abstand und von molekularen Faktoren wie der sterischen Abschirmung und Wechselwirkung von Ladungen abhängig. Allgemein sind Wechselwirkungen der Elektronenhüllen von Fluorophor und Interkombinationsübergang. Elektronenaustausch und photoinduzierter Quencher. Elektronen-Transfer einige der Prozesse, die stattfinden können [111].

Da sich die Absorption- und Emissionsübergänge der aromatischen Aminosäuren bei vergleichbaren Wellenlängen ereignen, kann es zu einem strahlungslosen Energietransfer von Phe auf Tyr und hauptsächlich von Tyr auf Trp innerhalb des Proteins kommen. Auch ein Trp-Trp-Homotransfer ist möglich, wobei der spektrale Überlapp stark von der Polarität des Lösungsmittels abhängt [111, 112]. Bereits in den frühen 90er Jahren wurde z.B. ein Energieübertrag von Tyr auf Trp im bovinen γ B-Kristallin detektiert [113]. Trp ist die am stärksten absorbierende aromatische Aminosäure, dessen Anwesenheit in der Linse schon in den 80er als Schutzfunktion für die Retina gegenüber UV-Strahlung postuliert worden ist [114]. Das Emissionsverhalten des Indol-Rings ist dabei stark von der Polarität und der lokalen Umgebung abhängt [93, 111]. Die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums wird allgemein hauptsächlich durch die relative Orientierung von Ladungen oder Wasserdipolen zu dem Ring beeinflusst und nicht von dessen Nähe [115].

Außerdem kann der angeregte Zustand von Trp durch Interkombinationsübergang (ISC), Lösungsmittelguenching und Protonen- und Elektronen- Transfer gelöscht werden. ISC kann zur Bildung von Radikalen führen [116], während Stoßlöschung durch Sauerstoffmoleküle im Lösungsmittel stark abstandsabhängig ist und zusammen mit dem Ladungstransfer auf Peptidbindungen zu den häufigsten Quenching-Mechanismen von Trp zählen. Protonentransfer des angeregten Zustandes an benachbarte, geladene Aminogruppen wie Lys und Tyr ist stark pH-abhängig und spielt eine eher untergeordnete Rolle [93, 111, 116]. Elektronentransfer auf lösliche Quencher, protonierte Carboxygruppen, Disulfidbindungen wie Cys, Peptidbindungen und Amide des Rückgrats zählen zu den häufigsten Quenching-Mechanismen. Dabei kann z.B. die Umgebung des Lösungsmittels den Elektronentransfer vom Indolring auf ein benachbartes Amid im Rückgrat stabilisieren [93, 111, 116, 117].

1.5.3. UV-induzierte Modifikationen von Proteinen

Photoinduzierte Protein-Oxidation kann allgemein zu Störung der Proteinstruktur, Entfaltung, Vernetzung, Fragmentierung und Aggregationen führen. Dabei ist die direkte Schädigung hauptsächlich durch UV-B Strahlung auf eine geringe Anzahl von Aminosäuren wie Trp, Tyr, His und den Disulfidbindungen von Cystin beschränkt. Diese bilden durch Absorption elektronisch angeregte Zustände und Photo-Ionisationsprodukte bzw. Radikale. Die indirekte Schädigung wird über Reaktionen mit angeregten Photosensibilisatoren im Triplett-Zustand hervorgerufen. Bei diesen handelt es sich z.B. um UV-absorbierende, niedermolekulare Bestandteile der Augenlinse[51, 101, 102]. Dies kann zu einer Vielzahl an Sekundärprozessen wie der Ausbildung von freien Radikalen und der Generierung von angeregten Singulett Sauerstoff ¹O₂ führen [103]. ¹O₂ reagiert bevorzugt mit den aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren Trp, His, Tyr, Met, und Cys und verursacht u.a. Oxidationsprozesse, Ausbildung von Radikalen und Ringöffnungen [51].

Die Indolgruppe von Tryptophan besitzt im UV-Bereich den höchsten Extinktionskoeffizient der aromatischen Aminosäuren und weist eine Vielzahl an photochemischen Vorgängen auf. So nimmt der erste Triplett Zustand an Elektronentransfer-Reaktionen auf entsprechende Akzeptoren teil, was zu einer Kaskade an unterschiedlichen Radikalen führt. Außerdem kann Trp direkt photoionisiert werden und ist stark zugänglich für ¹O₂ vermittelte Schäden, was zur Ausbildung von N-formylkynurenine (NFK) und Kynurenine, die wiederum andere reaktive Arten produzieren können, führen kann [51]. Einige der entstehenden Radikale können durch Antioxidantien deaktiviert werden [118]. Außerdem können bei allen weiteren Seitenketten der oben genannten Aminosäuren durch direkte oder indirekte Einflüsse der UV Strahlung eine Vielzahl von unterschiedlichen Schädigungen entstehen [51].

1.5.4. Desaktivierungsprozess von hγD

Die besondere Rolle von Trp in den Kristallinen zeichnet sich bereits durch deren strukturhomologe Positionen in unterschiedlichen γ -Kristallinen aus. Es befinden sich jeweils zwei Trp in den zwei hochkonservierten *greek key* Domänen [47, 119]. Die vier Trp weisen zwei sich ergänzende Mechanismen zur Auslöschung bzw. Abschwächung der absorbierten Strahlung auf. Im h γ D-Kristallin findet FRET zwischen den Donor- und Akzeptor- Paaren W43 und W69 bzw. W131 und W157 in den jeweiligen Domänen statt [80], während die Akzeptoren W69 und W157 das insgesamt starke Quenching-Verhalten des Proteins widerspiegeln [47]. Ein identisches Verhalten weist auch das h γ S-Kristallin auf [119].



Abb. 6: Wildtyp hyD-Kristallin mit aromatischen Aminosäuren. (a) N- und C-terminale Domäne von hyD mit den aromatischen Aminosäuren Tyr (Y), Phe (F) und Trp (W) in rot (pdb-code 2klj dargestellt mit PyMOL). (b) hydrophober Kern der N-terminaler Domäne mit den Positionen der FRET-Partnern W43 & W69 und den konservierten Aminosäuren Y56, Y63 und H66.

Prinzipiell wird der Intradomänen FRET der Tryptophane durch die Blauverschiebung der Donoren (W43 & W131) und die Rotverschiebung der Akzeptoren (W69 & W157) ermöglicht. Dabei befinden sich die FRET-Partner in einem Abstand von 12,2 bis 12,4 Å (Abb. 6(b)) [80]. Der Intradomänen FRET ist in der C-terminalen Domäne stärker ausgeprägt, während ein Interdomänen FRET zwischen den zwei Domänen nicht bzw. nur sehr schwach beobachtbar ist [119]. Die Akzeptoren W69 und W157 werden sehr stark geguenched (Quantenausbeute von ~ 0,01), während deren Partner W43 und W131 in Abwesenheit ihrer FRET-Partner nur ein intermediäres Quenching (Quantenausbeute von ~ 0,13 - 1,17) aufweisen. Sowohl QM-MM Simulationen, unterschiedliche Punktmutationen als auch die strukturelle Lage von W69 und W157 deuten auf einen sehr schnellen Elektronentransfer vom Indolring zu deren Amidrückgrat hin, der hauptsächlich durch die umgebenden Wassermoleküle stabilisiert wird. Die effizient gequenchten Trp befinden sich in einem hydrophoben Kern, in welchem sie Wasserstoffbrückenbindungen mit zwei benachbarten Wassermolekülen ausbilden. Diese markanten Wassermoleküle sind in mindestens 10 unterschiedlichen β- und γ-Kristallinen aus unterschiedlichen Spezies zu finden [68, 120-124]. Benachbarte Seitenketten scheinen dabei trotz ihrer konservierten Position innerhalb der γ-Kristalline einen geringeren Einfluss auf das Quenching zu haben [80].

1.5.5. UV induzierte Aggregation von hyD

Bei direkter UV-B Bestrahlung des h γ D *in vitro* wurden Photoaggregate in Form von amorphen Aggregaten und/oder amyloid ähnlichen Fibrillen detektiert [97, 100, 106, 125]. Für viele Jahrzehnte wurden hingegen keine Amyloide in Aggregaten von *in vivo* einsetzenden altersbedingten Katarakt gefunden [48] und erst kürzlich die Korrelation zwischen altersbedingten Katarakt, UV-induzierten Katarakt und Ausbildung von amyloid ähnlichen Fibrillen *in vivo* nachgewiesen [126]. Ein Großteil der amorphen Aggregate weist intermolekulare kovalente Bindungen auf. Dabei bilden sich zunächst Dimere aus, deren mögliche weitere Komplexbildung zu Aggregation und Lichtstreuung führen kann [106, 127, 128]. Hingegen sind die amyloid ähnlichen Fibrillen durch eine *Cross-β-*Struktur in der Ctd und einer ungeordneten Ntd charakterisiert [125, 128, 129].

Es ist wahrscheinlich, dass die UV-induzierte Aggregation der γ -Kristalline durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Mechanismen ausgelöst wird. Diese sind u.a. direkte oder

indirekte chemischen Modifikationen von z.B. aromatischen Aminosäuren und/oder His und Cys durch Oxidation und Ringöffnung, Ausbildung und Wechselwirkung mit Radikalen, kovalenten Schädigungen, Vernetzung, Fragmentierung und Neubildung von Disulfidbindungen [47, 97-99, 106, 125, 127, 129, 130]. Dabei spielt die Anwesenheit von Sauerstoff eine dominante Rolle bei der UV-B induzierten Proteinaggregation [97, 98, 100, 106, 125, 131], wobei z.B. beim aggregierten h γ D durch massenspektroskopische Analysen u.a. oxidative Schäden an unterschiedlichen Seitenketten festgestellt worden sind [97-100].

Es gibt zwei vorherrschende Auffassungen in der Literatur, welche aromatischen Aminosäuren von hyD durch die UV Bestrahlung vorwiegend geschädigt werden. Dabei scheinen die betroffenen Aminosäuren abhängig von der verwendeten UV-Strahlung zu sein. Schafheimer & King et al. [100, 106] postulieren, dass Tyrosine und nicht Tryptophane durch die UV-B Strahlung geschädigt werden, wobei die Tryptophane eine wichtige photoprotektive Rolle für das Protein einnehmen und die Aggregation oxidationsabhängig ist. Für die energiereichere UV-C Strahlung, postulieren Moran et al., Xia et al., und Serebryany et al. [97, 125, 132], dass die Oxidation von Tryptophan zu Kyn und der damit verbundene Verlust des nativen greek key Faltblattes bei der Photoaggregation von hyD involviert ist. Dabei besitzt das Emissionsspektrum der UV-C i.V. zur UV-B Strahlung einen größeren spektralen Überlapp mit dem Absorptionsspektrum der aromatischen Aminosäuren [111], wird aber in der Natur bereits vollständig durch die Atmosphäre absorbiert [90]. Die Donoren W43 und/oder W131 sind dabei am sensitivsten gegenüber UV-C Strahlung induzierte Schädigung [80, 127, 133]. Weiterhin identifizierten Ji & Gronenborn et al. [73] die im Rückgrat durch UV-C betroffenen Aminosäuren von hyD als fast identisch zu denen, die im unbestrahlten Zustand durch die Punktmutation W43R eingeführten Veränderungen hervorgerufen werden. Zusätzlich konnte nur das bestrahlte, nicht aber das unbestrahlte $h\gamma D$, analog zur unbestrahlten W43R Variante von Trypsin verdaut werden. Daher wird die Trp Variante W43R bzw. W43Q und W43E als UV-C bestrahlte bzw. oxidationsgeschädigte nachahmende Varianten von hyD postuliert [72, 73, 78, 79, 81, 97, 132], deren teilweise entfaltetes Intermediat durch die Disulfidbindung zwischen C33 und C42 zur oxidationsabhängigen Aggregation führen [78, 79, 81] (1.3.1).

1.6. Aufgabenstellung & Zielstellung

Katarakt zählt weltweit zu den häufigsten Ursachen von Erblindung. Dabei gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Mechanismen, die im Laufe eines Lebens zur Augenlinsentrübung führen können. Um diese besser zu verstehen, wurden im Rahmen dieser Dissertation mittels NMR-spektroskopischer Methoden zum einen die Wechselwirkungen zwischen einzelnen Kristallinen und zum anderen der UV-B Effekt auf das humane γ D-Kristallin untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit sollte überprüft werden, ob die pathogene Variante E107A im Vergleich zum Wildtyp hyD eine verstärkte Wechselwirkung mit dem Chaperon αB Kristallin eingeht und somit Katarakt verursacht. Diese Interaktionsstudien beider hyD-Kristalline mit dem αB Kristallin bzw. einer humanen Linsenkristallinmischung wurden unter physiologischen Temperaturen und thermischem Stress durchgeführt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von UV-Strahlung, der ein Hauptrisikofaktor zur altersbedingten Kataraktentstehung darstellt, auf das hyD untersucht. Dazu wurde mittels unterschiedlicher biophysikalischer und NMR-spektroskopischer Methoden die bis jetzt in der Literatur kaum untersuchten, physiologisch relevanten, UV-B induzierten Veränderungen im löslichen Anteil bestrahlten hyD-Kristallins des auf atomarer Ebene betrachtet. Um die strahlungsverursachten Effekte am Wildtyp hyD besser zu verstehen, sollten zusätzlich unterschiedliche hyD Varianten wie dessen isolierte Einzeldomänen, verschiedene Tyrosinund Tryptophanvarianten sowie die Katarakt hervorrufenden Varianten, W43R und E107A bestrahlt und im molekularem Detail untersucht werden.

2. Material

2.1. Linsenmaterial und rekombinant erzeugte Proteine

Die bovinen Augenlinsen aus Jungbullen wurden vom Biohof-Barthel (Greudnitz) käuflich erworben. Humane Linsen von an Katarakt erkrankten Patienten wurden von der Universitätsklinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bei Kataraktoperationen gewonnen und zur Verfügung gestellt.

Das rekombinant exprimierte und gereinigte Protein h α A (CryAA) wurde von Anne Diehl, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (Berlin-Buch) hergestellt. Die Variante Y17AY29A h γ D wurde von Kathrin Waldheim, Biophysik (MLU Halle) zur Verfügung gestellt.

Alle sonstige in Tabelle 1 aufgeführten Proteine wurden im Laufe dieser Doktorarbeit rekombinant exprimiert und gereinigt.

Tabelle 1: Gereinigte Kristalline. Die in kursiv dargestellten Konstrukte h α A und Y17AY29A h γ D wurden zur Verfügung gestellt.

Vektor	Protein	Varianten	Extinktionskoeffizient
			ε _{280nm} [1/Mcm]
pET32	hαA	Wildtyp (wt)	14440
pET16b	hαB	wt	13980
pET23d	bγB	wt	20965
pET14b	bγB	wt	20965
pET14b	hγD	wt	42860
		E107A	42860
		W43R	37360
		W69A	37360
		W131A	37360
		W157A	37360
		Y17A	41370
		Y29A	41370
		Y17AY29A	39880
		Ntd	21430
		Ctd	21430

2.2. Bakterienstämme, Plasmide, verwendete Kits und Enzyme

In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Chemokompetetente CaCl₂-Bakterienstämme verwendet: Die Expressionsstämme *E.coli* BL21(DE3) und *E.coli* RosettaTM(DE3)pLysS und den *E.coli* Stamm TOP 10, welcher zur Vervielfältigung von Plasmiden dient. Alle verwendete Bakterienstämme, Plasmide, Kits für molekularbiologische Arbeiten und Enzyme sind in Tabelle 2, Tabelle 3 und Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 2: Bakterienstämme & Plasmide

E.coli TOP 10	Invitrogen (Karlsruhe)
E.coli BL21(DE3)	Novagen (Darmstadt)
<i>E.coli</i> Rosetta [™] (DE3)pLysS	Novagen (Darmstadt)
pET14b	Dr. Gruber MLU Halle
pET16b modifiziert; His-Tag frei	Innoprofile-NWG
pET23dK ^R modifiziert; Kanamycin Resistenz	Innoprofile-NWG

Tabelle 3: Kits für molekularbiologische Arbeiten

Gelextraktionskit	Jena Bioscience (Jena)
PCR Purification Kit	Jena Bioscience (Jena)
Plasmid Mini-Prep-Kit	Jena Bioscience (Jena)

Tabelle 4: Enzyme

Dream Taq Polymerase & Puffer	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)	
Dpn1	Fermentas (Waltham, MA, USA)	
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)	
Turbo-Pfu-Polymerase & Puffer	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)	
Restriktionsendonuklease BamH1, Nde1,	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)	
Nco1 und Xho1		
Shrimp-alkalische Phosphatase & Puffer	Fermentas (St. Leon-Roth, D)	
T4-DNA Ligase & Puffer	Fermentas (St. Leon-Roth, D)	
Thrombin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)	

2.3. Nährmedien

Die Medien wurden für 20 min bei 1 bar Überdruck und 121°C dampfsterilisiert und anschließend bei 4°C gelagert. Die jeweiligen Antibiotika wurden mit einer Endkonzentration von 300 μ g/ml (Ampicillin, Carbenicillin, Chloramphenicol) bzw. 30 μ g/ml (Kanamycin) direkt vor Vorwendung hinzugegeben. Hitzeinstabile Bestandteile der Medien wurden mit einem Membranfilter (Porengröße 0,22 μ m) steril filtriert Die Zusammensetzungen der Medien sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung unterschiedlich	her Medien und Lösungen
--	-------------------------

Glyzerinkultur	700 µl Glycer	ol (87%) autoklaviert & 300 µl
	Zellsuspensior	n aus über Tag Kultur
dYT-Vollmedium	pro Liter ddH ₂ O: 16 g Pepton, 10 g	
	Hefeextrakt, 5	g NaCl
Feste Nährmedien	dYT-Medium n	nit 1,5% (m/V) Agar-Agar
MSMCHP2-Mineralsalzlösung [134]	875 ml	ddH ₂ O
	100 ml	10x MSMCHP2
	5 ml	1 M MgSO₄
	20 ml	40% (m/V) Glukose
	500 µl	200 mg/ml Thiamin
10 x MSMCHP2	840 mM	K ₂ HPO ₄
	261 mM	$NaH_2PO_4 \times H_2O^*$
	141 mM	Na ₂ SO ₄

	550 mM	NH ₄ CI
	20 ml auf 11	Spurenelemente Lösung
Spurenelemente Lösung	60 mM	Na ₂ -EDTA
	62 mM	FeCl ₃ x H ₂ O*
	5 mM	$CaCl_2 \times H_2O^*$
	883 µM	$CoSO_2 \times H_2O^*$
	626 µM	ZnCl ₂ x H ₂ O*
	400 µM	$CuCl_2 \times H_2O^*$
	722 µM	MnCl ₂ x H ₂ O*

2.4. Chemikalien & Verbrauchsmaterialien

Soweit in Tabelle 6 nicht anders angegeben, stammen alle sonstigen Chemikalien von der Firma Carl Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D).

Tabelle 6: Chemikalien

¹⁵ NH₄CI (>99 %)	Euriso-Top (Cambridge, UK) & Isotec, Sigma-Aldrich (Steinbeim D)	
D- ¹³ C ₆ Glukose (>99 %)	Euriso-Top (Cambridge, UK); Aldrich	
D-[1- ¹³ C] Glukose	CortecNet (Voisins Le Bretonneux, F)	
D-[2- ¹³ C] Glukose	CortecNet (Voisins Le Bretonneux, F)	
D ₂ O (>99,8 %)	CortecNet (Voisins Le Bretonneux, F)	
BME Vitamine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)	
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)	
6x MassRuler DNA Loading Dye	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D)	
DNA-Oligonukleotide	Biomers GmbH (Ulm, D) & Agilent	
	Technologies (Santa Clara, USA)	
Fast-Digest-Puffer	Fermentas (Waltham, MA, USA)	
IPTG	Gerbu (Gaiberg, D)	
NaN ₃	Honeywell Fluka-Thermo Scientific	
	(Seelze,D)	
PEG-6000	Fermentas (Waltham, MA, USA)	
PageRuler Unstained Protein ladder	Thermo Scientific GmbH (Schwerte, D)	
Pepton aus Casein	Merck KgaA (Darmstadt, D)	

Die Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 7 zu finden.

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

NMR-Röhrchen (5 mm)	New Era Enterprise Inc. (Vineland, NY, USA)
Falcon-Röhrchen	TPP (Trasadingen, CH)
Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Konzentrator Einheiten mit unterschiedlichen	Sartorius (Aubagne Cedex, F); EMD
Volumina und Ausschlussgrenzen	Millipore (Bedford, USA);
Millipore-Sterilfilter (Porengrößen 0,45 µm	Millipore (Bedford, USA)
und 0,22 µm)	
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil®	Hellma (Mühlheim, D)
Spectro/Por-Dialyseschläuche mit	Spectrum (L.A., CA, USA)
unterschiedlichen Ausschlussgrenzen und	
Klammern	

2.5. Geräte & Software

Alle verwendeten Geräte und Softwares sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Geräte und Software

Geräte	
Agarose-Gelelektrophorese:	Bio-Rad Laboratories GmbH (München,D)
Mini Gel Caster	
Mini-Sub [®] Cell GT	
ÄKTA Purifier, FPLC und Prime	GE Healthcare (München, D)
Autoklav LTA 275	Zirbus technology GmbH (Linden, D)
Autoklav VX-95	Systec (Wettenberg, D)
Brutschrank	Thermo Scientific/Heraeus (Hannau &
	Schwerte, D)
Dili Photometer OD600	Implen GmbH (München, D)
EmulsiFlex-C5	Avestin (Mannheim,D)
Eppendorf MasterCycler personal	Eppendorf GmbH (Wesseling-Berzdorf, D)
Eppendorf-Tischzentrifuge, -Thermomixer,	Eppendorf AG (Hamburg, D)
und -Thermocycler	
Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 1-4	Christ (Osterode)
LSC mit	
Drehschieber-Vakuumpumpe	Vacuubrand (Wertheim, D)
Geldokumentationsanlage Gel iX20 Imager	Intas Science Imaging Instruments
	(Gottingen, D)
Hareaus Biotuge PrimoR	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)
Homogenisierer Emulsiflex 05	Avestin (Mannheim, D)
	Jasco (Groß-Umstadt, D)
CD-Spektrometer J-815	
Fluoreszenzspektrometer FP-6500	
V/VIS-Spektralphotometer 650 & 550	Bhaaaanaa (Sam Baman, CA)
	Therma Fischer Scientific (Schwarte, D)
LabCyclor gradient 96	VMP (Darmstadt D)
Magnotrübror IKAMAG [®] PCT	IKA-Labortochnik (Staufon, D)
NMP Spoktromotor	Rukor (Karlsrubo, D)
Bruker Avance III 600	
Bruker Avance III 800	
nH-Messgeräte	WTW inol ab (Weilbeim D)
	Hamilton Company (Bonaduz, CHE)
Präzisionswaage Atilon ATL-4202	Acculab (Ettlingen, D)
Reinstwasseranlage GenPure (UF)	TKA (Niederelbert, D)
Tischzentrifugen Biofuge Primo R & Haraeus	Thermo Scientific GmbH (Schwerte, D)
Pico 17	
Ultra Low Temperatur Freezer 4570	New Brunsweick Scientific (D)
UV-B Quelle	AG Sinz; Pharmazie (MLU Halle, D)
Software	
Bruker TopSpin 3.0	Bruker (Karlsruhe D)
Corel Draw [®] X4	Corel Corporation (Ottawa, CAN)
Microsoft Office 2007	Microsoft GmbH (Unterschleißheim D)
NMR View 1803	One Moon Scientific Inc. Newark, N.I. 1194
NMRPIPE	

Origin 2016 G	Origin Lab Corporation (MA, US)
ProtParam	http://www.expasy.org
Pymol Molecular Graphics System	Schrödinger, LLC
SpectraManager 2.0	Jasco (Great Dunmow, UK)
Unicorn 5.0 Control Software	GE Healthcare (München, D)

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Arbeiten

Die von Dr. Qi Zhang bereitgestellte DNA der unterschiedlichen Kristallinen befinden sich bis auf das h α B alle im pET23d Vektor mit einem C-terminalen His₆-Tag. Um diesen abspalten zu können, wurden die DNA-Fragmente von b γ B und h γ D jeweils in einen pET14b Vektor mit N-terminaler Thrombin-Schnittstelle und His₆-Tag kloniert. Zusätzlich wurden die Varianten von h γ D (R15C, P24S) W43R und E107A in den Vektoren pET23d und pET14b durch Punktmutationen erzeugt. Alle weiteren Varianten von h γ D wurden von der Firma GenScript hergestellt.

Transformation von Plasmiden in kompetente Zellen

Bei der Transformation wurde ein Aliquot von 150 μ l CaCl₂-kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 50 - 100 ng Plasmid hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C erfolgte ein Hitzeschritt bei 42°C für 45 s mit anschließender Lagerung auf Eis. Zu den Zellen wurden jeweils 750 μ l dYT Medium hinzugegeben, bei 37°C für 30 - 60 min im Schüttler inkubiert und anschließend bei 4500 x g für 3 min pelletiert. Das Pellet wurde in 200 μ l Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Das Koloniewachstum erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen statt

<u>Glyzerinkultur</u>

Kompetente Zellen mit dem entsprechenden Plasmid wurden in 5ml dYT mit Antibiotikum über Tag angezogen. 300 µl der Zellsuspension wurden unter der Sterilbank mit zuvor autoklavierten 700 µl Glyzerol (87%) resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Vervielfältigung von Plasmiden

Top 10 Zellen mit dem entsprechenden Plasmid wurden in 5 ml dYT mit Antibiotikum über Nacht angezogen und bei 6800 x g für 3 min pelletiert. Die Gewinnung der DNA erfolgte nach dem Protokoll von QIAGEN und dem QIAprep Spin Miniprep Kit.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Prinzipiell wird bei der PCR ein DNA-Fragment oder das gesamte Plasmid mit Hilfe von Primern, Polymerasen, sowie den entsprechenden Pufferbedingungen und PCR-Reaktionsparametern (Tabelle 9 und Tabelle 10) amplifiziert. Dabei wird bei den Denaturierungsschritten die doppelsträngige DNA aufgebrochen, wodurch sich die komplementären Primer anlagern können und das DNA Fragment durch die Polymerase elongiert wird. Die Anlagerungstemperatur wird hauptsächlich durch die Primer-Sequenz und

die Elongationszeit durch die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments bestimmt. Die unterschiedlichen Primer-Sequenzen sind in 0 angegeben.

Klonierung eines DNA Fragmentes in einen neuen Vektor

Um die DNA Fragmente von den γ-Kristallinen vom pET23d in den pET14b Vektor zu klonieren, mussten zunächst mit Hilfe von PCR (Tabelle 9 und Tabelle 10) Schnittstellen für BamH1 und Nde1 erzeugt und dieses Insert amplifiziert werden. Anschließend wurde das PCR Produkt auf ein 1,6% Agarose-Gel aufgetragen, mit Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt und durch Gelextraktion gemäß dem Protokoll von QIAquick Gel Extraction Kit gewonnen. Parallel wurde der Vektor pET14b unter Hinzugabe von antarktischer Phosphatase mit den Restriktionsenzymen BamH1 und Nde1 geschnitten (Tabelle 11) und mit dem Protokoll von QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Beide Konstrukte, das Insert und der geschnittene Vektor, wurden mit Hilfe der T4-Ligase (Tabelle 11) ligiert und in *E.coli* Top 10 Zellen transformiert. Mittels Kolonie-PCR konnten die Bakterienkolonien auf Vorhandensein eines Plasmids mit korrekter Länge kontrolliert werden. In 5 ml Kulturen wurden diese Kolonien vervielfältigt, die DNA durch eine Mini Präparation (QIAprep Spin Miniprep Kit) gewonnen und durch Sequenzierung (Seqlab GmbH; Göttinen, D) kontrolliert.

Sequenzspezifische Mutagenese Quik Change

Für den Austausch einzelner Aminosäuren wurden zwei komplementäre Primer verwendet, die die Punktmutation enthielten und eine Quik Change Mutagenes (Tabelle 9 und Tabelle 10) durchgeführt. Die ursprüngliche DNA wurde anschließend mit Dpn1 verdaut und anschließend gereinigt (QIAquick PCR Purification Kit). Durch Hinzugabe von T4-Ligase konnte der lineare DNA-Strang zu einem zirkulären Plasmid ligiert und in Top 10 transformiert werden. Zur Kontrolle des Plasmides wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt und die DNA-Sequenz durch Sequenzierung (Seqlab GmbH; Göttingen, D) verifiziert.

		Klonierung vo Fragmenten	on DNA	Mutagenese/Qu	uik Change	Kolonie-PCR	
		x = 35		x = 12		x = 30	
	Schritt	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
	Initiale Denaturierung	95°C	5 min	94°C	2 min	94°C	5 min
ſ	Denaturierung	95°C	30 s	94°C	30 s	94°C	30 s
	Anlagerung	43°C	30 s	52°C _{E107A} bzw.	30 s	52°C	30 s
				54°C _{W43R}			
×ү	Elongation	72°C	35 s	72°C	7 min	72°C	1 min
	Finale Elongation	72°C	10 min	72°C	10 min	72°C	5 min
l	Kühlung	4°C		4°C		4°C	

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen der Polymerasekettenreaktionen

Tabelle 10: Chemikalien der Polymerasenkettenreaktionen

	Klonierung von	Mutagenese/Quik	Kolonie-PCR
	DNA Fragmenten	Change	je 10 µl Ansatz pro Kolonie
ddH ₂ O	33,5 µl	37,5 µl	38,5 µl
Puffer	5 µl 10 x DreamTaq	5 µl 10 x Pfu Puffer	5 µl 10 x DreamTaq Puffer
	Puffer		
dNTP-Mix (je 10 mM)	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Primer 1 (0,5 µM)	2 µl	2 µl	2 µl T7_fw

Primer 2 (0,5 μM)	2 µl	2 µl	2 µl T7_rev
DNA Template (~200 ng/µl)	1,5 µl	1 µl	
Polymerase	2 µl DreamTaq	1 µl Pfu Ultra	1 µl DreamTaq
	Polymerase	Polymerase	Polymerase
DMSO	2,5 µl	-	-

Tabelle 11: Chemikalien & Reaktionsbedingungen für Verdau und Ligation

	Verdau mit Restriktionsenzymen	T4 Ligation-DNA Fragment	Dpn1-Verdau	T4 Ligation-Quik Change
ddH ₂ O	0 µl	19,5 µl	-	-
	bzw.			
	25 µl			
Puffer	15 µl 2 x Tango	3 µl 10 x T4	5,6 µl Fast-	4 µl 10 x T4
		Ligase Puffer	Digest-Puffer	Ligase Puffer
Enzym 1	5 µl	1,5 µl T4 Ligase	1,1 µl Dpn1	1 µl T4 Ligase
Enzym 2	5 µl		-	-
DNA	50 µl PCR-Ansatz	4 µl Vektor	50 µl PCR-Ansatz	30 µl PCR-Ansatz
	bzw.	2 µl DNA Fragment		nach PCR
	25 µl Plasmid	(Insert)		Purification
PEG 4000	-	-	-	4 µl
Bedingungen	1-2 h bei 37°C	2 h bei 20°C	15 min bei 37°C	2 h bei 20°C

3.2. Proteinexpression und -reinigung

humanes αB-Kristallin

Die humane αB cDNA wurde von Prof. Wilbert Boelens (Nijmegen Centre for Moecular Life Science; Gelderland, Netherlands) zur Verfügung gestellt, von Dr. Qi Zhang in einen modifizierten, His-tag freien pET16b Vektor kloniert und in BL21(DE3) Zellen transformiert. Das Konstrukt konnte im Vollmedium dYT, in Mineralsalzlösung MSMCHP2 und im Autoinduktionmedium ZYM 5052 [136] bei 37°C für vier Stunden bzw. 20 - 25°C über Nacht überexprimiert werden. Dabei wurden die Zellen im dYT und MSMCHP2 Medium bei einer optischen Dichte zwischen 0,7 und 1,0 mit einer Endkonzentration von 1mM IPTG induziert. Das Medium mit den enthaltenen Zellen wurde bei 8280g für 10min bei 4°C (Rotor SLA-3000) zentrifugiert und das Pellet bei -80°C gelagert.

Zur Aufreinigung wurden die Zellen im Puffer A resuspendiert, 2 mg Lysozym pro 1 g Zellen, eine 1:100 Verdünnung von 0,5 M MgCl₂, eine 1:20000 Verdünnung von DNase1 und 500 µl Protease Inhibitor Cocktail pro 3 l Zellkultur hinzugefügt und mit einem Mikrofluidizer bei einem Druck von 500 bis 1000 bar drei Mal bei 4°C aufgeschlossen. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt bei 47810 g für 30 min und 4°C (Rotor SS34) wurden 2 mg Protaminsulfat pro 2 ml Zelllysat hinzugefügt und unter Rühren für mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich eine homogene Suspension ausgebildet hatte. Anschließend erfolgte der zweite Zentrifugationsschritt unter identischen Bedingungen. Der Überstand wurde auf einen zuvor mit Puffer A äquilibrierten TMAE-Anionenaustauscher aufgetragen und h α B bei einem Gradienten von 0 - 15% Puffer B eluiert. Anschließend wurde das vorgereinigte h α B auf eine mit Gelfi-Puffer 1 äquilibrierte Gelfiltrationssäule (Hi Load Superdex 200 prep grade) aufgetragen und der Reinheitsgrad des gewonnenen Proteins mit einem SDS-Gel [137] überprüft. Für Lagerungszwecke wurde das zuvor mit Zentrifugen-Filtereinheiten aufkonzentrierte h α B mehrfach gegen Dialysepuffer 1 dialysiert, gefriergetrocknet und das Lyophilisat bei 4°C gelagert. Die verwendeten Puffer finden sich in Tabelle 12.

Puffer A	20 mM Tris/HCI	pH ^{20°C} 8,5
	1 mM EDTA	
Puffer B	20 mM Tris/HCI	pH ^{20°C} 8,5
	1 M NaCl	
	1 mM EDTA	
Gelfi-Puffer 1	50 mM Natriumphosphat	pH 7,5
	50 mM NaCl	
	1 mM EDTA	
Dialysepuffer 1	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat	pH 7,9

Tabelle 12: Verwendete Puffer zur Reinigung von $h\alpha B$

humanes γ-Kristallin

Es wurden unterschiedliche γ -Kristalline exprimiert und gereinigt. Für Konstrukte im pET14b Vektor konnte eine Abspaltung des His₆-Tags mit Hilfe des Thrombinverdaus durchgeführt werden, für Konstrukte im pET23d Vektor nicht. Als kompetente Zellen wurden entweder *E.coli* BL21(DE3) oder Rosetta pLyS verwendet. Je nach Verwendungszweck wurden die Proteine entweder im Vollmedium dYT oder in Isotopen angereicherten Mineralsalzlösung MSMCHP2 überexprimiert. Dazu wurden die Konstrukte im Vollmedium dYT angezogen und drei Mal in nicht markiertes MSMCHP2 umgesetzt. Die Überexpression fand in mit Isotopen angereicherten MSMCHP2 über Nacht bei 20°C statt. Dabei diente abhängig von der gewünschten Markierung ¹⁵NH₄CI als einzige Stickstoffquelle und/oder ¹³C-Glukose als einzige Kohlenstoffquelle. Das Wachstum der Zellen wurde über die Messung der optischen Dichte (OD₆₀₀) bei einer Wellenlänge von 600 nm überwacht und die Zellen bei einer OD zwischen 0,7 und 1,0 mit einer Endkonzentration von 1mM IPTG induziert. Dabei entspricht ein OD von 1,0 in etwa einer Bakteriendichte von 1x10⁹ Zellen pro ml. Zum Ernten wurde das Medium mit den enthaltenen Zellen bei 8280g für 10min bei 4°C (Rotor SLA-3000) zentrifugiert und das Pellet bei - 80°C gelagert.

Zur Aufreinigung wurden die Zellen im NPI₂₀ Puffer resuspendiert, 2 mg Lysozym pro 1 g Zellen, eine 1:100 Verdünnung von 0,5 mM MgCl₂, eine 1:20000 Verdünnung von DNase1 und 500 μ l Protease Inhibitor Cocktail pro 3 l Zellkultur hinzugefügt und mit einem Mikrofluidizer bei einem Druck von 500 bis 1000 bar drei Mal bei 4°C aufgeschlossen. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 47810 g für 30 min und 4°C (Rotor SS34) wurde der Überstand im ersten Aufreinigungsschritt mit Hilfe einer Metall-Ionen-Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Die Suspension wurde auf eine zuvor mit NPI₂₀ Puffer äquilibrierten Nickel-Affinitätssäule aufgetragen und bei einem Gradienten von 30 - 60% von NPI₅₀₀ Puffer eluiert.

Für b γ B, h γ D und E107A h γ D im pET14b Vektor wurde ein Thrombinverdau über Nacht bei Raumtemperatur angesetzt. Dazu wurden 5 µl Thrombin (3,3 U/ml) je 1 g Zellen hinzugegeben und die Mischung gegen den Spaltungspuffer dialysiert. Anschließend wurde ein Protease Inhibitor Cocktail hinzugegeben und die Proteinlösung über eine gekoppelte Benzamidin-Sepharose-Säule und Nickel-Affinitätssäule aufgetragen. Der Durchfluss wurde auf eine zuvor mit Gelfi-Puffer 2 äquilibrierten Gelfiltrationssäule (Hi Load Superdex 75 prep grade) gegeben, das gereinigte Protein mit Zentrifugen-Filtereinheiten aufkonzentriert und nach Hinzugabe von 0,02% NaN₃ auf Puffer bei 4°C gelagert. Die Abspaltung vom His₆-Tags wurde mit Hilfe eines SDS-Gels und Western Blot überprüft und gegebenen Falls ein weiterer Thrombinverdau angesetzt. Alle weiteren Proteine im pET14b Vektor wurden ohne Thrombinverdau direkt auf die zuvor äquilibrierte Gelfiltrationssäule aufgetragen. Alle verwendeten Puffer zur Aufreinigung der γ -Kristalline sind in Tabelle 13 aufgelistet.

50 mM Natriumphosphat	pH 7,5
150 mM NaCl	
20 mM Imidazol	
50 mM Natriumphosphat	pH 7,5
150 mM NaCl	
500 mM Imidazol	
20 mM Tris/HCI	pH ^{20°C} 8,0
150 mM NaCl	
50 mM Natriumphosphat	pH 7,5
50 mM NaCl	
	50 mM Natriumphosphat 150 mM NaCl 20 mM Imidazol 50 mM Natriumphosphat 150 mM NaCl 500 mM Imidazol 20 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 50 mM Natriumphosphat 50 mM NaCl

Tabelle 13: Verwendete Puffer zur Reinigung von γ -Kristallinen

Die im Laufe dieser Doktorarbeit unmarkierte bzw. einfach oder doppelt markierte exprimierten und gereinigten Proteine sind in Tabelle 1 aufgelistet.

3.3. Gewinnung und Charakterisierung von Kristallinen aus Linsenmaterial

Gewinnung aus boviner Linse

Die Rinderaugen wurden direkt nach der Schlachtung von Rindern mit einem Alter jünger als 6 Monate bei -20°C gelagert und zur Gewinnung der Linse teilweise aufgetaut. Durch einen länglichen Schnitt oberhalb der Linse konnte diese mit Aufwendung von Druck auf die Hornhaut aus dem Auge gelöst werden. Die Linse wurde mehrmals kurz in Gelfi-Puffer 1 geschwenkt und bei -80°C gelagert.

Zur Gewinnung des bovinen Linsenhomogenats bzw. bovinem α -Kristallins wurden einzelne Linsen im Gelfi-Puffer 1 mit zusätzlichem NaN₃ gelöst. Dazu wurde das Linsen-Puffer-Gemisch unter Rühren bei 4°C für mehrere Stunden gelagert, bis sich die Linsen aufgelöst haben. Je nach gewünschter Endkonzentration des Linsenhomogenats wurde das Anfangsvolumen des zugegebenen Puffers näherungsweise angepasst. Für eine Endkonzentration von etwa 120 mg/ml wird 1 g Linse in 1,85 ml Puffer benötigt. Zur Abtrennung von nicht löslichen Linsenbestandteilen wurde die Mischung nach vollständiger Auflösung der Linse mehrmals bei 14000 g für 30 - 60 min zentrifugiert und das Pellet verworfen.

Zur Gewinnung von bovinem α -Kristallins wurde das lösliche Linsenhomogenat auf eine Größenausschlusschromatographie-Säule (Superdex 200 HiLoad 16/600) gegeben, die aufgefangenen α -Kristallin Fraktionen vereint und mit Zentrifugen-Filtereinheiten aufkonzentriert. Für Lagerungszwecke wurde das α -Kristallin gegen den Dialysepuffer (Tabelle 12) dialysiert, gefriergetrocknet und bei 4°C gelagert.

Gewinnung aus humaner Linse

Die Belehrung und Einverständniserklärung der Patienten, Durchführung der Operationen und Anonymisierung der Patientendaten wurde durch einen Ethik-Antrag von der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Halle festgelegt und genehmigt.

Die Katarakt aufweisenden Linsen wurden am Universitätsklinikum Halle bei Augenoperationen mittels Phakoemulsifikation entfernt, in isotoner Kochsalzlösung aufgefangen und bei -20°C bzw. -80°C gelagert. Der 6 x Puffer wurde im Verhältnis eins zu sechs zu den Linsen in isotoner Kochsalzlösung hinzugegeben und die Mischung bei 4°C bis zur vollständigen Auflösung der Linse gerührt. Anschließend folgten mehrere Zentrifugationsschritte bei 47810 g mit darauf folgender Konzentration durch Zentrifugen-Filtereinheiten. Der teilweise konzentrierte Überstand wurde gegen Gelfi-Puffer 1 dialysiert und weiter konzentriert. Zur Lagerung bei 4°C wurden 0,02% NaN₃ hinzugefügt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Verwendete Puffer für Gewinnung von	Kristallines aus den Linsen
---	-----------------------------

Gelfi-Puffer 1	50 mM Natriumphosphat 50 mM NaCl	рН 7,5
	1 mM EDTA	
6 x Puffer	300 mM Natriumphosphat	pH 7,5
	6 mM EDTA	
	1,2 mM DTT	
	0,12% NaN₃	

Charakterisierung des Linsenmaterials

Die Zusammensetzung der α -, β -, und γ -Kristalline von den humanen und bovinen Linsenhomogenaten wurde mittels Größenausschlusschromatographie (Superdex 200 HiLoad 16/600) untersucht. Dafür wurde der detektierte Lauf mit Gelfiltrationsläufen aus der Literatur [8, 138, 139] und mit der mittels Massenspektrometrie (Dr. Angelika Schierhorn; Serviceeinheit für Massenspektrometrie; MLU Halle) bestimmten Zusammensetzung der einzelnen Peaks einer bovinen Linse verglichen.

3.4. Spektroskopische Methoden

3.4.1. Absorptionsspektroskopie zur Konzentrationsbestimmung

Proteine absorbieren Licht in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen. UV-C Strahlung (100 – 280 nm) wird hauptsächlich durch Gruppen des Peptidrückgrats aufgenommen, während die drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe, F), Tyrosin (Tyr, Y) und Tryptophan (Trp, W) hpts. die UV-B Strahlung (280 – 315 nm) absorbieren. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration kann das *Lambert-Beersches Gesetz* $E = lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon cd$ mit E: Extinktion, ϵ : theoretisch ermittelter Extinktionskoeffizient, der sich aus der Anzahl und somit Summe der Extinktionskoeffizienten von Tyr und Trp in einem Protein zusammensetzt und d: Schichtdicke der Küvette bei einer Wellenlänge $\lambda = 280$ nm, herangezogen werden. Dabei wurde der Extinktionskoeffizient mit Hilfe des Programms ExPASy-ProtParam

bestimmt und ist für die verwendeten Proteine in Tabelle 1 aufgelistet. Die Messungen wurden am UV/VIS-Spektrometer Jasco V-650 durchgeführt.

Konzentrationsbestimmung von Linsenmaterial

Zur Bestimmung der bovinen und humanen Linsenlösung wurde mit Hilfe der Absorption bei 280 nm von unterschiedlichen bovinen Linsenkonzentrationen eine Eichgerade erstellt und damit der Extinktionskoeffizient bestimmt. Die Linsenkonzentration konnte mit Hilfe des abgewogenen Lyophilisatsgewichtes ermittelt werden [140]. Damit ergibt sich ein Extinktionskoeffizient von $\varepsilon_{\text{lens}} = (48980 \pm 3820) \frac{1}{M_{\text{CM}}}$.

3.4.2. Aggregationskinetiken - UV/VIS

Die Aggregation von Proteinen kann mit Hilfe von unterschiedlichen spektroskopischen Methoden wie statischer Lichtstreuung und Änderung der molaren Elliptizität beobachtet werden. Zusätzlich kann sie auch über die Absorptionsänderung bei $\lambda = 350$ nm bzw. 360 nm nachverfolgt werden, da in diesem Bereich kein Licht mehr absorbiert wird und somit nur noch das Streulicht an größeren Aggregaten detektiert wird.

Zur Bestimmung der Aggregation wurden an den UV/VIS-Spektrometern Jasco V-650 bzw. Jasco V-550 entweder über einer Messzeit von einer Stunde die Extinktion bei unterschiedlichen Temperaturen oder Temperaturübergänge von 13 bis 90°C mit Temperaturschritten von 2°C/min untersucht.

3.4.3. Fluoreszenzspektroskopie

Die intrinsische Fluoreszenz wurde über eine Anregung des Indolringes von Tryptophan bei 300 nm und dessen Emission im Bereich von 310 bis 420 nm detektiert. Dabei wurden Konzentrationen zwischen 1 und 3 μ M verwendet, wobei die Bandbreiten des Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometers jeweils 10 nm betrugen.

3.5. UV-B Bestrahlung

Zur UV-B Bestrahlung der Proben wurde ein Eigenbau der AG Sinz (Pharmazie, MLU Halle [141]) mit 4 x 20 W Lampen; $\lambda_{max} = 310$ nm (Abb. 7) und einem Detektor zur Messung der Strahlungsstärke verwendet. Während der Bestrahlungsdauer wurde das Probenvolumen von 550 µl in einem geöffneten 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Als Standardbestrahlungsstärke wurden 100 J/cm² gewählt.





3.6. NMR-Spektroskopie

Die hochauflösende NMR-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*) in Flüssigkeiten ermöglicht es aufgrund ihrer hohen spektralen Auflösung Proteine auf atomarer Ebene zu untersuchen. Die Signale kleiner Moleküle sind dabei in einem eindimensionalen ¹H Spektrum auflösbar. Für größere Moleküle, wie z.B. Proteine, muss hingegen in Anbetracht der starken Signalüberlagerung einzelner Resonanzfrequenzen des Wasserstoffkerns mehrdimensionale NMR verwendet werden. Dabei stehen inzwischen eine Vielzahl an heteronuklearen, multidimensionalen NMR Methoden zur Verfügung [142, 143]. Im Folgenden werden die für diese Dissertation relevanten Methoden kurz beschrieben, wobei der Schwerpunkt auf dem aromatischen ¹H¹³C constant time HSQC Korrelationsexperiment liegt. Für die Grundlagen der NMR-Spektroskopie wird auf die entsprechende einführende Literatur verwiesen.

Alle NMR-Messungen wurden an Bruker NMR-Spektrometern *Avancell1600* mit Raumtemperaturprobenkopf und *Avancel1800* mit Kryoprobenkopf durchgeführt. Zur Prozessierung der Daten wurde TopSpin oder NMRPipe verwendet und die Daten mittels NMR ViewJ. analysiert. Die genauen Mess- und Pufferbedingungen sind aus den jeweiligen Ergebnisteilen zu entnehmen.

Zur Bestimmung des Rauschens, wurden 100 Signale im Rauschen zufällig ausgewählt und aus den absoluten Werten für jedes einzelnes Spektrums der quadratische Mittelwert (RMS) berechnet. Diese wurden als relative Unsicherheiten für die Gaußsche Fehlerfortplanzung der einzelnen Kreuzsignale des jeweiligen Spektrums verwendet und bilden die Grundlage für den somit bestimmten experimentellen Fehler.

Die relative Änderung der Intensität eines Kreuzsignals in unterschiedlichen Spektren wurden nur dann als signifikant betrachtet, wenn das relative Verhältnis plus/minus zweimal der experimentelle Fehler unter bzw. oberhalb eines bestimmten Wertes liegt. Im Fall der Interaktionsstudien beträgt der Wert ≤ 0.75 bzw. ≥ 1.33 ; im Fall der UV-B induzierten Änderungen ≤ 0.8 . Der experimentelle Fehler wird dabei als Fehlerbalken im Graph dargestellt und wie beschrieben aus dem Signal/Rauschverhältnis der NMR Resonanzen und Fehlerfortpflanzung ermittelt.

Um die Verschiebung einzelner Aminosäuren zwischen Wildtyp h γ D und seiner Variante zu berechnen, wurde die relative mittlere chemische Verschiebung $\Delta\delta$ in einem ¹H¹⁵N

Korrelationsspektrum durch folgende Gleichung berechnet, bei der das Gyromagnetische Verhältnis zwischen Protonen und Stickstoff mit einbezogen ist:

$$\Delta \delta \left[ppm\right] = \sqrt{\Delta \delta \left({}^{1}H\right)^{2} + \frac{1}{100} \Delta \delta \left({}^{15}N\right)^{2}}$$

3.6.1. ¹H - ¹⁵N/¹³C HSQC Korrelationsexperimente

Generell lassen sich die Pulsprogramme zur Messung der ¹H¹⁵N bzw. ¹H¹³C Korrelationen in drei Pulssequenzblöcke unterteilen (Abb. 9): den INEPT Block (*Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer* [144]), der Evolutions- bzw. Entwicklungszeit der indirekten Dimension *t*₁ und den inversen INEPT Block. Dabei ist eine Isotopenmarkierung des Proteins mit ¹⁵N und/oder ¹³C erforderlich, wobei aus Sensitivitätsgründen der Magnetisierungstransfer für alle verwendete Pulssequenzen bei den empfindlichsten Kernen, den Protonen, beginnt und endet.

Im ersten Schritt wird in einem INEPT Block die Magnetisierung durch die skalare Kopplung (*J*-Kopplung) von Protonen auf einen Heterokern transferiert. Für die NH-Bindung der Rückgratpeptidbindung beträgt die *J*-Kopplung $J_{1H^{15N}} \sim 93$ Hz, während die Kopplungskonstante der aliphatischen Seitenketten $J_{1H^{13C}} \sim 135$ Hz und die der aromatischen Seitenketten $J_{1H^{13C}} \sim 185$ Hz beträgt (Abb. 10). Insgesamt wird der Transferweg zum einem über die Wartezeiten zwischen den einzelnen Pulsen, die zur Ausbildung der skalaren Kopplung benötigt werden, und zum anderen durch die Phase und Frequenz der Pulse, also der Resonanzfrequenz der jeweiligen Kernen bestimmt.

Im zweiten Schritt, der Entwicklungszeit *t*₁, entwickelt sich die chemische Verschiebung auf dem ¹⁵N bzw. ¹³C Kern abhängig von deren lokalen, chemischen Umgebung. Anschließend wird im dritten Schritt, dem inversen INEPT, die Magnetisierung auf den sensitiven ¹H Kern zurück transferiert und dessen FID (*Free Induction Decay*) aufgenommen. Während der Detektion des Signals wird üblicherweise eine Breitbandentkopplung angewendet, um eine Aufspaltung der Messsignale durch die *J*-Kopplung zu ¹⁵N oder ¹³C zu unterdrücken.

Um ein zweidimensionales Spektrum zu erhalten, werden im Laufe eines HSQC Experiments die gesamten Pulssequenzblöcke mehrfach durchlaufen und dabei die Entwicklungszeit *t*₁ schrittweise um ein bestimmtes Zeitinkrement erhöht. Durch eine zweifache Fourier-Transformation können somit Informationen über die Frequenzen der Heterokerne in der indirekten ¹⁵N bzw. ¹³C Dimension und der direkten ¹H Dimension korreliert werden.

Zusätzlich erfolgte, sofern nicht anders angegeben, die Wasserunterdrückung durch eine WATERGATE-Sequenz (*Water suppression by gradient tailored excitation*) und/oder Gradientenselektion im inversen INEPT [145, 146]. Um ein gutes Signal zu Rausch Verhältnis zu erzielen und eine ausreichende Auflösung zu erhalten, wurden Parameter wie die Anzahl der Scans pro Inkrement, Anzahl der Datenpunkte sowie die spektrale Weiten für das jeweilige Protein und Experiment angepasst. Die phasensensitive Quadraturdetektion erfolgte über States-TPPI (Time-proportional phase increments) [147] oder Echo-Antiecho [225]. Zur Prozession der Spektren wurde ein einfaches zero-filling und eine cos²-Funktion als Fensterfunktion verwendet.

¹H¹⁵N Korrelationsexperimente

Das in der NMR am häufigsten verwendete Experiment für Proteine ist das ¹H¹⁵N HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Dabei werden die Amidstickstoffkerne in der indirekten Dimension über die *J*-Kopplung mit den zugehörigen Amidprotonen in der direkten Dimension korreliert. Im Prinzip erhält man somit im Spektrum für jede NH-Bindung der Rückgratpeptidbindung jeweils ein Kreuzsignal pro Aminosäure. Ausnahmen bilden die Aminosäuren Tryptophan, Asparagin, Glutamin, Arginin, Histidin und Lysin, deren NH_x Gruppen in den Seitenketten zu zusätzlichen Kreuzsignalen führen können. Für die Aminosäure Prolin wird aufgrund des fehlenden Amidprotons im Rückgrat kein Signal detektiert [148].

Das ¹H¹⁵N HSQC liefert also im Prinzip eine Art Fingerabdruck des Proteins, mit dessen Hilfe z.B. die Lokalisierung der Interaktionsstelle zwischen dem isotopenmarkierten Protein und dessen nicht markierten Bindungspartners möglich ist. Zusätzlich bildet das ¹H¹⁵N HSQC die Grundlage für eine Vielzahl an komplexeren Pulsprogrammen und dient typischerweise als Basis für die Resonanzzuordnung der Rückgratatome.

Da das in dieser Dissertation verwendete Linsenkristallin hγD mit einem Molekulargewicht von 20,6 kDa [9] ein für die Flüssigkeits-NMR relativ großes Protein darstellt, wurde zur Bestimmung der ¹H¹⁵N Korrelationsspektren an Stelle eines konventionellen HSQC-Experiments [149] hauptsächlich ein auf dem TROSY-Effekt (*sensitivity and gradient enhanced Transverse Relaxation Optimized SpectroscopY*) [150] basierendes HSQC Experiment verwendet.

Dabei erfolgt beim ¹H¹⁵N TROSY-HSQC für größere Moleküle (>20 kDa) und bei hohen Magnetfeldstärken im Gegensatz zum klassischen ¹H¹⁵N HSQC eine Linienverschmälerung der Resonanzsignale und somit eine höhere Signalsensitivität [150]. Wird der TROSY-Effekt nicht angewendet, kommt es bei größeren Proteinen aufgrund deren längeren Rotations-Korrelationszeiten und somit verringerten transversalen Relaxationszeiten zur Linienverbreiterung und damit abnehmendem Signal/Rausch Verhältnis der NMR-Kreuzsignale.

Genauer ausgedrückt wird in einem ¹H¹⁵N HSQC-Experiment ohne Entkopplung aufgrund der *J*-Kopplung ein Multiplett von vier Kreuzsignalen hervorgerufen. Diese besitzen jeweils aufgrund von unterschiedlichen, miteinander korrelierten Wechselwirkungsmechanismen (Dipol-Dipol-Wechselwirkung und CSA (*Chemical Shift Anisotropy*)) verschiedene Relaxationsprozesse und somit Intensitäten und Linienbreiten. Die vier Kreuzsignale des Multipletts unterscheiden sich bei großen Proteinen und hohen Magnetfeldstärken stark voneinander, was bei Entkopplung, welche diese vier Komponenten mischt, zu einem deutlich verbreiterten Signal führt. Bei entsprechend großen Proteinen führen die schneller relaxierenden Komponenten dazu, dass das dadurch stark verbreiterte Signal nicht mehr detektiert werden kann.

Beim TROSY-Experiment wird nun nur die Komponente aus dem Multiplett selektiert, für die sich die unterschiedlichen Relaxationsmechanismen fast ausgelöscht haben und somit zu einem einzelnen, scharfen Kreuzsignal führt.

¹H¹³C Korrelationsexperimente

Um nicht nur eine Aussage über die NH-Korrelation der Rückgratpeptidbindung, sondern auch über die CH-Korrelation der aromatischen Seitenketten bzw. der aromatischen Ringsysteme treffen zu können, wurde das aromatische ¹H¹³C constant time HSQC benutzt.
Dieses baut sich prinzipiell aus den gleichen Pulssequenzblöcken wie das ${}^{1}H^{15}N$ HSQC auf, unterscheidet sich aber in dem zweiten Block, der Entwicklungzeit t_{1} .

Bei Verwendung von vollmarkierter ¹³C Glukose als einzige Kohlenstoffquelle bildet sich eine ¹³C-¹³C *J*-Kopplung zwischen den benachbarten Kohlenstoffen des aromatischen Ringsystems aus. Diese führen zu einer Multiplettaufspaltung der Signale innerhalb des Spektrums.

Eine Möglichkeit zur Verhinderung der Multiplettaufspaltung ist die Anwendung des aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Experiments [142]. Dabei wird die Wartezeit *T* während der Entwicklungszeit *t*₁ konstant gehalten und so gewählt, dass sie $T = \frac{1}{J_{cc}} = \frac{1}{56\text{Hz}} =$ 17,856ms entspricht. Somit refokusiert sich die ¹³C-¹³C Kopplung innerhalb von *t*₁ selbst, während sich gleichzeitig durch die Variation der Position des 180-Kohlenstoffpulses die chemische Verschiebung auf ¹³C entwickelt. Dabei führt die relativ lange, vorgegebene Wartezeit *T* zu einem großen Intensitätsverlust aufgrund der hohen *R*₂ Relaxation.

Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von 1-¹³C oder 2-¹³C Glukose an Stelle der vollmarkierten ¹³C Glukose. Dadurch werden nicht alle, sondern nur selektiv spezifische Kohlenstoffpositionen innerhalb des aromatischen Ringes isotopenmarkiert. Die 1-¹³C Glukose markiert die Positionen von $W\delta_1$, $W\epsilon_3$, $F\delta^*$, $Y\delta^*$, $H\delta_2$ und $H\epsilon_1$, die 2-¹³C Glukose die Positionen $W\delta_1$, $W\zeta_2$, $W\zeta_3$, $F\epsilon^*$, $Y\epsilon^*$ und $H\delta_2$ (Abb. 8). Somit kann sich keine *J*-Kopplung zwischen den benachbarten Kohlenstoffen des aromatischen Ringes ausbilden und die CH-Korrelation mit dem Aromaten ¹H¹³C HSQC, analog zum ¹H¹⁵N HSQC ohne die störende ¹³C-¹³C Multiplettaufspalung durchgeführt werden.



Abb. 8: Nomenklatur der Atompositionen der aromatischen Ringen Trp, Tyr, Phe und His. Kohlenstoffatom in Grün, Stickstoffatom in Blau, Sauerstoffatom in Rot und Wasserstoffatom in Grau.

Da aufgrund der Vollmarkierung mit der ¹³C Glukose die gleichzeitige Detektion aller CH-Korrelationen innerhalb des aromatischen Ringes möglich sind und zu 100% ¹³C markiert wird, wurde das aromatische ¹H¹³C constant time HSQC als Standardexperiment zur Untersuchung der aromatischen Ringsysteme von hγD und dessen Varianten gewählt.

Die Pulssequenz für das verwendete Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC ist in Abb. 9 dargestellt. Mit Hilfe des Produktoperator-Formalismus lassen sich die einzelnen Schritte innerhalb der Pulssequenz nachvollziehen.



Abb. 9: Pulssequenz des aromatischen ¹H¹³C constant time HSQC Experiments nach [142]: 90° und 180° Pulse werden durch schmale bzw. breite Balken dargestellt, und haben, falls nicht anders angegeben, Phase x. Gefüllte Halbellipsen repräsentieren geshapte 180° Pulse (Reburp mit 40 ppm Anregungsprofil [151]), offenen Halbellipsen gepulste Feldgradienten (PFG). Der verwendete Phasenzyklus lautet Φ_1 =(x,-x) und Φ_2 =(x,x,-x,-x) mit Φ_{rec} =(x,-x,-x,x). Während der Aufnahme des FID's wird mit GARP [152] auf dem ¹³C Kanal entkoppelt (dec). Die Quadraturdetektion erfolgt durch Inversion von Φ_1 und GC im Echo-AntiEcho-Modus.

I repräsentiert die Magnetisierung des ¹H-Kerns und S die Magnetisierung von ¹³C. Somit entspricht die skalare bzw. *J*-Kopplungskonstante J_{IS} der Kopplungskonstante J_{1H13C} . Zunächst wird mit Hilfe eines 90° Pulses auf ¹³C transversale ¹³C Magnetisierung erzeugt und durch den anschließenden Gradienten G1 dephasiert. Dadurch wird sichergestellt, dass die detektierten Signale ausschließlich aus der ¹H-Anregung stammen.

Im anschließenden INEPT Block wird ausschließlich durch die ${}^{1}J_{1H13C}$ -Kopplung die ${}^{1}H$ Anti-Phase Magnetisierung entwickelt und anschließend auf den ${}^{13}C$ Kern übertragen. Dabei entwickeln sich weder die chemische Verschiebung auf ${}^{1}H$ noch weitere Kopplungen. Dies lässt sich in zwei Schritte darstellen:

$$I_{z} \xrightarrow{90^{\circ}I_{x}\tau 180^{\circ}I_{x}\tau 180^{\circ}S_{x}} I_{y} \cos(J_{IS}\pi t) - 2I_{x}S_{z} \sin(J_{IS}\pi t) \xrightarrow{t=\frac{1}{2J_{IS}}} - 2I_{x}S_{z} \quad (1)$$

mit der aromatischen Kopplungskonstante $J_{IS} = J_{1H^{13}C} = 185Hz$ und t=2 τ =2,7ms

In Schritt (1) entwickelt sich durch die ${}^{1}J_{1H13C}$ -Kopplung die In-Phase Magnetisierung in Anti-Phase Magnetisierung.

$$-2I_x S_z \xrightarrow{90\,^{q_y}90\,^{q_y}} -2I_z S_y \quad (2)$$

Schritt (2): Durch den 90° Puls aus y-Richtung auf ¹H erhält man eine longitudinale Magnestisierung I_zS_z , wobei durch den Gradienten G2 alle transversale Magnetisierung dephasiert wird. Anschließend wird die longitudinale Magnetisierung I_zS_z mit dem 90° Puls mit variierenden Phasenzyklus ϕ_1 auf ¹³C auf den Kohlenstoff übertragen.

Während der Evolution bzw. Entwicklunszeit t_1 entwickelt sich prinzipiell die chemische Verschiebung auf ¹³C, während die *J*-Kopplungen zwischen ¹H-¹³C und ¹⁵N-¹³C aufgrund der jeweils zwei 180° Pulse in ¹H bzw. ¹⁵N unterdrückt werden. Im Gegensatz zu den gängigen HSQC-Experimenten, wird im constant time HSQC $T = 2T_a + 2T_b = \frac{1}{J_{13}c^{13}c} = 17,856$ ms konstant gehalten, wodurch sich die ¹³C-¹³C *J*-Kopplung selbst refokussiert (Schritt 3). Durch

Verkürzung bzw. Verlängerung der Wartezeiten T_a bzw. T_b mit $T = 2T_a + 2T_b = \text{konst}$ pro Inkrement wird dann die Position des 180° Pulses auf ¹³C variiert. Dadurch kann sich die ¹³C chemische Verschiebung während $t_1 = 2T_a - 2T_b$ entwickeln, was zur indirekten ¹³C Frequenzdimension ohne Modulation durch die ¹³C-¹³C *J*-Kopplung führt.

$$-2I_{z}S_{y} \xrightarrow{J-Kopplung \ auf \ ^{13}C} -2I_{z}S_{y} \cos(J_{SS}\pi t) + 2I_{z}S_{1x}S_{2z}\sin(J_{SS}\pi t) \xrightarrow{t=\frac{1}{J_{CC}}} 2I_{z}S_{y} (3)$$

Zusätzlich wird ein Gradient GC angewendet, der die gesamte Magnetisierung von ¹³C, aber auch von den Lösungsmittelprotonen dephasiert.

Im anschließenden inversen INEPT Block werden nun prinzipiell zum einen die Magnetisierung von ¹³C auf ¹H übertragen (Schritt 4) und eine *J*-Kopplung zwischen ¹³C und ¹H entwickelt um Inphase ¹H Magnetisierung zu erzeugen (Schritt 5). Zusätzlich rephasiert der Gradient GH die Magnetisierung auf ¹H, wodurch die Detektion der Magnetisierung in x-Richtung ermöglicht wird. Die durch den Gradienten GC dephasierte Magnetisierung der Wasserprotonen werden dabei durch GH nicht rephasiert und somit nicht detektiert.

$$2I_z S_y \xrightarrow{90\,°S_{\phi_2}90\,~q_x} - 2I_y S_z \quad (4)$$

$$-2I_y S_z \xrightarrow{\tau 180^{\circ} I_x \tau 180^{\circ} S_x} - 2I_y S_z \cos(J_{IS} \pi t) + I_x \sin(J_{IS} \pi t) \xrightarrow{t = \frac{1}{2J_{IS}}} I_x \quad (5)$$

Zur Detektion der I_x-Signale im Protonen-FID wird simultan zu der gemessenen chemischen Verschiebung in ¹H die skalare ¹H¹³C Kopplung durch eine GARP-Sequenz entkoppelt.

Durch entsprechende Variationen der Phasenzyklen ϕ_1 , ϕ_2 und ϕ_{rec} werden Lösungsmittelartefakte unterdrückt. Ein Inkrement des Experiments besteht somit aus einem Vielfachen von vier Scans, wobei im ersten Scan ϕ_1 und ϕ_{rec} aus x-Richtung wirken. Im zweiten Inkrement werden ϕ_1 und GC im Echo-AntiEcho Modus invertiert. Nach zwei Inkrementen, also einem komplexen Datenpunkt, wird t_1 inkrementiert.

3.6.2. Experimente zur Rückgratzuordnung

Um die bei der Messung von ¹H¹⁵N TROSY-HSQC bzw. ¹H¹⁵N HSQC auftretenden Kreuzsignalen den jeweiligen Aminosäuren des Proteins zuordnen zu können, wurden unterschiedliche, TROSY basierte Tripel-Resonanzexperimente aufgenommen. Dabei ist das verwendete Protein mit ¹³C und ¹⁵N doppelt isotopenmarkiert, wodurch sich entlang des Proteinrückgrates eine Kette aus NMR-aktiven Kernen ergibt. Dadurch kann die Magnetisierung, abhängig von den *J*-Kopplungskonstanten (Abb. 10), entlang der chemischen Bindung von einer Kernspezies zu einer anderen transferiert werden. Dazu werden typischerweise INEPT und weiterführende COSY (*Correlation Spectroscopy*) Transferschritte verwendet. Die Pulssequenzen werden dabei abhängig von deren Kohärenztransferwegen benannt, wobei nicht detektierte Kerne in Klammern gesetzt werden. So wird z.B. beim HNCACB die Magnetisierung vom Amidproton auf das Stickstoff- und weiter auf das C_a- und C_β- Atom transferiert. Soweit nicht anders angegeben erfolgt die Rückmagnetisierung über den gleichen Weg, wobei sowohl die Anregung als auch die

Messung in der direkten Dimension durch das NMR sensitive Amidproton erfolgt. Insgesamt wird die Detektion der chemischen Verschiebung jeweils in drei Dimensionen gemessen.



Abb. 10: Charakteristische J-Kopplungskonstanten in Proteinen. Diese werden u.a. für die selektiven Kohärenztransferschritte in Tripelresonanzexperimenten ausgenutzt. Somit lässt sich das Proteinrückgrat zuordnen. Abb. nach [143].

Bei dem Transferschritt von den ¹⁵N- zu den ¹³C_a-Atomen ähneln sich die ¹J-Kopplungskonstanten zu dem eigenen C_{α}-Atom (11 Hz) und die ²J-Kopplungskonstante zu dem C_a-Atom der Vorgänger Aminosäure (7 Hz; Abb. 10). Daher erhält man sowohl mit der HNCA als auch mit der HNCACB Pulssequenzen Informationen zu den C_{α} - Atom bzw. C_{β} -Atomen der eigenen und der Vorgängeraminosäuren. Durch Verwendung eines Magnetisierungstransferschrittes über den Carbonyl-Kohlenstoff ¹³CO werden aufgrund unterschiedlicher Kopplungskonstanten (1 und 15 Hz; Abb. 10) nur Signale der Vorgängeraminosäure detektiert. Mit einer Kombination aus z.B. HNCACB und HN(CO)CACB Pulssequenzen lassen sich somit Rückschlüsse zur Unterscheidung zwischen sind eiaenen und der Vorgängeraminosäure ziehen. Zusätzlich die der aminosäurespezifischen chemischen Verschiebungen aller detektierbaren Kerne für unstrukturierte Polypeptidketten bekannt [153], wodurch eine sequenzielle Zuordnung der Aminosäuren zu den Kreuzsignalen im ¹H¹⁵N HSQC des untersuchten Proteins erleichtert wird.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden unterschiedliche Zuordnungsexperimente für das Rückgrat verwendet: HNCA [154, 155], BEST HNCA (*Bandselective Excitation Short-Transient*) [156], HNCACB [157] und HN(CO)CACB [157]. Dabei wurde das BEST HNCA so optimiert, um im Vgl. zum HNCA entweder eine verkürzte Messzeit bei gleichem Signal zu Rauschen (S/N) oder ein verbessertes S/N bei gleicher Messzeit zu erhalten. Daher bietet sich das BEST HNCA insbesondere für verdünnte oder instabile Proteinproben an.

3.6.3. Experimente zur aromatischen Seitenkettenzuordnung

Um die Kreuzsignal der aromatischen Ringe bzw. Seitenketten von h γ D zuordnen zu können, mussten unterschiedliche, doppelt markierte Varianten hergestellt werden. Prinzipiell wurden im ersten Schritt mit dem Wildtyp h γ D durch Verwendung von 1-¹³C und 2-¹³C Glukose die charakteristischen Verschiebungen der unterschiedlichen Protonen-Kohlenstoffpositionen für die aromatischen Aminosäuren bestimmt. Dabei wurde jeweils ein Aromaten ¹H¹³C HSQC detektiert. Die 1-¹³C Glukose liefert Informationen über die Positionen von W δ_1 , W ϵ_3 , F δ^* , Y δ^* , H δ_2 und H ϵ_1 . Mit der 2-¹³C Glukose werden die Positionen W δ_1 , W ζ_2 , W ζ_3 , F ϵ^* , Y ϵ^* und H δ_2 bestimmt (siehe Abb. 8 & Kapitel 9.4.1). Im zweiten Schritt wurden die isolierten, doppelt markierten Einzeldomänen Ntd und Ctd für die gängigen Zuordnungsexperimente verwendet, da das Volllängenkonstrukt Wildtyp hγD mit einer Größe von 21 kDa eine zu kurze Relaxationszeit für eine direkte spektroskopische Zuordnung besitzt. Dafür wurden zuerst das zugeordnete C_{β} vom Rückgrat (HNCACB) über ein (HB)CB(CGCD)HD [158] mit dem H_δ von dem aromatischen ¹H¹³C constant time HSQC [142] verknüpft. Um weitere Kreuzsignale des aromatischen Ringsystems miteinander zu korrelieren, wurden entweder alle Kohlenstoffe mit benachbarten Protonen innerhalb einer aromatischen Aminosäure miteinander verknüpft (aro ¹H¹³C TOCSY-HSQC [142]) oder im Fall von Histidin die ²*J*-Kopplung zwischen dem Stickstoff und den Protonen, die an den benachbarten Kohlenstoffen gebunden sind (²*J*-¹H¹⁵N HSQC [159]) ausgenutzt (siehe Kapitel 9.4.2). Die Ergebnisse der Einzeldomänen wurden auf das Volllängenkonstrukt übertragen und im letzten Schritt durch hγD Varianten mit Punktmutationen einzelner aromatischer Aminosäure (W43R, W69A, W131A, W157A, Y17A, Y29A und Y17AY29A) verifiziert (siehe Kapitel 4.1.3, 9.4.2 & 9.5). Ein Schema der Zuordnung der aromatischen Ringsysteme ist in Abb. 11 dargestellt.

Im Anhang 9.4 befinden sich die Teilergebnisse von den oben beschriebenen unterschiedlichen Methoden zur Zuordnung des aromatischen Ringsystems von $h\gamma D$.



Abb. 11: Zuordnungsschema der aromatischen Ringsysteme über unterschiedliche NMR-Experimente

4. Ergebnisse

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurde der Wildtyp $h\gamma$ D-Kristallin und seine pathogenen Varianten E107A und W43R unter verschiedenen Umgebungsbedingungen *in vitro* untersucht.

Für die NMR-spektroskopische Untersuchungen des $h\gamma D$ -Kristallins musste zuerst eine Zuordnung von dessen Rückgrates und den aromatischen Seitenketten durchgeführt werden. Mit diesen konnten die Interaktion zwischen dem Chaperon α -Kristallin und einer Mischung der Augenlinsenkristalline aus Augenlinsen von an Katarakt erkrankten Patienten mit dem Wildtyp $h\gamma D$ und der Variante E107A unter thermischen Stress untersucht werden. Weiterhin ermöglicht die Zuordnung der aromatischen Seitenketten die Auswirkung von UV-B Strahlung auf den Wildtyp $h\gamma D$, E107A, W43R und weitere Varianten auf atomarer Ebene zu betrachten. Zusätzlich wurden die gesunden bovinen bzw. die Linsenhomogenate von an Katarakt erkrankten Patienten charakterisiert.

4.1. Zuordnung der NMR Spektren

4.1.1. Rückgratzuordnung von hγD-Kristallin und seinen unterschiedlichen Varianten

Für die Rückgratzuordnung von Wildtyp $h\gamma D$ wurde eine nicht publizierte Zuordnung von Dr. Ajay Pande (Department of Chemistry; University of Alabama; siehe auch [62]) als Anhaltspunkt bei veränderten Pufferbedingungen verwendet. Die hier gezeigte Zuordnung in Abb. 12 wurde mit einem HNCACB-Pulsprogramm in 50 mM NaP, 50 mM NaCl, 10% D₂O, 0,002% NaN₃ bei 25°C und einer Proteinkonzentration von 1,1 mM ¹⁵N¹³C hγD durchgeführt. Es konnten etwa 94% aller Aminosäuren (abzüglich Proline) zugeordnet werden. Insbesondere die Aminosäuren im flexiblen Linker zwischen den zwei Domänen konnten nicht zugeordnet werden.

Die erhaltene Zuordnungsliste für den Wildtyp wurde als Grundlage für alle weiteren Zuordnungen der unterschiedlichen Varianten unter gleichen Puffer- und Temperaturbedingungen genommen. Insgesamt wurden für die folgenden Varianten von h γ D eine Zuordnung des Rückgrates durchgeführt: Wildtyp h γ D (Abb. 12), die pathogenen Varianten W43R (Abb. 13) und E107A (Abb. 14), die beiden Einzeldomänen Ntd (Abb. 15) und Ctd (Abb. 16) und die Tyrosinvariante Y17A (Abb. 17).

Weitere Vergleiche der ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von Wildtyp hγD mit den nicht zugeordneten Varianten W69A, W131A, W157A, Y29A und Y17AY29A sind im Anhang (Kapitel 9.3) zu finden.



Abb. 12: ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektrum von Wildtyp hγD-Kristallin. 1,1mM ¹⁵N hγD wurden in 50 mM NaP, 50 mM NaCl, 10% D₂O, 0,02% NaN₃ pH 7,5 gemessen und die zugeordneten Amidprotonen im Einbuchstabencode und Sequenzposition beschriftet.

Für die Rückgratzuordnung der h_YD Variante W43R wurde aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration der Probe ein best_HNCA Pulsprogramm verwendet. Der His-Tag am N-terminus wurde nicht abgespalten, konnte aber auch nicht zugeordnet werden. Insgesamt konnten 92% aller Aminosäuren (abzüglich Proline und His-Tag) werden. Aus Abb. 13 (a) ist klar ersichtlich, dass das Austauschen von Tryptophan 43 mit Arginin eine starke strukturelle Veränderung des Proteins i.V. zum Wildtyp hervorruft. Bei der Auswertung der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$ (Abb. 13 (b), (c)) sind die maximalen Veränderungen am Interface zur Cterminalen Domäne zu finden, wobei die Struktur der gesamten N-terminale Domäne größere Unterschiede i.V. zum Wildtyp aufweist.

Für die Rückgratzuordnung h γ D Variante E107A wurde aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration der Probe ein best_HNCA Pulsprogramm verwendet. Es konnten 96% aller Aminosäuren (abzüglich Proline) zugeordnet werden. Wie schon in Abb. 14 (a) zu erkennen ist, sind die ¹H¹⁵N Korrelationsspektren vom Wildtyp und seiner Variante bis auf die ausgetauschte Aminosäure Alanin an Stelle der Glutaminsäure (E107A) und der

benachbarten Aminosäure Asparaginsäure (D108) identisch. Die Variante hat demnach keinen Einfluss auf die Struktur des Proteins. Dies ist auch bei der Auswertung der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$ (Abb. 14 (c)) und dessen Übertragung auf die Struktur ersichtlich (Abb. 14 (b)).

Sowohl für die Rückgratzuordnung der N- als auch der C-terminalen Domäne wurden ein HNCACB und ein HNCOCACB Pulsprogramm verwendet. Der His-Tag wurde jeweils nicht abgespalten, konnte aber auch nicht zugeordnet werden. Insgesamt konnten für beide Konstrukte 95 % aller Aminosäuren (abzüglich Proline und His-Tag) zugeordnet werden. Beide isolierten Einzeldomänen zeigen in den ¹H¹⁵N Korrelationsspektren i.V. zum Wildtyp etwa die Hälfte der Kreuzsignale, wovon nur wenige Aminosäuren stark verschoben sind (Abb. 15 (a) & Abb. 16 (a)). Bei der Auswertung der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$ der isolierten Ntd (Abb. 15 (b) und (c)) wird deutlich, dass die betroffenen Aminosäuren sich hauptsächlich am Interface zur C-terminalen Domäne befinden. Bei der isolierten Ctd sind nicht nur Aminosäuren am Interface zur N-terminalen Domäne sondern über die gesamte Struktur betroffen (Abb. 16 (b) und (c)).

Für die Rückgratzuordnung von Y17A wurde ein HNCACB Pulsprogramm verwendet. Der His-Tag am N-Terminus wurde nicht abgespalten, konnte aber auch nicht zugeordnet werden. Insgesamt konnten 95% aller Aminosäuren (abzüglich Proline und His-Tag) zugeordnet werden. Der Austausch von Y17 mit einem Alanin ruft einige Verschiebungen der Kreuzsignale i.V. zum Wildtyp hervor (Abb. 17 (a)), wobei sich die Änderungen hauptsächlich in der N-terminalen Domäne in der Nähe der ausgetauschten Aminosäure befinden (Abb. 17 (b), (c)).



Abb. 13: Rückgratzuordnung von 200 µM W43R i.V. zum Wildtyp hyD-Kristallin. (a) Übereinander gelegte ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von Wildtyp hyD (wt hyD) in Schwarz und seiner Variante W43R in Rot. Stärker verschobene Kreuzsignale sind mit Pfeilen markiert. (b, c) Auswertung der chemischen Verschiebung vom Wildtyp und seiner Variante aller zugeordneten Aminosäuren mit den Grenzen ($0,05 \le \Delta\delta < 0,1$) ppm in Gelb, ($0,1 \le \Delta\delta < 0,5$) ppm in Orange und ($\Delta\delta > 0,5$) ppm in Rot. (b) Markierung der betroffenen Aminosäuren auf der Struktur von hyD (2klj); nicht zugeordnete Aminosäuren sind in Schwarz dargestellt.



Abb. 14: Rückgratzuordnung von 180 µM E107A i.V. zum Wildtyp hyD-Kristallin. (a) Übereinander gelegte ${}^{1}H^{15}N$ TROSY-HSQC Spektren von wt hyD in Schwarz und seiner Variante E107A in Rot. Stärker verschobene Kreuzsignale sind mit Pfeilen markiert. (b, c) Auswertung der chemischen Verschiebung vom Wildtyp und seiner Variante aller zugeordneten Aminosäuren mit den Grenzen (0,05 ≤ $\Delta\delta$ < 0,1) ppm in Gelb, (0,1 ≤ $\Delta\delta$ < 0,5) ppm in Orange und ($\Delta\delta$ > 0,5) ppm in Rot. (b) Markierung der betroffenen Aminosäuren auf der Struktur von hyD (2klj); nicht zugeordnete Aminosäuren sind in Schwarz dargestellt.



Abb. 15: Rückgratzuordnung von 700 \muM Ntd i.V. zum Wildtyp hyD-Kristallin. (a) Übereinander gelegte ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von wt hyD in Schwarz und seiner Variante Ntd in Rot. Stärker verschobene Kreuzsignale sind mit Pfeilen markiert. (b, c) Auswertung der chemischen Verschiebung vom Wildtyp und seiner Variante aller zugeordneten Aminosäuren mit den Grenzen (0,05 $\leq \Delta \delta < 0,1$) ppm in Gelb, (0,1 $\leq \Delta \delta < 0,5$) ppm in Orange und ($\Delta \delta > 0,5$) ppm in Rot. (b) Markierung der betroffenen Aminosäuren auf der Struktur von hyD (2klj); nicht zugeordnete Aminosäuren sind in Schwarz dargestellt, die fehlende Ctd in Hellgrau.



Abb. 16: Rückgratzuordnung von 560 μ M Ctd i.V. zum Wildtyp hyD-Kristallin. (a) Übereinander gelegte ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von wt hyD in Schwarz und seiner Variante Ctd in Rot. Stärker verschobene Kreuzsignale sind mit Pfeilen markiert. (b, c) Auswertung der chemischen Verschiebung vom Wildtyp und seiner Variante aller zugeordneten Aminosäuren mit den Grenzen (0,05 $\leq \Delta \delta < 0,1$) ppm in Gelb, (0,1 $\leq \Delta \delta < 0,5$) ppm in Orange und ($\Delta \delta > 0,5$) ppm in Rot. (b) Markierung der betroffenen Aminosäuren auf der Struktur von hyD (2klj); nicht zugeordnete Aminosäuren sind in Schwarz dargestellt, die fehlende Ntd in Hellgrau.



Abb. 17: Rückgratzuordnung von 760 µM Y17A i.V. zum Wildtyp hyD-Kristallin. (a) Übereinander gelegte ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von wt hyD in Schwarz und seiner Variante Y17A in Rot. Stärker verschobene Kreuzsignale sind mit Pfeilen markiert. (b, c) Auswertung der chemischen Verschiebung vom Wildtyp und seiner Variante aller zugeordneten Aminosäuren mit den Grenzen (0,05 $\leq \Delta \delta < 0,1$) ppm in Gelb, (0,1 $\leq \Delta \delta < 0,5$) ppm in Orange und ($\Delta \delta > 0,5$) ppm in Rot. (b) Markierung der betroffenen Aminosäuren auf der Struktur von hyD (2klj); nicht zugeordnete Aminosäuren sind in Schwarz dargestellt.

4.1.2. Zuordnung der aromatischen Ringe von hγD

Für die Zuordnung der Kreuzsignale von hγD im Aromatischen ¹H¹³C constant time HSQC, also den Protonen-Kohlenstoff-Korrelationen der aromatischen Seitenketten, wurden unterschiedliche NMR-spektroskopische Experimente durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.3). Zum einen wurden die spezifischen Kohlenstoffpositionen innerhalb des aromatischen Ringes über selektive Isotopenmarkierung mit 1-¹³C bzw. 2-¹³C Glukose identifiziert (siehe Kapitel 9.4.1). Zum anderen wurde mit Hilfe der Einzeldomänen die Korrelation zwischen den Kreuzsignalen des zugeordneten C_β des Proteinrückgrates mit dem H_δ der aromatischen Seitenketten hergestellt, sowie weitere Protonen-Kohlenstoff-Kreuzsignale innerhalb eines aromatischen Ringes miteinander verknüpft (siehe Kapitel 9.4.2). Durch den Vergleich unterschiedlicher Punktmutationen von hγD konnten die Zuordnungsergebnisse zusätzlich verifiziert werden (siehe Kapitel 4.1.3 & 9.4).

Somit war es möglich, die Protonen-Kohlenstoffpositionen innerhalb der aromatischen Ringsysteme für die N-terminale Domäne (abzüglich Histidine) zu 90% (Abb. 18) und für die C-terminale Domäne (abzüglich Histidine) zu 78% (Abb. 19) zuzuordnen.



Abb. 18: Aromatisches ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektrum von 550µM Ntd mit Zuordnung der aromatischen Ringsysteme in 50 mM NaP, 50 mM NaCl, 10% D₂O, 0,02% NaN₃ pH 7,5. Kreuzsignale in Schwarz haben eine positive Phase, in Rot eine negative Phase. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäure unter einem Kreuzsignal.



Abb. 19: Aromatisches ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektrum von 560 μ M Ctd mit Zuordnung der aromatischen Ringsysteme in 50 mM NaP, 50 mM NaCl, 10% D₂O, 0,02% NaN₃ pH 7,5. Kreuzsignale in Schwarz haben eine positive Phase, in Rot eine negative Phase. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäuren unter einem Kreuzsignal.

Für das Volllängenkonstrukt h γ D konnten die Protonen-Kohlenstoffpositionen innerhalb der aromatischen Ringsysteme zu 80% (abzüglich Histidine) zugeordnet werden. Die Zuordnung ist in

Abb. 20 gezeigt.

Bei den 4x5 Tryptophan-Signalen konnten 19 von 20 eindeutig zugeordnet werden (95%). Bei den 14x2 Tyrosin-Signalen 21 von 28 (75%), wobei sich bei einigen dieser Kreuzsignale entweder mehrere Aminosäuren unter einem Peak befinden (z.B. Y δ * 29 & 51 & 139) oder die Zuordnung nicht eindeutig war (z.B. entweder Y ϵ * 7 oder 46 oder 56 für drei vorhandene Peaks). Bei den 6x3 Phenylalanin-Signalen konnten 13 von 18 sicher zugeordnet werden (72%). Für die 7x2 Kreuzsignale von Histidin gibt es nur für 4 von 14 Signalen (29%) eine sichere Zuordnung. Dies ist für die Zuordnung der aromatischen Ringsysteme von h γ D nicht relevant, da nur Trp, Tyr und Phe durch UV Bestrahlung direkt angeregt und modifiziert werden.



Abb. 20: Aromatisches ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektrum von 1,1mM Wildtyp hyD-Kristallin mit Zuordnung der aromatischen Ringsysteme in 50 mM NaP, 50 mM NaCl, 10% D₂O, 0,02% NaN₃ pH 7,5. Kreuzsignale in Schwarz haben eine positive Phase, in Rot eine negative Phase. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäuren unter einem Kreuzsignal.

4.1.3. Vergleich der aromatischen Spektren verschiedener Varianten von hyD

Für die Zuordnung der aromatischen Ringsysteme wurden unterschiedlich Varianten von hγD hergestellt, deren Punktmutationen insbesondere die von den Tryptophanen und den einzelnen Domänen eine teilweise große Veränderung des Rückgrats des Proteins bewirkt haben (4.1.1 und 9.3). Um eine Übertragung der aromatischen Ringsysteme der unterschiedlichen Zuordnungsmethoden und Varianten auf den Wildtyp hγD durchzuführen, musste zuerst die Übereinstimmung von seinen aromatischen Ringsystemen überprüft werden. Im Folgenden werden jeweils übereinander gelegte Spektren der aromatischen Seitenketten vom Wildtyp und unterschiedlichen Varianten gezeigt. Diese umfassen die physiologisch relevanten, Katarakt hervorrufenden und vererbbaren Varianten W43R & E107A, die zur Zuordnung notwendigen Einzeldomänen Ntd & Ctd und die "UV-mimikende" Variante Y17A. Die weiteren Spektren der zur Kontrolle hergestellten Varianten W69A, W131A, W157A, Y29A und Y17AY29A befinden sich im Anhang (9.4). Bei den Spektren ist zu beachten, dass bei allen Konstrukten bis auf Wildtyp hγD und E107A der N-terminale His-Tag nicht abgespalten wurde. Dies führt zu mehr und deutlich stärken Signalen an den Hε₁ und Hδ₂ Positionen.



Abb. 21: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 1,1mM Wildtyp h γ D-Kristallin in Schwarz und 200 μ M W43R in Rot. Verschwundene bzw. verschobene Kreuzsignale der Variante i.V. zum Wildtyp sind mit der entsprechenden Aminosäure beschriftet. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäure unter einem Kreuzsignal.

Im Vergleich zu starken Verschiebungen der Kreuzsignale im Rückgrat (Abb. 13), bei der hauptsächlich Aminosäuren in der N-terminalen Domäne und im Interface betroffen sind, gibt es im Aromaten Spektrum nur geringe Unterschiede zwischen dem Wildtyp und seiner biologisch relevanten Variante W43R (Abb. 21). Diese sind alle bis auf das H88 δ_2 , welches sich am Interface der C-terminalen Domäne befindet, in der N-terminale Domäne positioniert. Stark verschobene Kreuzsignale betreffen hauptsächlich die Kohlenstoffpositionen η_2 und ϵ_3 von dem zum W43 postulierten FRET-Partner W69. Zusätzlich sind, wie zu erwarten war, die Kreuzsignale der mit einem Arginin ersetzen Aminosäure W43 verschwunden. Weitere Aminosäuren die Unterschiede aufweisen lassen sich entweder direkt in der Nähe von W43 finden (z.B. Y17, H23, und F57) oder befinden sich in der strukturellen Nähe von W69 und anderen betroffenen Aminosäuren. Außerdem erscheinen an den Kohlenstoffpositionen von $Y\delta^*$ und $Y\epsilon^*$ zusätzliche Kreuzsignale.

Die weiteren Tryptophanvarianten W69A, W131A und W157A zeigen prinzipiell das gleiche Verhalten wie W43R. Trotz starker Veränderungen am Rückgrat der N- bzw. C-terminalen Domäne (Abb. 70 - Abb. 72) sind die aromatischen Ringsysteme i.V. zum Wildtyp sehr ähnlich. Veränderungen treten hauptsächlich nur in der Nähe des fehlenden, mit einem Alanin ersetzten Trytophan oder am Interface auf. Außerdem treten an den Kohlenstoffpositionen von Tyrosin bei den Varianten W69A und W157A zusätzliche Signale auf (Abb. 79 - Abb. 81). Ein genauer Vergleich zwischen den unterschiedlichen Trp-Kohlenstoffpositionen der vier Tryptophan Mutanten sind in Abb. 78 dargestellt.

Die pathogene Variante E107A zeigt sowohl bei den ¹H¹⁵N Korrelationsspektren des Rückgrats (Abb. 14) als auch bei den ¹H¹³C Korrelationsspektren der Aromaten i.V. zum Wildtyp kaum Unterschiede (Abb. 22). Somit besitzen der Wildtyp und die Variante E107A die gleiche Struktur.



Abb. 22: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 1,1mM Wildtyp hγD-Kristallin in Schwarz und 180μM E107A in Rot. Verschwundene bzw. verschobene Kreuzsignale der Variante i.V. zum Wildtyp sind mit der entsprechenden Aminosäure beschriftet. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäuren unter einem Kreuzsignal.



Abb. 23: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 1,1mM Wildtyp h γ D-Kristallin in Schwarz und 550 μ M Ntd in Rot. Verschwundene bzw. verschobene Kreuzsignale der Variante i.V. zum Wildtyp sind mit der entsprechenden Aminosäure beschriftet. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäuren unter einem Kreuzsignal.



Abb. 24: Aromatische ¹H¹³C Constant Time HSQC Spektren von 1,1mM hyD-Kristallin in Schwarz und 560 μ M Ctd in Rot. Verschwundene bzw. verschobene Kreuzsignale der Variante i.V. zum Wildtyp sind mit der entsprechenden Aminosäure beschriftet. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäuren unter einem Kreuzsignal.

Prinzipiell besitzen sowohl die isolierte Einzeldomäne Ntd als auch die isolierte Ctd i.V. zum Wildtyp hyD trotz leichten Veränderungen am Rückgrat (Abb. 15 & Abb. 16) beinahe identische aromatischen Spektren (Abb. 23 & Abb. 24). Dabei sind jeweils etwa die Hälfte fehlenden Cder Kreuzsignale, die der bzw. N-terminalen Domänen des Volllängenkonstrukts zuzuordnen sind, nicht vorhanden. Zusätzlich kann jeweils eine Reduktion der Intensitäten der Y δ^* Kreuzsignalen, bei denen im Volllängenkonstrukt die Signale mehrerer Aminosäuren unter einem Peak liegen, beobachtet werden. So sind z.B. Y98 und Y139 in der Ntd und Y17, Y29 und Y51 in der Ctd nicht mehr vorhanden. Die sonstigen Kreuzsignale der isolierten Einzeldomänen stimmen bis auf kleine Unterschiede von z.B. Trp oder sich am Interface befindenden Aminosäuren wie F57 oder H88 und Y139 sehr gut mit denen des Volllängenkonstrukts überein. Somit sind die isolierten Einzeldomänen i.V. zu den durch einen Linker verbundenen Domänen des Wildtyps korrekt gefaltet. Es ist im Prinzip möglich durch Übereinanderlegen der einzelnen Spektren von Ntd und Ctd ein fast identisches Spektrum von hyD zu erlangen (Abb. 84).



Abb. 25: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 1,1mM Wildtyp h_YD-Kristallin in Schwarz und 760 μ M Y17A in Rot. Verschwundene bzw. verschobene Kreuzsignale der Variante i.V. zum Wildtyp sind mit der entsprechenden Aminosäure beschriftet. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäure unter einem Kreuzsignal.

Die Variante Y17A zeigt sowohl in dem Spektren des Rückgrats (Abb. 17) als auch der aromatischen Seitenketten (Abb. 25) nur sehr geringe und um die Punktmutation begrenzte lokale Veränderungen. Im aromatischen Spektrum sind nur die Kreuzsignale der Aminosäuren betroffen, die entweder zum Interface zeigen, oder sich in der Nähe der Punktmutation befinden. Zusätzlich verschwinden sowohl bei der Variante Y17A, als auch bei Y29A (Abb. 82) und Y17AY29A (Abb. 83) bei den Y ϵ^* Signale die ursprünglichen Kreuzsignale der eigenen Punktmutation als auch die des jeweiligen gestapelten Partners Y29 bzw. Y17. Bei den Y δ^* Signalen ist die Intensität der mehrfach belegten Peaks reduziert. Für die einzelnen Punktmutationen tritt jeweils ein verschobener Peak des gestapelten Partners bei den Y ϵ^* und Y δ^* Signalen auf (mit Pfeil markiertes Kreuzsignal), während bei der doppelten Punktmutation Y17AY29A diese Signale fehlen.

Die Zuordnung des Rückgrates und der aromatischen Ringsysteme von Wildtyp $h\gamma D$ -Kristallin und seinen Varianten ermöglicht es nun, den Einfluss von unterschiedlichen Bedingungen auf atomarer Ebene für die einzelnen Aminosäuren nachzuverfolgen. Dabei stellt die für einen Großteil aller Aminosäuren erfolgreiche und verifizierte Zuordnung eine Grundlage für weitere NMR-spektroskopische Experimente dar. Mit dieser kann z.B. die Rolle einzelner aromatischen Seitenketten bei dem Schutz vor UV-B induzierter Schädigungen des Proteins untersucht werden.

4.2. Kristallinzusammensetzung boviner und humaner Augenlinsen

Die Augenlinse besteht hauptsächlich aus einer hoch konzentrierten Mischung von bis zu 450 mg/ml α -, β -, und γ -Kristallinen, deren Zusammensetzung in gesunden und an Katarakt erkrankten Linsen variieren. Um die Interaktion von h γ D bzw. E107A mit α -Kristallin und/oder dem gesamten Linsensystem zu untersuchen, wurde zunächst der lösliche Anteil der Kristallinen aus der Linse gewonnen und die Mischungen mittels Größenauschlusschromatographie charakterisiert. Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Proteinkonzentrationen der Linsenhomogenate haben eine Konzentration von ~ 15mg/ml nicht überstiegen. Im Rahmen der Dissertation von Matthias Roos [160] wurden Konzentrationen des h α B von bis zu 190 mg/ml verwendet. Dabei ähnelt sich der Verlauf der Makroviskosität sowohl für h α B als auch für die Mischung der Augenlinsenkristalline in den gesamten Konzentrationsbereichen (siehe Anhang 9.1), wobei die Aktivierungsenergie E_A der makroskopischen Diffusion von 18-20 kJ/mol beider Systeme dem vom Wasser entspricht. Dies bedeutet, dass sowohl für h α B als auch für die Kristallinmischung die Makroviskosität durch das Lösungsmittel bestimmt wird und fast keine transiente oder crowding verursachenden Bindungen in einem Konzentrationsbereich von bis zu 200 mg/ml auftreten [161].

Für die Überprüfung der Kristallinzusammensetzung einer Linse eignet sich die Größenauschlusschromatographie, bei der größere Proteine zuerst und kleine Proteine zuletzt eluiert werden. In Abb. 26 (a) ist ein typischer Verlauf von dem löslichen Proteinanteil einer bovinen Linse dargestellt. Die Elution erfolgt zunächst für die größeren α -Kristallin Komplexe (Peak 1), gefolgt von den kleineren oligomeren β-Kristallinen (Peak 2 & 3) und den monomeren γ -Kristallinen (Peak 4 und 5). Das Verhältnis der einzelnen Peaks zueinander kann dabei je nach Linsenhomogenat leicht variieren. Da in dem für die Masse verwendeten Gelfiltrationslauf die einzelnen Peaks nicht vollständig separiert wurden, wurden z.B. in Peak 1 nicht nur die α -Kristalline, sondern auch Anteile von den β -Kristallinen (Tabelle 15).



Abb. 26: Chromatogramm von bovinen Linsenhomogenat mit Zuordnung der einzelnen Kristallinfraktionen auf einer Superdex 200 HiLoad 16/600. Die Chromatogramme wurden jeweils auf den Wert des maximalen Peaks normiert. (a) löslicher Anteil von kompletten Linsen. Die einzelnen Peaks wurden mit Hilfe von Literaturvergleich und massenspektrometrischen Daten zugeordnet. Die identifizierten Proteine sind in Tabelle 15 aufgelistet. (b) Profile des löslichen Anteils der kompletten Linse (schwarz; gestrichelt), des Kortex (blau) und des Nukleus (rot).

Beim Vergleich der unterschiedlichen Regionen der bovinen Linse fällt in Abb. 26 (b) auf, dass der Nukleus i.V. zum Kortex und der gesamten Augenlinsenkristallinmischung einen sehr hohen Anteil an γ -Kristallinen besitzt, während der zweite β -Peak fast verschwunden ist. Der Kortex zeigt eine gegenteilige Verteilung: Ein erhöhter Anteil des zweiten β -Peaks und ein reduzierter Anteil an γ -Kristallinen. Dies spiegelt die inhomogene Verteilung der unterschiedlichen Kristalline innerhalb der bovinen Linse wieder, die für die gesunde humane Linse nicht so stark ausgeprägt ist.

Tabelle 15: Identifizierung einzelner boviner Kristalline des löslichen Linsenhomogenats durch Massenspektrometrie aus einem Gelfiltrationslauf (Abb. 26 (a)).

Peak	Identifizierte bovine Kristalline	Weitere Proteine/Enzyme
1: α -Peak	α Α & α Β	Carbonic Anhydrase 3
	βA2, βA3, βA4, βB1, βB3, γA	
2: β -Peak	βΑ3, βΑ4	
	αΑ, αΒ, βΑ2, βΒ1, βΒ2, βΒ3, γS	
3: β-Peak	βΑ2, βΑ3, βΑ4, βΒ2	Glutathione S-Transferase
	βΒ3, αΑ, αΒ	
4: γ-Peak	γS, γB, γD	Phosphatideylethanolamine-Bindungs
	γΑ, γC, γF, αΑ, αΒ, βΑ3, βΑ4, βΒ3	Protein
5: γ-Peak	γS, γB, γD	
	αΑ, βΑ3, βΑ4	

Der lösliche Anteil von den an Katarakt erkrankten Linsen (Abb. 27 (a)) besitzt i.V. zur gesunden humanen Linsen (Abb. 27 (b)) oder zur bovinen Linse (Abb. 26 (a)) kaum α -Kristalline und einen reduzierten Anteil an β -Kristallinen.



Abb. 27: Chromatogramme von erkrankten und gesunden humanen Linsen. (a) löslicher Anteil von an Katarakt erkrankten humanen Linsen auf einer Superdex 200 HiLoad 16/600. Das Chromatogramm wurde auf den Wert des maximalen Peaks normiert. (b) löslicher Anteil einer gesunden, jungen humanen Linsen auf einer Sephadex G-200 Gelfiltrationssäule nach [139].

Die Verwendung der Größenauschlusschromatographie ermöglicht es nun, die kristalline Zusammensetzung unterschiedlicher Augenlinsen zu analysieren. Dabei variiert diese abhängig von den Kompartiments der Linse und der Kataraktform. Insgesamt bildet die Charakterisierung der Linsensysteme eine Grundlage für weitere Untersuchungen mit einzelnen isotopenmarkierten Kristallinen in Mischungen der Augenlinsenkristalline.

4.3. Interaktionseffekte zwischen einzelnen Kristallinen

Die Transparenz der Linse wird durch ein komplexes Netzwerk von schwachen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Kristallinen der Linse aufrechterhalten. Um diese Interaktion mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Methoden analysieren zu können, wurden isotopenmarkierte h γ D-Kristalline in Anwesenheit von nicht markiertem Chaperon α -Kristallin bzw. der kompletten Mischung der Kristalline aus humanen Augenlinsen bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Dabei ermöglicht die Verwendung von Isotopenselektion die Betrachtung des einzelnen, markierten h γ D-Kristallins in einer Mischung aus weiteren, nicht markierten Proteinen.

Da das zur Verfügung stehende humane Linsenmaterial aus bereits an Katarakt erkrankten Probenmaterial gewonnen wurden, ist der α -Kristallin Anteil der löslichen Fraktion stark reduziert (Abb. 27 (a)). Um eine gesunde Kristallinmischung zu imitieren, wurden für die NMR-Messungen zusätzlich α A- und α B-Kristalline zu der Kristallinmischung aus erkranktem Linsenmaterial



Abb. 28: Chromatogramme unterschiedlicher Kristallinmischungen in Anwesenheit von erkrankten humanen Linsen auf einer Superdex 200 HiLoad 16/600. Die Chromatogramme wurden jeweils auf den Wert des maximalen Peaks normiert. Dargestellt sind in Schwarz & gestrichelt: ~ 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat. In Blau: ~ 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat & 100 μ M h γ D-Kristallin. In Rot: ~ 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat & 100 μ M h γ D-Kristallin. (a) Mischungen mit zusätzlichem Wildtyp h γ D. (b) Mischungen mit zusätzlichem E107A.

In Abb. 28 sind die Gelfiltrationsläufe der unterschiedlichen Mischungen für hinzugegebenen Wildtyp h γ D (a) und seiner Variante E107A (b) dargestellt. Die Hinzugabe von zusätzlichem, rekombinant exprimierten ¹⁵N markierten h γ D-Kristallin hat keinen detektierbaren Einfluss auf die allgemeine Zusammensetzung der Kristallinmischung der humanen Linsen.. Durch die Mischung mit zusätzlichem rekombinant exprimierten α A und α B lässt sich bis auf den fehlenden β -Kristallinanteil die erwartete Zusammensetzung einer gesunden humanen Linse erreichen (Abb. 27 (b)).

Die mögliche Interaktion zwischen den unterschiedlichen Kristallinen wurde mit zwei Methoden gemessen. Zum einem wurde das Aggregationsverhalten der Mischungen durch UV/VIS-Spektroskopie (4.3.1 & 4.3.2) und zum anderen die Änderungen der Kreuzsignale einer ¹⁵N isotopenmarkierten h γ D-Kristallin Probe in unterschiedlichen Mischungen NMR-spektroskopisch untersucht (4.3.3).

Bis auf die Mischung der Kristalline in der Augenlinse hlens_2 in Abb. 30 (a) wurden alle Messungen in dem Kapitel 4.3 mit der identischen humanen Kristallinmischungen durchgeführt. Die Linsen wurden während der Kataraktoperation mittels Ultraschall zerkleinert, abgesaugt, in einer isotonen Kochsalzlösung aufgefangen und bei -80°C gelagert. Das hier verwendete Linsenhomogenat besteht dabei aus dem konzentrierten, löslichen Anteil von 20 unterschiedlichen erkrankten Linsen.

4.3.1. Mischung der Augenlinsenkristalline und α -Kristallin: Chaperonaktivität und thermische Stabilität mittels Lichtstreuung

Die thermische Stabilität sowie das Aggregationsverhalten unterschiedlicher Linsenbestandteile und Mischungen kann mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie bei einer Extinktion von 360nm beobachtet werden. Charakteristisch für die Stabilität ist die Schmelztemperatur T_m. Da die thermische Denaturierung der Kristalline nicht reversibel ist und die Proteine aggregieren, wird hier von der apparenten Schmelztemperatur T_m* gesprochen.

Die gezeigten Messungen wurden im Verlauf von insgesamt vier betreuten Bachelor- und Masterarbeiten erstellt. Die entsprechenden Verweise sind in den Bildunterschriften zu finden.



Abb. 29: Temperatur- und zeitlicher Verlauf der Extinktion bei 360nm von bovinem α -Kristallin (b α) und humanem α B (h α B). Insert: Thermische Stabilität von 13-90°C von b α (rot) i.V. zu h α B (schwarz) mit einem Gradienten von 2°C/min. (a) & (b) Thermische Stabilität über eine Stunde bei unterschiedlich konstanten Temperaturen von 25µM h α B (a) und 25µM b α (b); Daten von h α B siehe [140]; Daten von b α siehe [162].

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Chaperonen, dem bovinen α -Kristallin und dem humanen α B-Kristallin, stellen sich Stabilitätsunterschiede dar. In Insert von Abb. 29 ist zu erkennen, dass die thermische Entfaltung und/oder Bildung lichtstreuender Komplexe des rekombinant exprimierten h α B bereits nach etwa 65°C beginnt, wobei diese zweistufig verläuft und eine apparente Schmelztemperatur von ~77°C besitzt. Hingegen ist das aus den bovinen Linsen gewonnene b α in einem Temperaturbereich von etwa 13° - 80°C stabil und fängt erst nach etwa 85°C mit der Bildung von lichtstreuenden Komplexen an. In Abb. 29 (a & b) wurden die jeweiligen Proben über eine Stunde bei einer konstanten Temperatur inkubiert und deren thermische Stabilität beobachtet. Dabei ist auffallend, dass das h α B bereits ab einer Temperatur von ~65°C zu einer thermisch induzierten Entfaltung und/oder Bildung von lichtstreuenden Komplexen neigt (Abb. 29 (a)), während das b α erst in einem Temperaturbereich zwischen 75°C und 90°C instabil wird (Abb. 29 (b)).



Abb. 30: Temperaturverlauf der Extinktion bei 360nm von unterschiedlichen Mischungen der Kristalline. (a) lösliches Linsenhomogenat aus 4 bovinen Linsen (blens; rot), 20 humanen Linsen (hlens; schwarz) und 4 humanen Linsen (hlens_2; blau) mit einem Gradienten von 2°C/min. (b) lösliches Linsenhomogenat hlens in Anbzw. Abwesenheit von h α B oder h α A & h α B mit einem Gradienten von 1°C/min. Daten von blens & hlens_2 siehe [140]; restliche Daten siehe [163].

In Abb. 30 wird die thermische Stabilität unterschiedlicher Linsenhomogenate in einem Temperaturbereich von 13°-90°C miteinander verglichen. Bei der gesunden, bovinen Augenlinsenkristallmischung setzt dabei die Bildung größerer, lichtstreuender Komplexe bei etwa 75°C ein. I.V. dazu bilden zwei unterschiedliche Kristallinmischungen aus bereits an Katarakt erkrankten humanen Linsen bereits bei etwa 55°C bzw. 67°C lichtstreuende Komplexe.

Zusätzlich besitzt die bovine i.V. zur humanen Kristallinmischung mit $T_m^* = 80^{\circ}$ C eine um etwa 7°C höhere apparente Schmelztemperatur und zeigt in einem Temperaturbereich von bis zu 90°C keine durch Aggregation verursachten Proteinausfall. Das Experiment wurde mit einer zweiter Präparation hlens_2 wiederholt und weist dabei i.V. zu hlens zwei Übergänge auf (Abb. 30 (a)). Beim Vergleich der Gelfiltrationsläufe (nicht gezeigt) beider humaner Linsenhomogenate ist dabei auffallend, dass die Mischung 2 einen um etwa den Faktor 1,3 höheren Anteil an α -Kristallin besitzt als die humane Kristallinmischung hlens. Daher besteht die Möglichkeit, dass der erste thermisch induzierte Übergang von hlens_2 von h α B zu hlens ist beinahe identisch zu der reinen Kristallinmischung aus humanen Augenlinsen. Nach Zugabe von einer Mischung aus h α A und h α B zu hlens verschiebt sich hingegen die T_m^* um etwa 4°C von ~68°C auf 72°C (Abb. 30 (b)).

4.3.2. hγD- und α-Kristallin: Chaperonaktivität und thermische Stabilität mittels Lichtstreuung

Bei dem Vergleich von Wildtyp h γ D mit seiner Katarakt assoziierten Variante E107A stellt sich heraus, dass beide Kristalline sowohl bei dem Temperaturübergang von 13°C auf 90°C (Abb. 31) als auch bei der Inkubation bei konstanten Temperaturen über eine Stunde (Abb. 32) einen beinahe identischen Verlauf zeigen.

Durch Hinzugabe des Chaperons h α B verschiebt sich sowohl die thermisch induzierte Entfaltung und/oder Bildung von größeren, lichtstreuenden Komplexen von ~64°C - 67°C auf ~70°C, als auch T_m* von ~75°C auf 77°C leicht, wobei der Effekt für E107A minimal stärker ausgeprägt ist (Abb. 31)



Abb. 31: Temperaturverlauf der Extinktion bei 350nm von Wildtyp h_YD-Kristallin (schwarz) und E107A (rot) in Ab- (durchgezogene Linie) bzw. Anwesenheit (gestrichelte Linie) von h α B mit einem Gradienten von 2°C/min. Daten siehe [83].

Bei der anschließenden Langzeitmessung über eine Stunde zeigen die reinen h γ D-Kristalline erst ab einer Temperatur von ~65°C mit der Zeit einen Anstieg der UV Extinktion. Durch Hinzugabe des Chaperons h α B wird die Entfaltung und/oder Bildung lichtstreuender Komplexe sowohl für den Wildtyp als auch für die Variante E107A bei 65°C verlangsamt, während bei höheren Temperaturen die Mischungen ein beinahe identisches Verhalten aufweisen. Dabei scheint die Anwesenheit von h α B bei 83°C zwar keinen Einfluss auf die apparente Schmelztemperatur T_m* zu haben, dafür aber den irreversiblen Proteinausfall durch Aggregation zu verlangsamen (Abb. 32).



Abb. 32: Zeitlicher Verlauf der Extinktion bei 350nm von Wildtyp h γ D-Kristallin und E107A in An- bzw. Abwesenheit von h α B. (a) 25 μ M h γ D (durchgezogene Linie) und 25 μ M h γ D & 50 μ M h α B (gestrichelte Linie). (b) 25 μ M E107A (durchgezogene Linie) und 25 μ M E107A & 50 μ M h α B (gestrichelte Linie). Daten siehe [83].

Im Kontrast zu der nur geringen Chaperonaktivität von h α B konnte bei Voruntersuchungen mit dem bovinen γ B-Kristallin (9.2.1) die Chaperonaktivität bei hohen Temperaturen von b α eindeutig gezeigt werden. T_m* verschiebt sich bei einem zweifachen molaren Überschuss an α -Kristallin um mehr als 10°C von ~69°C auf ~80°C. Zusätzlich kann die Bildung von entfalteten und/oder lichtstreuenden Komplexen von b γ B gemessen über eine Stunde nach Hinzugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an b α ab einer Temperatur von 55°C stark unterdrückt werden. Das bedeutet, dass das b α -Kristallin, welches aus einer Mischung von α A- und α B-Kristallin besteht, im Gegensatz zum h α B-Kristallin eine erhöhte Chaperonaktivität unter thermischen Stress aufweist.

4.3.3. Interaktionsstudien von Wildtyp hγD-Kristallin und seiner Variante E107A mit unterschiedlichen Interaktionspartnern mittels NMR-Spektroskopie

Um Interaktionseffekte vom Wildtyp h γ D bzw. seiner pathogenen Variante E107A mit h α B-Kristallin, humanen Linsenhomogenat oder Linsenhomogenat + α -Kristallin bei unterschiedlichen Temperaturen NMR-spektroskopisch untersuchen zu können, musste zuerst eine Zuordnung des Rückgrats der h γ D-Kristalline durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind in Kapitel 4.1.1 zusammengefasst.

Für die NMR-Messungen wurden folgende Proben mit zusätzlichen DSS als internes Referenzmittel hergestellt: 100 μ M ¹⁵N markierter Wildtyp h_YD bzw. seiner Variante E107A alleine, in Mischung mit 800 μ M h α B, in Mischung mit ~ 14,7 mg/ml humanem Linsenhomogenat oder in Mischung mit ~ 14,7 mg/ml humanem Linsenhomogenat + 800 μ M h α -Kristallin. Dabei entsprach die Mischung des h α -Kristallins aus zwei Anteilen von h α A (~533,3 μ M) und einem Anteil von h α B (~266,7 μ M).

In Abb. 33 sind exemplarisch jeweils die Spektren des reinen h γ D-Kristallins mit dem der Mischung bei einer physiologischen Temperatur von 37°C überlagert. Es ist klar zu erkennen, dass sich weder die Spektren vom Wildtyp h γ D noch von seiner Variante E107A in

Anwesenheit von unterschiedlichen Interaktionspartnern bei 37°C (Abb. 33) oder bei Temperaturen von 20°C und 43,5°C (Spektren nicht gezeigt) nennenswert, z.B. durch Verschiebungen und/oder starke Intensitätsabnahmen unterschiedlicher Kreuzsignale unterscheiden. Zusätzlich wurden bei Testmessungen in Anwesenheit von h α B bei Temperaturen von bis zu 54°C durchgeführt (Spektren nicht gezeigt), wobei sich ebenfalls die Spektren zwischen reiner Wildtyp bzw. Variante Lösung und der Mischung mit h α B nicht deutlich unterscheiden.

Die einzigen minimalen Unterschiede in den Spektren der Wildtyp hyD-Kristalline und seiner Variante E107A in Anwesenheit der Interaktionspartnern sind leichte Intensitätsänderungen (Abb. 33 (a) - (f)) und insbesondere in den NMR-Proben in Anwesenheit von h α B (Abb. 33 (a) & (d)) geringe chemische Verschiebungen einiger Kreuzsignale. Diese Verschiebungen sind aber sehr wahrscheinlich ein reiner Lösungsmitteleffekt (siehe Anhang 9.2.2).



Abb. 33: ${}^{1}H^{15}N$ TROSY-HSQC Spektren von 100 μ M Wildtyp h γ D-Kristallin (in (a) - (c)) oder 100 μ M der E107A Variante (in (d) - (f)) i.V. zu unterschiedlichen Beimischungen bei 37°C. In Schwarz: 100 μ M h γ D-Kristallin; in Blau: 100 μ M h γ D & 800 μ M h α B; in Grün: 100 μ M h γ D & 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat; in Rot: 100 μ M h γ D & 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat & 800 μ M h α -Kristallin.

Die Auswertung der relativen Intensitätsänderungen I_{mix}/I_{γ} einzelner Kreuzsignale bei gleichen Temperaturen gestaltet sich aufgrund des geringen "Signal to Noise" Verhältnisses S/N, teilweisen Proteinausfalls der Proben während der Messung und nicht immer gleichen Messbedingungen als schwierig. Daher wurde I_{mix}/I_{γ} auf den Mittelwert der relativen Intensitäten bei der jeweiligen Temperatur normiert.

Die relativen Intensitätsänderungen bei 37°C von Wildtyp hyD und der Variante E107A in Anwesenheit von unterschiedlichen Interaktionspartnern wurden in Abb. 34 dargestellt. Die Auswertungen bei 20°C bzw. 43,5°C befinden sich im Anhang (Abb. 68 bzw. Abb. 69). Es sind für alle Temperaturen keine eindeutigen Änderungen bzgl. bestimmter einzelner wiederkehrender Aminosäuren oder Regionen des Proteins, die mit dem Interaktionspartner interagieren, identifizierbar. Es wurden jeweils nur Aminosäuren in Betracht gezogen, die eine signifikante Änderung (Definition siehe Kapitel 3.6) der Intensitäten in An- bzw. Abwesenheit der Interaktionspartner aufweisen und diese auf die Struktur von hyD übertragen (Abb. 35). Auch hier ist kein klares Muster erkennbar. Generell sprechen bei allen Temperaturen, unterschiedlichen hyD-Kristallinen und Interaktionspartnern hauptsächlich verschiedene Aminosäuren an, die sich an der Oberfläche des Proteins befinden. Einige Messungen von Wildtyp hyD erwecken den Eindruck, als ob hauptsächlich die C-terminale Domäne betroffen wären (Abb. 35: hyD + h α B @ 20°C; hyD + hlens @ 37°C und $h\gamma D$ + hlens + $h\alpha$ -Kristallin @ 37°C und 43,5°C), während bei anderen Messungen die Aminosäuren am Interface zwischen den beiden Domänen ansprechen (Abb. 35: $h\gamma D$ + hlens + $h\alpha$ -Kristallin @ 20°C; $h\gamma D$ + hlens @ 43,5°C). Bei der Variante E107A sind die betroffenen Aminosäuren gleichmäßiger über die gesamte Struktur verteilt, wobei bei einigen Messungen eher die N-terminale Domäne betroffen zu sein scheint (Abb. 35: E107A + hlens @ 20°C und E107A + hlens + hα-Kristallin @ 20°C; E107A + hlens @ 43,5°C und E107A + hlens + h α -Kristallin @ 43.5°C).

Eine Liste mit allen betroffenen Aminosäuren, die eine relative Intensitätsänderung in Anwesenheit von unterschiedlichen Interaktionspartnern bei verschiedenen Temperaturen zeigen, ist in Tabelle 19 zu finden.

Insgesamt zeigen sowohl beim Wildtyp h γ D-Kristallin als auch bei seiner Variante E107A die Amidprotonen von Aminosäuren mit zur Oberfläche zeigenden Seitenketten leichte Intensitätsänderungen in Anwesenheit von unterschiedlichen Interaktionspartnern. Eine Systematik ist dabei nicht zu erkennen. Dies deutet auf eine nur sehr schwache Wechselwirkung zwischen den h γ D-Kristallinen mit sowohl den Chaperonen h α A und h α B als auch der gesamten Kristallinmischung aus humanen Linsen bei den hier verwendeten Proteinkonzentrationen hin.



Abb. 34: relative, normierte Intensitätsänderung der Kreuzsignale bei 37°C von 100µM Wildtyp hyD-Kristallin (in (a) - (c)) oder der Variante 100µM E107A (in (d) - (f)) i.V. zu unterschiedlichen Mischungen. Gezeigt sind die auf den Mittelwert normierten relativen Intensitäten der Mischungen in Anwesenheit von hyD-Kristallin relativ zur Intensität des hyD-Kristallins. Der experimentelle Fehler wurde durch das Rauschen bestimmt und durch die Fehlerbalken dargestellt. Grenzen wurden für $I_{mix}/I_{hyD-Kristallin} \ge 1,33$ (grün), $\le 0,75$ (orange) bzw. $\le 0,5$ (rot) gesetzt. (a) & (d): 100µM hyD-Kristallin + 800µM h α B; (b) & (e): 100µM hyD-Kristallin + 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat; (c) & (f): 100µM hyD-Kristallin + 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat + 800µM α -Kristallin.



Abb. 35: Aminosäuren an der Oberfläche von Wildtyp hyD-Kristallin und seiner Variante E107A (2klj), deren relative Intensitäten, gemittelt auf den Mittelwert, sich in Anwesenheit von unterschiedlichen Interaktionspartnern signifikant unterscheiden. Mit den Grenzen $I_{mix}/I_{hyD-Kristallin} \ge 1,33$ in Grün, $\le 0,75$ in Orange und $\le 0,5$ in Rot. (a) relative Intensitätsänderungen bei 20°C, (b) relative Intensitätsänderungen bei 37°C und (c) relative Intensitätsänderungen bei 43,5°C.

4.4. Einfluss von UV-B Strahlung auf Aggregationsanfälligkeit und Fluoreszenz von hγD-Kristallin und seinen Varianten

Im Laufe eines Lebens sind die Kristalline der Augenlinse der UV-Strahlung der Sonne ausgesetzt. Da verschiedene Studien einen eindeutigen Zusammenhang zwischen UV-Strahlung und altersbedingten Katarakt gezeigt haben, wurde der Einfluss von UV-B Strahlung auf die biophysikalischen Eigenschaften des Wildtyps hyD-Kristallin und seinen Varianten untersucht. Dazu wurden die hyD-Kristalline bei einer Wellenlänge von λ_{max} = J/cm² Bestrahlungsstärke von 100 bestrahlt 310nm und einer und deren Aggregationsanfälligkeit, Fluoreszenzverhalten und Änderungen einzelner Aminosäuren auf atomarer Ebene im unbestrahlten und bestrahlten Zustand gegenübergestellt. Bei den untersuchten h γ D-Kristallinen handelt es sich um den Wildtyp h γ D und seinen Varianten E107A, W43R, W69A, W131A, W157A, Y17A, Y29A, Y17AY29A, Ntd und Ctd.

4.4.1. Aggregationsanfälligkeit

Die Stabilität von Wildtyp $h\gamma D$ und seinen unterschiedlichen Varianten E107A, Ntd, Ctd, W43R, W69A, W131A und W157A wurden über einen längeren Zeitraum im unbestrahltem Zustand und nach UV-B Bestrahlung NMR-spektroskopisch mittels $1D^{1}H$ Spektren beobachtet. Alle Spektren wurden in den Bereichen zwischen -0,8 und 1,08 ppm integriert. Die so erhaltene Signalintensitäten wurden alle 10 min über 24 Stunden bei 25°C verfolgt (Abb. 36) und ermöglichen z.B. die Korrelation des Intensitätsabfalls über die Zeit mit der Menge an löslichem Protein in der NMR Probe. Die Totzeit zwischen Bestrahlung und Start der Messung beträgt dabei 20 bis 30 min. Aufgrund unterschiedlicher experimenteller Herausforderungen, wie Temperaturdrift in der NMR-Halle oder Luftblasenentwicklung innerhalb der Probe während der Messung, die direkten Einfluss auf die gemessene Signalstärke haben, ist es bei einem Großteil der gemessenen Kurven schwierig, eine quantitative Aussage zu treffen. In Abb. 36 ist der Intensitätsverlauf von drei Proteinen gezeigt, um den generellen Trend zu verdeutlichen.

Die Auswertung des Intensitätsverlaufs von $h\gamma D$ über 24 Stunden ergibt ein eher diffuses Ergebnis (Abb. 36 (a)) und eignet sich nur bedingt zur quantitativen Auswertung der Konzentrationsänderungen unter unterschiedlichen Bedingungen ($h\gamma D_{lyophilisiert}$; Tabelle 16). Die Aggregationsstudien der Varianten W157A und Ctd (Abb. 36 (b)) verdeutlichen den generellen Trend der gemessenen Varianten. Prinzipiell sind alle Proben bis auf die W131A Variante im unbestrahlten Zustand über einen Zeitraum von 24h stabil. Nach der UV-B Bestrahlung weisen alle Varianten insbesondere in den ersten ein bis zwei Stunden einen unterschiedlich stark ausgeprägten Intensitätsverlust auf, wobei die Intensität in der verbleibenden Zeit kaum noch abnimmt. Dabei ist bereits ein Großteil des aggregierten Anteils direkt nach der Bestrahlung ausgefallen, wobei der Anteil des Proteins, welches während der Bestrahlung und unmittelbar danach in Lösung bleibt für einen längeren Zeitraum nicht zur Aggregation neigt.



Abb. 36: Intensitätsverlauf der NMR-Proben über 24h bei 25°C vor und nach UV-B Bestrahlung. (a) Wildtyp hγD-Kristallin. (b) Varianten W157A und C-terminale Domäne.

Trotz der Messschwierigkeiten wurde versucht mit Hilfe der NMR-Messungen und davon unabhängigen Konzentrationsbestimmungen über UV/VIS-Spektroskopie eine Abschätzung über die Stabilität bzgl. Aggregation der einzelnen Varianten zu machen. Die bestimmten Werte aus den NMR-Messungen sind dabei stark fehlerbelastet. Eine Übersicht über die relativen Konzentrationsveränderungen in Prozent direkt nach der Bestrahlung und 24h später (NMR), falls auswertbar, bzw. zu einem späteren Zeitpunkt (UV/VIS) liefert Tabelle 16. Dabei wurden für die NMR-Messungen die Fehler aus den Standardabweichungen des Mittelwertes von fünf Intensitäten zu Anfang und zu Ende der Messung mit Gaußscher Fehlerfortpflanzung bestimmt. Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie wurde die Konzentration jeweils nur einfach gemessen. Der Fehler kann dabei auf max. ±5% abgeschätzt werden.

Protein	Nativ_NMR	Nativ_UV/VIS	t=0h_NMR	t=24h_NMR	Langzeitstabilität_UV/VIS	UV-B_NMR
	t _{24h} /t _{0h}	t _{Langzei} /t _{0h}	C _{UV} /C _{nativ}	C _{UV} /C _{nativ}	C _{UV} /C _{nativ}	t _{24h} /t _{0h}
hγD _{lyophylisiert}	111±3	99	96±14	70±3	75	81±14
h.D		06			00	
Πγυ		90			00	
E107A	98±14	95			90	
W43R	97±1	79	53±16	37±0,3	59	67±16
W69A	109±4	97	77±10	45±2	67	64±9
W131A	91±3	65		67±3	68	
W157A	101±1	94	68±2	54±2	57	80±2
Ntd		68		65±2	95	73±2
Ctd	98±5	89	90±1	75±0,2	70	82±1
Y17A		99			88	
Y29A		87			71	
Y17AY29A		74			92	

Tabelle 16: Konzentrationsverhältnisse einzelner Varianten nach unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. vor und nach UV-B Bestrahlung in %. In Grün: >85% & in Rot: <75%

Aus den Daten können unterschiedliche Abschätzungen gemacht werden. Die Daten ergeben, dass das zuerst lyophilisierte und danach wieder gelöste hyD im Gegensatz zum nicht lyophilisierten hyD anfälliger gegenüber UV-B Strahlung ist. Dabei beträgt der UVinduzierte Verlust des nicht lyophilisierten Wildtyps ~ 10% und des lyophilisierten Wildtyps ~ 25%. Hingegen sind beide Proben über 24h bzw. Monate im unbestrahlten Zustand stabil. Die Variante E107A ist insgesamt innerhalb der Fehler genauso stabil wie der Wildtyp. Nach Bestrahlung beträgt die Konzentration immer noch etwa 90% i.V. zum unbestrahlten Zustand. Die Tryptophanvarianten sind im Gegensatz zu den restlichen Varianten und dem Wildtyp mit einem Verlust von ~ 30 - 50% i.V. zum nicht bestrahlten Zustand sehr anfällig gegenüber UV-B Bestrahlung. Je nach Dauer der Lagerung neigt insbesondere W131A bereits im unbestrahlten Zustand zu Aggregationen. Abhängig von der Messmethode ergeben sich für die Einzeldomänen teilweise unterschiedliche Ergebnisse. Die N-terminale Domäne ist sowohl im unbestrahlten als auch im bestrahlten Zustand i.V. zur C-terminalen Domäne instabiler. Die C-terminale Domäne besitzt in etwa die gleiche Stabilität wie der Wildtyp. Für die Tyrosinvarianten wurden keine 1D NMR Messungen aufgenommen. Insgesamt zeigen sie aber, durch die Konzentrationsbestimmung mit UV/VIS-Spektroskopie bestimmte, ähnliche Langzeitstabilität wie der Wildtyp.

4.4.2. Fluoreszenz

Die Absorption von UV-B Strahlung durch die γ -Kristalline und insbesondere deren Energieabgabe durch unterschiedliche Quenching-Prozesse innerhalb der Kristalline spielen eine entscheidende Rolle bei dem Schutz der Retina vor Sonneneinstrahlung.

In den folgenden Experimenten wurde das Fluoreszenzverhalten von Wildtyp h γ D und seiner unterschiedlichen Varianten im umbestrahlten Zustand und nach UV-B Bestrahlung betrachtet. Dabei wurde die Konzentration der Proben parallel zur Fluoreszenzmessung mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie bestimmt und deren Fluoreszenzintensität jeweils auf eine Konzentration von 120µM Protein normiert. Bei Messungen an unterschiedlichen Tagen wurde jeweils der Wildtyp h γ D als interne Referenz gemessen und die Messungen als Insert eingefügt.

Das Fluoreszenzverhalten im unbestrahlten Zustand der unterschiedlichen Varianten unterscheidet sich teilweise stark vom Wildtyp. Die Variante E107A zeigt einen beinahe identischen Fluoreszenzverlauf (Abb. 37 (a)) i.V. zum Wildtyp, während die Intensitäten der Varianten Y17A und Y29A leicht erhöht sind (Abb. 37(b)). Bei der doppelten Punktmutation Y17AY29A ist hingegen die Intensität um etwa 50% reduziert. Dabei ist die Fluoreszenzmessung von Y17AY29A aufgrund von Messschwierigkeiten nur bedingt aussagekräftig (Abb. 37 (b); Insert). Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenzintensität der Einzeldomänen Ntd und Ctd, in Übereinstimmung mit der reduzierten Anzahl an Chromophoren um etwa 50% reduziert (Abb. 38 (a)), während die Tryptophanvarianten unterschiedliche Tendenzen aufweisen. Die Punktmutationen der als Donoren postulierten Tryptophane W43 und W131 weisen eine geringere Fluoreszenzintensität als der Wildtyp auf. Dabei entspricht die Intensität der Variante W43R etwa 60% und der Variante W131A etwa 86% von dem Wildtyp. Die Punktmutationen der als Akzeptoren postulierten Tryptophane W69 und W157 haben hingegen eine erhöhte Fluoreszenzintensität. Die Intensität der Variante W69A entspricht etwa 150% und die der Variante W157A etwa 170%

vom Wildtyp (Abb. 38 (b)). Das Emissionsmaxima liegt bei allen Varianten und dem Wildtyp zwischen 325 und 326 nm, wobei die Maxima der Einzeldomänen leicht verschoben sind.



Abb. 37: Fluoreszenzverhalten von Wildtyp hyD-Kristallin und unterschiedlicher Varianten bei λ_{ex} =300nm im unbestrahlten Zustand (durchgezogene Linie) und nach UV-B Bestrahlung (gestrichelte Linie). (a) hyD, W43R & E107A. (b) hyD, Y17A, Y29A und Insert mit separat gemessenen hyD & Y17AY29A.

Nach der UV-B Bestrahlung bleibt das Fluoreszenzverhalten vieler Varianten i.V. zur unbestrahlten Probe beinahe identisch. Geringe Unterschiede bestehen bei den Varianten E107A, Ntd, und den Trpytophanvarianten. Das Emissionsmaximum der bestrahlten Variante E107A hat eine leichte Rotverschiebung um 2,2 nm und eine Fluoreszenzintensität von etwa 94% i.V. zum unbestrahlten Zustand (Abb. 37 (a)). Die Einzeldomäne Ntd weist ein leicht verbreitertes und um 1,4 nm nach rechts verschobenem Maximum mit etwa 114% Intensität i.V. zum unbestrahlten Zustand auf (Abb. 38 (a)). Das Maximum von W131A verschiebt sich um 0,8 nm leicht nach rechts und besitzt etwa 86% der nativen Fluoreszenzintensität des unbestrahlten Zustands. Die weiteren Tryptophanvarianten haben kein verschobenes Intensitätsmaximum, dafür aber i.V. zum unbestrahlten Zustand leicht erhöhte bzw. reduzierte Intensitäten. Diese sind 105% für W43R, 96% für W69A und 92% für W157A (Abb. 38(b)).



Abb. 38: Fluoreszenzverhalten von Wildtyp h γ D-Kristallin und unterschiedlicher Varianten bei λ_{ex} =300nm im unbestrahlten Zustand (durchgezogene Linie) und nach UV-B Bestrahlung (gestrichelte Linie). (a) h γ D, Ntd & Ctd. (b) h γ D, W43R, W69A, W131A, W157A und Insert mit separat gemessenen h γ D & W43R.
Zusammengefasst zeigen die Aggregations- und Fluoreszenzmessungen für den Wildtyp $h\gamma D$ und seiner pathogenen Variante E107A ein ähnliches Verhalten: Einen UV-induzierten Proteinverlust von ~10% und eine geringe Abnahme der Fluoreszenz Intensität nach Bestrahlung, wobei das Emissionsmaximum von E107A leicht rot verschoben ist. Die pathogene Variante W43R ist im Gegensatz zum Wildtyp stark anfällig gegenüber UV-induzierter Aggregation und hat im unbestrahlten Zustand eine i.V. zum Wildtyp große verringerte Fluoreszenzintensität. Das Fluoreszenzverhalten verändert sich dabei vor und nach Bestrahlung nicht.

4.5. Einfluss von UV-B Strahlung auf Wildtyp hγD-Kristallin auf atomarer Ebene

Um den Einfluss von UV-B Strahlung auf das hyD-Kristallin auf atomarer Ebene zu untersuchen, wurde dieses ¹⁵N¹³C isotopenmarkiert und jeweils im unbestrahlten Zustand und nach UV-Bestrahlung mit λ_{max} = 310nm und einer Bestrahlungsstärke von 100 J/cm² anhand von unterschiedlichen NMR-spektroskopischen Methoden untersucht. Mit ¹H¹⁵N Korrelationsspektren können Veränderungen Rückarat. TROSY-HSQC im des Wasserstoffbrückennetzwerkes und der Tertiärstruktur des Proteins detektiert werden. Änderungen in den aromatischen Ringsysten der aromatischen Aminosäuren von hyD können mit aromatischen ¹H¹³C HSQC Korrelationsspektren nachverfolgt werden. Mit Hilfe der beschriebenen Experimente kann nur der lösliche Anteil der Probe beobachtet werden, da der ausgefallene Teil aufgrund seiner Größe eine zu kurze Relaxationszeit, die zu einer starken Linienverbreitung und somit zum Verschwinden des detektierbaren Signals führt, hat. Veränderungen des aggregierten Proteins wurden in der Literatur im Gegensatz zu Veränderungen im löslichen Anteil des Proteins schon hinreichend diskutiert [97, 100, 125, 127-129, 132] und sind kein Bestandteil dieser Dissertation.

4.5.1. Unveränderte Amidsignale des Proteins

Beim Vergleich der übereinander gelegten ${}^{1}H^{15}N$ TROSY-HSQC Spektren vom unbestrahlten und UV-B bestrahlten Wildtyp hyD (Abb. 39 (a)) sind auf den ersten Blick keine Unterschiede in Form von chemischer Verschiebungen oder Intensitätsänderungen einzelner Kreuzsignale sichtbar. Dies wird bei der Auswertung der relativen Intensitätsänderungen der Amidgruppen des Rückgrades und der Seitenketten von UV-B bestrahlt zu unbestrahlt bestätigt (Abb. 39(b)). Es gibt weder Cluster von mehreren noch einzelne Aminosäure deren Kreuzsignalintensitäten sich durch die UV-B Bestrahlung signifikant (Definition siehe Kapitel 3.6) verändert haben. Die Bestrahlung hat also keine detektierbaren Veränderungen an dem Rückgrat und den Gln/Asn Seitenketten des löslichen Anteils von hyD hervorgerufen.



Abb. 39: Intensitätsänderung des Rückgrats von 90 μ M Wildtyp h γ D-Kristallin vor und nach UV-B Bestrahlung. (a) ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von unbestrahltem (blau) und bestrahltem (rot) h γ D. (b) relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderung des Rückgrats. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.

Beim Vergleich der aliphatischen Kreuzsignale (Abb. 40) der unbestrahlten und bestrahlten Probe treten hingegen einige Zusatzsignale nach der UV-B Bestrahlung auf. Dies liefert einen Hinweis auf eine Population von $h\gamma D$, die lokal verändert ist.



Abb. 40: Aliphatische ¹H¹³C HSQC Spektren von unbestrahltem (blau) und bestrahltem (rot) Wildtyp hγD-Kristallin eine Woche nach Bestrahlung.

4.5.2. Veränderungen der aromatischen Ringsystemen nach UV-B Bestrahlung

Beim qualitativen Vergleich der übereinander gelegten aromatischen Spektren vom löslichen Wildtyp hyD im unbestrahlten Zustand und nach UV-B Bestrahlung sind deutliche Unterschiede erkennbar. Es treten drei zusätzliche Kreuzsignale nach der Bestrahlung an den Protonen-Kohlenstoffpositionen Y ϵ^* , Y δ^* und H ϵ_1 der aromatischen Ringsysteme auf. Gleichzeitig verschieben sich auf den ersten Blick weder Kreuzsignale i.V. zur unbestrahlten Probe noch ändern sich deren Intensitäten (Abb. 41). Dies deutet auf zwei Zustände innerhalb des löslichen Anteils der bestrahlten Probe hin. Ein Zustand analog zur unbestrahlten, nativen Probe und ein Zustand B.



Abb. 41: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 90µM Wildtyp h_YD-Kristallin vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot). Mit Zusatzsignalen nach der Bestrahlung in den Positionen Y ϵ^* , Y δ^* und H ϵ_1 .

4.5.2.1. Charakterisierung von UV-B Zustand B

Intaktes Ringsystem

Die bestrahlte Probe weist bis auf die drei extra Signale keine weiteren Veränderungen in ihrem aromatischen Spektrum i.V. zum unbestrahlten Zustand auf (Abb. 41). Dies bedeutet, dass die Ringsysteme von Zustand B immer noch intakt sind, da ein Aufbruch des aromatischen Ringes zu einem kompletten Verlust bzw. großer chemischen Verschiebungen von einzelnen Protonen-Kohlenstoffpositionen innerhalb des Spektrums führen würde.

Intensitätsveränderungen der Kreuzsignale liefern keine Rückschlüsse auf die Population von Zustand B

Die quantitative Auswertung der Intensitäten aus den NMR-Spektren von h γ D im unbestrahlten und bestrahlten Zustand aus Abb. 41 bestätigen den qualitativen Eindruck. Für die Kohlenstoffpositionen Y δ^* und Y ϵ^* der zugeordneten Tyrosine ergeben sich so gut wie keine Änderungen der Intensitäten (Abb. 42 (a) & Tabelle 20 & Tabelle 21). Es sind also keine Rückschlüsse auf die betreffenden Tyrosine, die für die starken Extrasignale nach der UV-Bestrahlung verantwortlich sind, machbar. Die relativen Intensitätsänderungen der Trytptophane bilden kein einheitliches Bild (Abb. 42(b)). Teilweise nehmen die Intensitäten wie z.B. für W131 und 157 an der Kohlenstoffposition W ϵ_3 nach der Bestrahlung ab, während sie für die gleichen Aminosäuren an den Positionen W δ_1 , W η_2 , W ζ_2 unverändert bzw.

teilweise erhöht sind. Aufgrund der relativ großen Fehler, die aus dem Signal zu Rausch Verhältnis entstehen, sind die Datensätze für die Tryptophane und Phenylalanine (Abb. 42c)) nur bedingt aussagekräftig.



Abb. 42: Relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderungen von Wildtyp hγD-Kristallin vor und nach UV-B Bestrahlung der einzelnen Kohlenstoffpositionen der aromatischen Aminosäuren. (a) Tyrosine. (b) Tryptophane. (c) Phenylalanine. Kreuzsignale, die mehrere Aminosäuren unter einem Peak haben sind mit "&" gekennzeichnet. Kreuzsignale, die entweder der Aminosäure X oder Y zugeordnet wurden sind, sind mit "," markiert. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.

Stabilität des Zustands B über die Zeit

Bei Kontrollmessungen über die Zeit in einem Zeitraum von bis zu 4,5 Monate nach der Bestrahlung bleiben die drei Zusatzsignale der bestrahlten Probe grundsätzlich erhalten, verringern aber ihre Intensität und apparente Linienbreite relativ zu den restlichen Kreuzsignalen des Proteins.



Zeitraum nach UV-B Bestrahlung

Abb. 43: Zeitentwicklung der zusätzlichen Tyrosin Kreuzsignale von Wildtyp hyD-Kristallin nach UV-B **Bestrahlung.** (a) $Y\delta^*$ Position des aromatischen ¹H¹³C constant time HSQC Spektrums. (b) $Y\epsilon^*$ Position des H¹³C constant time HSQC Spektrums. (c) Intensitätsänderung der Zusatzsignale relativ zum aromatischen¹ Mittelwert der jeweiligen Tyr Signale normiert auf den Wert direkt nach der Bestrahlung. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.

In Abb. 43 (a) und (b) ist die zeitliche Entwicklung der durch die UV-B Bestrahlung verursachten Zusatzsignals an den Positionen Y δ^* bzw. Y ϵ^* gezeigt. Es ist zu erkennen, dass zu einem die Intensität im Laufe der Zeit i.V. zur direkt bestrahlten Probe abnimmt und die Peaks schärfer werden. Bei einer quantitativen Auswertung der UV-Signale in Relation zu dem Mittelwert der restlichen Tyrosin Y δ^* bzw. Y ϵ^* Signalen zeigt sich, dass das Zusatzsignal von Y δ^* direkt nach der Bestrahlung eine um den Faktor 1,4, das von Y ϵ^* um den Faktor 2 höhere Intensität aufweist als die restlichen entsprechenden Tyrosin Kreuzsignale (Tabelle 17). Bereits nach einem Monat ist die gemessene Intensität auf ~ 20 -40% des ursprünglichen Wertes gefallen und nähert sich einem Plateau an (Abb. 43(c)). Für das Zusatzsignal des H ε_1 konnte kein Trend erkannt werden, da die experimentellen Fehler, die sich aus dem RMS des Rauschens und der Gaußschen Fehlerfortpflanzung bilden, sehr groß sind. Zusätzlich ist zu beachten, dass sich die Signale des UV-Peaks von Y^{2*} und von Y51 ε * teilweise überlagern und dies die relativen Werte der Auswertung, nicht aber den generellen Trend der Intensitätsentwicklung beeinflusst.

Der Vergleich der Protonen-Linienbreite der Tyrosin-Kreuzsignale über drei Monate erweckt den Eindruck, dass direkt nach der Bestrahlung die Linienbreiten der Zusatzsignale, insbesondere von Y^{δ*} mit einem Wert von 64 Hz, größer als die der restlichen Signalen sind. Die Linienbreite nimmt mit der Zeit ab und ist nach 3 Monaten vergleichbar mit dem der restlichen Y^{δ *} Signalen (Abb. 44(a)). Dieser Effekt ist weniger ausgeprägt auch für die Zusatzsignale von Y ϵ^* und H ϵ_1 vorhanden. Das Zusatzsignal von H ϵ_1 ist mit 53 Hz i.V. zu 30 -40 Hz der restlichen H ϵ_1 Signale erhöht, nimmt aber analog zum Zusatzsignal von Y ϵ^* einen Monat nach der Bestrahlung Werte vergleichbar mit den "regulären Signalen" an (Abb. 44(b)). Die Kreuzsignale der UV-induzierten Zusatzsignale erwecken dabei den Eindruck, als ob sie direkt nach der Bestrahlung aus einer Summe aus jeweils zwei, sich überlagernden, NMR-spektroskopisch nicht unterscheidbaren Signalen bestehen, deren rechten Anteil mit der Zeit abnimmt (Abb. 43). Diese Zusatzsignale können von UV-induzierten, mit NMR nicht unterscheidbaren Zuständen B und B* erzeugt werden.



Abb. 44: Zeitenwicklung der ¹H-Linienbreite der zusätzlichen Tyrosin Signale von Wildtyp hyD-Kristallin nach UV-B Bestrahlung. (a) Y δ^* . (b) Y ϵ^* . Die Mittelwerte und deren experimentelle Fehler wurden aus den jeweiligen restlichen Tyr Signalen der entsprechenden Spektren der unbestrahlten bzw. bestrahlten Probe gebildet.

4.5.2.2. Identifizierung betroffener Aminosäuren

Durch die klassische Herangehensweise über den Vergleich der Intensitäts- bzw. Positionsänderungen der zugeordneten Kreuzsignale innerhalb der aromatischen Ringsysteme im unbestrahlten bzw. bestrahlten Zustand konnten keine Rückschlüsse auf die betreffenden aromatischen Aminosäuren, die die drei extra Kreuzsignale nach der Bestrahlung verursachen, gezogen werden. Einzig die Art der Aminosäuren und deren Positionen innerhalb der Ringsysteme, nämlich Y ϵ^* , Y δ^* und H ϵ_1 , ist bekannt.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung der Aminosäuren besteht durch die Herstellung von unterschiedlich isotopenmarkierten Varianten, bei denen jeweils eine oder mehrere aromatische Aminosäuren durch z.B. ein Alanin ersetzt wurden. Durch den Vergleich der unbestrahlten und UV-B bestrahlten Spektren der einzelnen Varianten können Rückschlüsse auf die betroffenen Aminosäuren des Wildtyps gezogen werden.

Ein erster Schritt zur Reduzierung der insg. 14 möglichen Tyrosinen und 6 möglichen Histidinen besteht durch die Betrachtung der Einzeldomänen Ntd bzw. Ctd. In Abb. 45 sind die Spektren der jeweiligen Domänen in den Positionen von Y δ^* (a) und Y ϵ^* (b) im Vergleich zum Wildtyp im unbestrahlten Zustand und nach UV-B Bestrahlung gezeigt. Die jeweiligen vollständigen Spektren sind im Anhang (Abb. 92 & Abb. 93) zu finden. Die N-terminale Domäne hat im bestrahlten Zustand i.V. zum unbestrahlten Zustand zwei extra Kreuzsignale an der Y ϵ^* und insbesondere an der Y δ^* Position. Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum

der C-terminalen Domäne keine Veränderungen vor und nach UV-B Bestrahlung auf. Daher folgt, dass sich die Tyrosine, die die zusätzlichen Kreuzsignale nach der Bestrahlung hervorrufen, in der N-terminalen Domäne befinden müssen. Dies reduziert die Anzahl der möglichen Kandidaten von 14 auf 7. Für die Histidine kann keine Aussage getroffen werden, da bei allen Varianten bis auf den Wildtyp und der Variante E107A der His-Tag nicht abgespalten wurden ist und deren zusätzliche Signale mit den Histidin Kreuzsignalen des Proteins interferieren.



Abb. 45: Ausschnitt aus aromatischen ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren der Tyrosin-Kohlenstoffpositionen von Wildtyp hyD-Kristallin und deren Einzeldomänen Ntd und Ctd vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot). (a) $Y\delta^{*}$ (b) $Y\epsilon^{*}$

Um die Anzahl der möglichen Tyrosine weiter einzuschränken, wurde eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt. In einem Artikel von *Jonathan King et al.* [100] wurden durch Analyse von Massendaten oxidierte Zustände der Aminosäuren Y17 und C19 nach UV-B Bestrahlung i.V. zum unbestrahlten Zustand identifiziert. Zusätzlich sind Y17 und Y29 als einzige Tyrosine an der Oberfläche im nativen Zustand gestapelt und dadurch in ihrer Beweglichkeit im nativen Zustand eingeschränkt (Abb. 46). Das Ergebnis von *King et al.* konnte durch Massendatenanalyse von Wildtyp h γ D, durchgeführt von Dr. Christian Ihling aus der Arbeitsgruppe von Prof. Sinz (MLU Halle), weder bestätigt noch widerlegt werden, da sowohl in der unbestrahlten als auch in der bestrahlten Proben u.a. Oxidationsprodukte von Y17 und C19 gefunden wurden.



Abb. 46: Ausschnitt von Wildtyp hγD-Kristallin (pdb 2klj) mit H16, His23, C19 und gestapeltem Y17 & Y29 und deren unterschiedlichen Protonen-Kohlenstoff Positionen.

Zur weiteren Identifizierung der betroffenen Aminosäuren wurden Punktmutationen von Y17 bzw. Y29 von $h\gamma D$, in denen jeweils ein bzw. zwei Tyrosine mit einem Alanin ersetzt wurden, durchgeführt. Diese Konstrukte wurden doppelt markiert und die aromatischen Spektren im unbestrahlten bzw. bestrahlten Zustand miteinander verglichen.



Abb. 47: Ausschnitt aus aromatischen ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren der Tyrosin-Kohlenstoffpositionen von Wildtyp hyD-Kristallin und deren Varianten Y17A, Y29A und Y17AY29A vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot). (a) Y δ^{*} (b) Y ϵ^{*}

In Abb. 47 sind jeweils die Positionen, an denen die extra Kreuzsignale nach der Bestrahlung auftreten für den Wildtyp hyD und seinen Varianten Y17A, Y29A und Y17AY29A dargestellt. Die kompletten aromatischen ¹H¹³C HSQC Spektren im unbestrahlten bzw. bestrahlten Zustand sind im Anhang zu finden (Abb. 94 - Abb. 96). Beim Vergleich der Kohlenstoffpositionen Y^{δ*} vom Wildtyp mit den unterschiedlichen Tyrosinvarianten treten unterschiedliche Effekte auf (Abb. 47(a)). Y17A zeigt keinen Unterschied zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zustand, hat aber bereits im unbestrahlten Zustand ein zusätzliches bzw. verschobenes Kreuzsignal i.V. zum Wildtyp, dass sich an fast identischer Stelle wie das Zusatzsignal nach UV-B Bestrahlung vom Wildtyp befindet. Y29A weist erst nach der Bestrahlung ein Zusatzsignal analog zum Wildtyp auf, während die Variante Y17AY29A, bei der beide Tyrosine durch jeweils ein Alanin ersetzt wurden sind, weder im unbestrahlten noch im bestrahlten Zustand ein zusätzliches Signal aufweist. Die Kohlenstoffpositionen Ye* (Abb. 47(b)) liefert tendenziell ähnliche, aber nicht so stark ausgeprägte Ergebnisse wie die Kohlenstoffpositionen Yô*. Y17A zeigt keinen Unterschied zwischen unbestrahlter und bestrahlter Probe. Y29A weist nach Bestrahlung ein Zusatzsignal analog zum Wildtyp auf, während Y17AY29A nur minimale Änderungen zeigt, die innerhalb des Rauschens liegen. Durch das Fehlen der zusätzlichen Kreuzsignale der Variante Y17AY29A nach Bestrahlung können die Y17 und Y29 als die betroffenen Tyrosine identifiziert werden. Dabei haben die Kreuzsignale der Aminosäure Y29 bei fehlendem Stackingpartner Y17 (Variante Y17A) bereits im unbestrahlten Zustand die fast identischen Protonen-Kohlenstoffpositionen wie die UV-induzierten Zusatzsignale des Wildtyps. Somit kann die Variante Y17A als UV-mimikende Variante postuliert werden, während die Aminosäure Y17 bei fehlendem Stackingpartner Y29 (Variante Y29A) erst nach Bestrahlung Zusatzsignale analog zum Wildtyp aufweist.

4.5.3. Wildtyp $h\gamma D$ -Kristallin in Mischung der Kristalline aus humaner Augenlinse

Des weiterem wurde der mögliche Schutz vor UV-B Strahlung der Linsenhomogenate, bestehend aus allen Linsenkristallinen, untersucht. Dabei kann deren Einfluss auf das ¹⁵N¹³C h γ D-Kristallin gezielt mit NMR beobachtet werden, weil nur dieses Protein isotopen markiert ist. Das rekombinant exprimierte und isotopenmarkierte h γ D wurde in eine Kristallinmischung aus pathogenen, an Katarakt erkrankten Linsen gegeben. Diese Mischung hat zwar einen geringeren Anteil an α -Kristallin i.V. zu einer gesunden Linse, besitzt aber noch einen Großteil der β - und γ -Kristalline (Abb. 27).

Beim Vergleich der übereinander gelegten ${}^{1}H^{15}N$ TROSY-HSQC Spektren vom unbestrahlten und UV-B bestrahlten Wildtyp $h\gamma D$ in Anwesenheit der humanen Linsenkristallinmischung (Abb. 48(a)) sind, genau wie der reinen Wildtyp $h\gamma D$ Lösung, weder qualitativ (Abb. 48(a)) noch quantitativ (Abb. 48(b)) größere Unterschiede in den Positionen und Intensitäten der einzelnen Kreuzsignalen der Rückgradamide und der Asn/Gln Seitenketten identifizierbar. Lediglich die Aminosäuren M1 und Y98 weisen eine UV induzierte Intensitätsveränderungen ihres Kreuzsignales auf. Dabei können diese für die Aminosäure Y98 aufgrund von Problemen durch Signalüberlagerungen unterschiedlicher Kreuzsignale zu Stande kommen, während für die Aminosäure M1 keine Erklärung bekannt ist. Da sich M1 aber direkt am N-terminus befindet und keine für die Struktur von $h\gamma D$ wichtige Aminosäure darstellt, ist die Intensitätsveränderung von keiner Relevanz.

Der qualitative Vergleich der übereinander gelegten aromatischen Spektren vom löslichen $h\gamma D$ in Anwesenheit der Linsenkristallinmischung im unbestrahlten Zustand und nach UV-B Bestrahlung erweckt den Eindruck, als ob die zusätzlichen Y ϵ^* und Y δ^* Signale i.V. zum reinen Wildtyp deutlich schwächer ausgeprägt bzw. nicht vorhanden sind oder im Rauschen liegen (Abb. 49).



Abb. 48: Intensitätsänderung des Rückgrats von 250 μ M Wildtyp h γ D-Kristallin in ~15 mg/ml humaner, an Katarakt erkrankter Linsenkristallinmischung vor und nach UV-B Bestrahlung. (a) ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von unbestrahltem (blau) und bestrahltem (rot) h γ D. (b) relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderung des Rückgrats. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.



Abb. 49: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 250 µM Wildtyp hyD-Kristallin in ~15 mg/ml humaner, an Katarakt erkrankter Linsenkristallinmischung vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot). Die zu erwartenden Zusatzsignale nach der Bestrahlung in den Positionen Y ϵ^* , Y δ^* und H ϵ 1 sind mit Pfeilen dargestellt.

Eine quantitative Auswertung der Zusatzsignale in Relation zum Mittelwert der jeweils verbleibenden Tyrosin-Signalen ergibt, dass das zusätzlich auftretende Y ϵ^* Signal, welches im Spektrum vom unbestrahlten Y51 ϵ^* Signal überlagert wird, genauso groß wie die restlichen Y ϵ^* Signale ist. Die Intensität des zusätzlichen Y δ^* Peaks entspricht etwa den 40% der restlichen Y δ^* Signale und das von H ϵ_1 etwa 70% (Tabelle 17). Dabei wurden die Positionen der zusätzlichen Kreuzsignale im Spektrum analog zu den Positionen vom reinen Wildtyp nach UV-B Bestrahlung gewählt. Diese Auswertung zeigt, dass die Linsenkristallinmischung nur einen begrenzten Schutz vor Veränderungen im h γ D durch die hier angewendete UV-B Strahlung liefert.

Analog zum reinen Wildtyp h γ D wurde auch für den Wildtyp in Anwesenheit der humanen Linsenkristallinmischung die relativen Intensitätsänderungen der bestrahlten zur unbestrahlten Probe aus den Kreuzsignalen des aromatischen Spektrums berechnet. Dabei können weder für Tyrosin, Tryptophan noch Phenylalanin einzelne Protonen-Kohlenstoff Positionen der jeweiligen zugeordneten Aminosäuren identifiziert werden, deren Intensität sich aufgrund der Bestrahlung innerhalb des Fehlers eindeutig verändert hat. Lediglich Y51 ϵ^* weist nach der Bestrahlung eine leicht erhöhte Intensität i.V. zur unbestrahlten Proben auf, wobei dies auch durch eine Überlagerung mit dem UV-induzierten Y ϵ^* Zusatzpeak oder sonstigen Messartefakten zu Stande kommen kann (Abb. 50).



Abb. 50: Relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderungen von Wildtyp hγD-Kristallin in humaner, an Katarakt erkrankter Linsenkristallinmischung vor und nach UV-B Bestrahlung der einzelnen Kohlenstoffpositionen der aromatischen Aminosäuren. (a) Tyrosine. (b) Tryptophane. (c) Phenylalanine. Kreuzsignale, die mehrere Aminosäuren unter einem Peak haben sind mit "&" gekennzeichnet. Kreuzsignale, die entweder der Aminosäure X oder Y zugeordnet wurden sind, sind mit "," markiert. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.

Zusammengefasst zeigt das Rückgrat des Wildtyps h γ D-Kristallin keine UV-induzierten Veränderungen, während in dem NMR Spektrum der aromatischen Ringsystemen drei zusätzliche Kreuzsignale an den Positionen von H ϵ_1 , Y ϵ^* und Y δ^* nach Bestrahlung auftreten. Diese werden durch die Tyrosine Y17 und Y29 hervorgerufen und geben einen Hinweis auf einen UV-B induzierten Zustand B, der intakte Ringsysteme der aromatischen Aminosäuren besitzt und über Monate stabil gegenüber Aggregation ist. Durch Hinzugabe einer Kristallinmischung aus pathogenen Linsen zum Wildtyp wird die UV-B induzierte Veränderungen des h γ D verringert.

4.6. Einfluss von UV-B Strahlung auf weitere Varianten auf atomarer Ebene

4.6.1. UV-B Effekt auf W43R hγD

Die vererbbare und im Kindheitsalter Katarakt verursachende Variante W43R wurde NMRspektroskopisch auf Veränderungen bzgl. ihrer atomarer Struktur nach UV-B Bestrahlung untersucht. Diese Variante besitzt unterschiedliche biochemische Eigenschaften i.V. zum Wildtyp. Außerdem ist bei ihr einer der vier Tryptophane, denen eine wichtige Rolle bei der Energiedissipation von UV-Bestrahlung postuliert wird, durch ein Arginin ersetzt.

Der Vergleich der übereinander gelegten ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren der unbestrahlten und UV-B bestrahlten Probe liefert weder qualitativ (Abb. 51 (a)) noch quantitativ (Abb. 51(b)) Hinweise auf eine starke Veränderung des Proteinrückgrats aufgrund der Bestrahlung. Zwar haben einige wenige Kreuzsignale nach der Bestrahlung i.V. zum Wildtyp eine geringere Intensität, bei der Auswertung der Intensitäten weisen davon aber nur zwei Aminosäuren (L45&D74) eine signifikante Änderung auf (Definition siehe Kapitel 3.6).

Das Spektrum der aromatischen Seitenketten des löslichen Anteils der W43R Variante vor und nach UV-B Bestrahlung liefert i.V. zum Wildtyp und der Variante E107A ein unterschiedliches Ergebnis.



Abb. 51: Intensitätsänderung des Rückgrats von 120 μ M W43R vor und nach UV-B Bestrahlung. (a) ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von unbestrahltem (blau) und bestrahltem (rot) h γ D. (b) relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderung des Rückgrats. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.



Abb. 52: Aromatische ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von 120 μ M W43R vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot).

Das Spektrum der aromtischen Seitenketten der bestrahlten Probe hat sich i.V. zur unbestrahlten Probe nicht verändert (Abb. 52). Es treten keine zusätzlichen Signale an den $Y\delta^*$ und $Y\epsilon^*$ Positionen nach der Bestrahlung auf.



Abb. 53: Aromatische ¹H¹³C Constant Time HSQC Spektren der Tyrosin-Kohlenstoffpositionen von hyD Wildtyp und deren Varianten W43R, W69A, W131A und W157A vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot). (a) $Y\delta^*$ (b) $Y\epsilon^*$

Beim Vergleich der entsprechenden Positionen im Spektrum mit dem Wildtyp ist auffallend, dass sich sowohl ein Y δ^* als auch ein Y ϵ^* Kreuzsignal der Variante W43R an der identischen Position wie die zusätzlichen Signale nach der Bestrahlung von h γ D befindet (Abb. 53). Die weiteren Tryptophanvarianten haben nach der Bestrahlung ein zusätzliches Kreuzsignal an der Y δ^* Position, wohingegen an der Y ϵ^* Position kein Unterschied zu sehen ist. Dabei sind aber insbesondere die Spektren der Variante W131A nur bedingt aussagekräftig, da diese bereits im unbestrahlten Zustand sehr instabil ist und die Spektren aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration stark verrauscht sind.

Wie bereits die Auswertungen von Wildtyp $h\gamma D$ liefert auch die relative Intensität der einzelnen Kreuzsignale nach Bestrahlung i.V. zum unbestrahlten Zustand von W43R keinen Hinweis auf besonders betroffene Aminosäuren. Die Intensitäten der Y δ^* und Y ϵ^* Positionen von Y63 sind nach Bestrahlung leicht erhöht, während sich für die restlichen aromatischen Aminosäuren aufgrund des großen experimentellen Fehlers oder der nicht eindeutigen Zuordnung keine Aussagen bzgl. UV-induzierte Veränderungen treffen lassen (Abb. 54).



Abb. 54: Relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderungen von W43R vor und nach UV-B Bestrahlung der einzelnen Kohlenstoffpositionen der aromatischen Aminosäuren. (a) Tyrosine. (b) Tryptophane. (c) Phenylalanine. Kreuzsignale, die mehrere Aminosäuren unter einem Peak haben sind mit "&" gekennzeichnet. Kreuzsignale, die entweder der Aminosäure X oder Y zugeordnet wurden sind, sind mit "," markiert. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.

4.6.2. UV-B Effekt auf E107A hγD

Die vererbbare, pathogene Variante E107A, die die gleichen biochemischen Eigenschaften wie der Wildtyp besitzt, aber Katarakt in jungen Jahren hervorruft, wurde NMR-spektroskopisch auf Veränderungen bzgl. ihrer atomarer Struktur nach UV-B Bestrahlung untersucht



Abb. 55: Intensitätsänderung des Rückgrats von 75 μ M E107A vor und nach UV-B Bestrahlung. (a) ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von unbestrahltem (blau) und bestrahltem (rot) h γ D. (b) relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderung des Rückgrats. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.

Die Position und Intensität der Kreuzsignale des Rückgrats von der unbestrahlten und bestrahlten Probe des ${}^{1}H^{15}N$ TROSY-HSQC Spektrums sind beinahe identisch (Abb. 55). Nur die Aminosäuren D9, R32, S73, Q101, D108, L112, Q113, L145, M149 und I171 weisen eine signifikante Intensitätsveränderung (Definition siehe 3.6) auf. Diese Aminosäuren zeigen in der Struktur von h γ D alle bis auf L112 nach außen. Die Mehrzahl befindet sich in der C-terminalen Domäne, wobei L145, und M147 am Interface zur N-terminalen Domäne liegen.



Abb. 56: Aliphatische 1 H 13 C HSQC Spektren von unbestrahltem (blau) und bestrahltem (rot) 75 μ M E107A 5 Monate nach UV-B Bestrahlung.

Im Gegensatz zu den Amidprotonen, die keinen Hinweis auf eine komplette bzw. teilweise entfaltete Population der bestrahlten E107A Variante liefert, ergibt das aliphatische Spektrum ein anderes Bild (Abb. 56). Nach der Bestrahlung treten zusätzliche Signale an den Random-Coil Positionen in der Methylregion auf. Dies lieferteinen eindeutigen Hinweis auf. eine Population an entfaltetem E107A, die mit dem ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektrum nicht detektiert werden konnte. Zwar wurden die aliphatischen ¹H¹³C HSQC Spektren der unbestrahlten und bestrahlten Probe erst nach 5 Monaten aufgenommen, die zusätzlichen Random-Coil Signale sind dennoch eine direkte Konsequenz der Bestrahlung. Zudem liefern die aromatischen ¹H¹³C HSQC Spektren der bestrahlten und unbestrahlten Probe, welche direkt nach Bestrahlung aufgenommen wurden (Abb. 57), das gleiche Ergebnis: zusätzliche Signale im Random-Coil Bereich nach Bestrahlung.

Die bestrahlte Variante E107A zeigt i.V. zur unbestrahlten Probe, genau wie der Wildtyp, die drei Zusatzsignale für Y δ^* , Y ϵ^* und H ϵ_1 (gefüllte Pfeile). Zusätzlich treten weitere Kreuzsignale für alle aromatischen Aminosäuren auf (gestrichelte Pfeile), deren Kreuzsignale sich in der Nähe von Random-Coil Positionen der Aromaten befinden (Abb. 57). Diese extra Signale werden mit der Zeit schärfer und verschieben sich in Richtung der freien aromatischen Aminosäuren, wie beispielhaft in Abb. 58 für die Tyr gezeigt wird.

Dabei nimmt die Intensität und Linienbreite des Zustands B direkt nach der Bestrahlung i.V. zu einen Monat später ab, während sich ein scharfer Peak an der fast identischen Stelle wie das freie L-Tyrosin ausbildet.



Abb. 57: Aromatische ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von 75 μ M E107A vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot).



Abb. 58: Zeitentwicklung der zusätzlichen Tyrosin Kreuzsignale von E107A nach UV-B Bestrahlung in einem aromatischen ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC i.V. zum Kreuzsignal des freien L-Tyrosins. (a) Y δ^{*} . (b) Y ϵ^{*} .

Die Intensitätsauswertung der aromatischen Kreuzsignale liefert, wie bereits beim Wildtyp, keinen Hinweis auf einzelne Aminosäuren, die die zusätzlichen Signale hervorrufen (Abb. 59). Es ist aber wahrscheinlich, dass die drei intensiven Zusatzsignale analog zum Wildtyp durch die Tyrosine Y17 und Y29 (4.5.2.2) in Population B und B* und die weiteren Zusatzsignale durch eine Population D, die teilweise entfaltet ist, hervorgerufen wird.



Abb. 59: Relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderungen von E107A vor und nach UV-B Bestrahlung der einzelnen Kohlenstoffpositionen der aromatischen Aminosäuren. (a) Tyrosine. (b) Tryptophane. (c) Phenylalanine. Kreuzsignale, die mehrere Aminosäuren unter einem Peak haben sind mit "&" gekennzeichnet. Kreuzsignale, die entweder der Aminosäure X oder Y zugeordnet wurden sind, sind mit "," markiert. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.

Die zeitliche Entwicklung der Y ϵ^* und Y δ^* Extrasignale der Population B und B* wurden durch die Auswertung von deren Intensität und Linienbreite im Verhältnis zum Mittelwert der entsprechenden restlichen Y ϵ^* und Y δ^* Signale aus dem gleichen Spektrum genauer betrachtet.

Dabei ist ersichtlich, dass nach einem bzw. drei Monaten die Intensität der zusätzlichen Signale auf etwa 70% bzw. 40 - 50% ihres ursprünglichen Wertes abnehmen (Abb. 60). Die Anfangsintensitäten der Zusatzsignale sind dabei direkt nach der Bestrahlung um den Faktor vier höher als der Mittelwert der restlichen Tyrosinsignale (Tabelle 17).



Abb. 60: Zeitentwicklung der zusätzlichen Tyrosin Kreuzsignale von E107A nach UV-B Bestrahlung. (a) $Y\delta^*$ Position des aromatischen ¹H¹³C constant time HSQC Spektrums. (b) $Y\epsilon^*$ Position des aromatischen ¹H¹³C constant time HSQC Spektrums. (c) Intensitätsänderung der Zusatzsignale relativ zum Mittelwert der jeweiligen Tyr Signale normiert auf den Wert direkt nach der Bestrahlung. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.

Analog zur Intensität nimmt auch die Protonenlinienbreite der Zusatzsignale mit der Zeit ab.



Abb. 61: Zeitenwicklung der ¹H-Linienbreite der zusätzlichen Tyrosin Signale von E107A nach UV-B Bestrahlung. (a) Y δ^* . (b) Y ϵ^* . Die Mittelwerte und deren experimenteller Fehler wurden aus den jeweiligen restlichen Tyr Signalen der entsprechenden Spektren der unbestrahlten bzw. bestrahlten Probe gebildet.

Die Linienbreite für das Y δ^* Zusatzsignal ist dabei direkt und einen Monat nach der Bestrahlung größer und nach 3 Monaten in etwa genau so groß wie die durchschnittlichen Linienbreiten der restlichen Y δ^* Signale. Die Linienbreite des zusätzlichen Y ϵ^* Signals fällt i.V. zum Y δ^* schneller ab und entspricht schon etwa einen Monat nach Bestrahlung dem der

restlichen Y ϵ^* Signalen bzw. wird nach drei Monaten sogar kleiner (Abb. 61). Für die unbestrahlte Probe von E107A nach drei Monaten liegen keine Messungen des aromatischen Spektrums vor. Somit konnten für diesen Zeitpunkt keine Auswertungen für die Intensität bzw. Linienbreite der unbestrahlten Probe durchgeführt werden.

Zusammengefasst zeigen beide pathogene Varianten W43R und E107A ein i.V. zum Wildtyp $h\gamma D$ unterschiedliches Verhalten bzgl. UV-B Strahlung.

Bei der Variante W43R treten analog zum Wildtyp keine UV-B induzierten Veränderungen des Proteinrückgrates auf. In dem aromatischen ¹H¹³C HSQC sind aber bereits im unbestrahlten Zustand die im Wildtyp UV-B induzierten Zusatzpeaks an den Positionen Y δ^* und Y ϵ^* und H ϵ_1 bei gleichzeitiger Anwesenheit der Kreuzsignale Y17 ϵ^* und Y29 ϵ^* vorhanden. Durch UV-B Bestrahlung findet eine Intensitätserhöhung der UV-B induzierten Zusatzpeaks statt. Der beim Wildtyp beobachteter Zustand B scheint also bei der Variante W43R bereits zu einem geringen Anteil im unbestrahlten Zustand zu existieren. Seine Population nimmt durch die UV-B Bestrahlung zu.

Die Variante E107A ist i.V. zu ihrem Wildtyp anfälliger gegenüber UV-B induzierten Veränderungen. Nach Bestrahlung treten Intensitätsveränderungen der Kreuzsignale im Proteinrückgrat auf. Die betroffenen Aminosäuren befinden sich dabei hauptsächlich in der C-terminalen Domäne und sind Lösungsmittel exponiert. Analog zum Wildtyp treten die UV-induzierten Zusatzpeaks in dem ¹H¹³C HSQC an den Positionen Y δ^* und Y ϵ^* und H ϵ_1 des Zustandes B nach Bestrahlung auf. Gleichzeitig werden noch zusätzliche Kreuzsignale für alle aromatischen Aminosäuren hervorgerufen, die sich in der Nähe der Random-Coil Positionen befinden. Die UV-B Strahlung ruft also unterschiedliche Zustände der Variante E107A hervor. Der UV-B induzierte Zustand B analog zum Wildtyp und ein Zustand D, der teilweise entfaltet ist.

Tabelle 17: Intensität der zusätzlichen Signale nach UV-B Bestrahlung relativ zum Mittelwert der jeweils restlichen Tyrosin bzw. Histidin Signale. Das Zusatzsignal von $Y\epsilon^*$ Wildtyp hyD & hlens wird dabei vom

Kreuzsignal von Y51ε* überlagert				
	Wildtyp hγD_I _{UV} /I _{MW}	Wildtyp hγD&hlens_I _{UV} /I _{MW}	E107A_ I _{UV} /I _{MW}	
V°*	11.01	04.00	40.40	

	Wildtyp hγD_I _{UV} /I _{MW}	Wildtyp hγD&hlens_I _{UV} /I _{MW}	E107A_ I _{UV} /I _{MW}
Υδ*	1,4 ± 0,4	$0,4 \pm 0,2$	4,2 ± 1,3
Ye*	1,9 ± 0,2	(1,1 ± 0,3)	$4,0 \pm 0,6$
Ηε1	$0,6 \pm 0,3$	0.7 ± 0.3	$1,0 \pm 0,3$

5. Diskussion

5.1. Interaktionseffekte zwischen verschiedenen Kristallinen

Die Augenlinse ist ein komplexes Systems, das hauptsächlich aus einer hoch konzentrierten Mischung aus α -, β - und γ -Kristallinen besteht [7]. Um eine lebenslange Transparenz ohne zusätzlichen Protein Metabolismus aufrecht zu erhalten, müssen die Kristalline langlebig, in hoher Konzentration löslich sein und sich eine Vielzahl an unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Kristallinen in Balance halten [8, 9, 48]. Werden komplexen Wechselwirkungen durch z.B. umweltbedingten Stress oder die Proteinmodifikationen gestört, kann dies zur Aggregation und somit zur Linsentrübung führen. Dabei nimmt insbesondere die Wechselwirkung des Chaperons a-Kristallin mit anderen Kristallinen eine wichtige Stellung ein, da α -Kristallin aufgrund der Interaktion mit z.B. teilweise entfaltetem Protein dessen Aggregation verhindern kann [13, 25].

In der Literatur wurden bereits verschiedene Katarakt verursachende Varianten von Kristallinen identifiziert, deren veränderte Wechselwirkung mit dem Chaperon α -Kristallin Linsentrübung hervorrufen [70, 164, 165]. Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, ob auch die pathogene Variante E107A des humanen Kristallins h γ D eine veränderte Wechselwirkung mit dem h α B aufweist. Dadurch könnte Katarakt verursacht werden [69].

5.1.1. Biochemische und strukturelle Gegenüberstellung von hγD und E107A

Mehre biochemische Charaktersierungen des hyD-Kristallins und einiger seiner Varianten wurden in den letzten Jahren veröffentlicht [56-59, 69, 70] und zusätzlich die Struktur mittels NMR, SAXS oder Röntgenkristallographie bestimmt [68, 166]. Die in dieser Arbeit verwendete vererbbare und Katarakt verursachende Variante E107A [71] unterscheidet sich i.V. zum Wildtyp hyD nur durch einen erhöhten isoelektrischen Punkt. Die Proteinlöslichkeit, thermische Stabilität, biochemische Eigenschaften [69, 83] und Langzeitstabilität bzgl. Aggregation (Tabelle 16) beider Proteine sind gleich. Die fast identische Struktur der Variante E107A i.V. zum Wildtyp hyD hat sich bereits durch biochemische Messmethoden herauskristallisiert [69, 83] und konnte durch unterschiedliche NMR-spektroskopische Messungen in dieser Arbeit bestätigt werden. Nahezu gleiche Spektren sowohl des Rückgrats als auch der aromatischen und der aliphatischen Seitenketten bestätigen zweifelsfrei die identische Struktur: Das Rückgrat beider Kristalline ist bis auf einige wenige Aminosäuren, die sich in direkter Nachbarschaft zur Punktmutation befinden, identisch (Abb. 14). Das NMR-Spektrum der aliphatischen Seitenketten ist bis auf einige wenige Kreuzsignale übereinstimmend (Abb. 100). Bei den aromatischen Seitenketten ergeben sich nur minimale Verschiebungen an den kohlenstoffgebundenen Protonen Positionen der Histidine (Abb. 22). Diese Verschiebung tritt aber wahrscheinlich aufgrund von minimalen pH Variationen in den zwei Proben auf. Histidine besitzen einen pK_a=6,45 in der Nähe von dem physiologischen pH und reagieren somit durch Deprotonierung der Seitenketten besonders sensitiv auf kleinste pH Schwankungen in diesem Bereich [167]. Somit ist davon auszugehen, dass sowohl die Struktur als auch die biochemischen Eigenschaften, abgesehen von dem abweichenden pl, von Wildtyp hyD und seiner pathogenen Variante

E107A bis auf minimale Unterschiede identisch sind. Aufgrund des erhöhten pl's und der damit verbundenen erhöhten positiven Ladung von E107A bei physiologischem pH wird eine veränderte bzw. erhöhte elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Variante und dem negativ geladenen α -Kristallin postuliert [69, 71]. Diese Hypothese wurde im Rahmen dieser Dissertation genauer untersucht.

5.1.2. Schwache Wechselwirkung von α -Kristallin mit Wildtyp h γ D-Kristallin und seiner Variante E107A unter physiologischen Bedingungen

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden vermehrt Interaktionsstudien zwischen dem Chaperon α -Kristallin mit unterschiedlichen β - und γ -Kristallinen und deren Varianten im nativen Zustand und unter Stress durchgeführt [9, 25, 69, 70, 164, 168-172]. Zusätzlich konnte die unspezifische, hydrophobe Interaktion zwischen dem α -Kristallin mit verschiedenen Enzymen und Proteinen nachgewiesen werden, die nicht in der Linse vorkommen [13, 18, 25, 173-176]. Verschiedene Katarakt verursachende Varianten der γ -Kristalline zeigen dabei i.V. zum Wildtyp unterschiedliche Interaktionen mit dem α -Kristallin. Dabei können sich transiente nicht aggregationsanfällige Komplexe aus α - und γ -Kristalline bilden. Z.B. wird die aggregationsanfällige h γ D Variante V76D nicht vom α -Kristallin erkannt [165], während die h γ D Variante R77S i.V. zum Wildtyp keine veränderte Wechselwirkung [70] und die h γ S Variante G19V eine erhöhte Wechselwirkung mit dem Chaperon [164] zeigt. Abhängig von der Punktmutation verändern sich unterschiedliche biochemische und strukturelle Eigenschaften des Proteins, die einen Einfluss auf die Stabilität, Löslichkeit und inter- bzw. intramolekularen Wechselwirkungen der Kristalline hat.

Unter physiologischen Bedingungen wurde in der Literatur nur eine schwache Wechselwirkung zwischen den α -Kristallinen und unterschiedlichen, nativen γ -Kristallinen festgestellt [9, 164, 170]. Dies wird durch die Beobachtungen der NMR-Messungen bei 20°C, 37°C und 43,5°C von h γ D in An- bzw. Abwesenheit von h α B bestätigt (Abb. 33 & Abb. 34; Abb. 68 & Abb. 69). Es gibt weder eindeutige chemische Verschiebungen der Kreuzsignale, noch verändern sich deren Intensitäten deutlich in Anwesenheit von h α B. Dabei gibt es nur leichte Intensitätsabweichungen, von denen die betroffenen Aminosäuren über das gesamte Protein verteilt sind. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für die Katarakt auslösende Variante E107A, für welche aufgrund ihres veränderten pl's eine erhöhte Wechselwirkung mit dem α -Kristallin postuliert und bei hohen Proteinkonzentrationen nachgewiesen wurden ist [69]. Für niedrigere Konzentrationen um die 100 μ M lassen sich unter nativen Bedingungen weder für den Wildtyp h γ D noch seiner Variante E107A eine sich im Gleichgewicht widerspiegelnde stärkere Wechselwirkung mit dem sich im achtfachen molaren Überschuss vorhandenen Chaperon α -Kristallin beobachten. Es handelt sich also sowohl für den Wildtyp als auch für die Variante E107A um eine schwache, transiente Wechselwirkung.

5.1.3. Schwache Wechselwirkung von α -Kristallin mit Wildtyp h γ D-Kristallin und seiner Variante E107A unter mildem thermischen Stress

Um den Wildtyp hyD und die Variante E107A zu destabilisieren und damit eine möglichst starke Chaperonaktivität hervorzurufen [173], wurden beide Kristalline in An- bzw. Abwesenheit von h α B thermischem Stress ausgesetzt. Dabei unterscheidet sich der optimale Temperaturbereich für die Chaperonaktivität der α -Kristalline α A und α B. Das Chaperon α B ist im Gegensatz zu α A bei physiologischen Temperaturen hydrophober und aktiver, verliert aber bei höheren Temperaturen um die 52°C seine Chaperonaktivität und aggregiert ab 62°C irreversibel [34-36] (Abb. 29). α A hingegen zeigt bei erhöhten Temperaturen eine stabilere Konformation mit größerer Chaperonaktivität und ist in der Mischung mit dem α B-Kristallin bis zu Temperaturen von 100°C stabil [9, 34-37]. Das hier verwendete h α B sollte also bei physiologischen Temperaturen eine höhere Chaperonaktivität i.V. zum h α A haben, wobei z.B. schon eine moderate Erhöhung der Temperatur eine verstärkte Bindung des α -Kristallins mit einer Doppelmutante von h γ D ausgelöst hat [170]. Zusätzlich wurde für b γ B in Anwesenheit von bovinem α -Kristallin eine Unterdrückung von lichtstreuenden Komplexen für Temperaturen T > 60°C detektiert [25] & (9.2.1).

Unter thermischem Stress zeigen beide hyD-Kristalline, der Wildtyp und seine Variante E107A sowohl bei den Aggregationskinetiken als auch bei den NMR-Messungen ein nahezu identisches Verhalten. Bei schrittweiser Erhöhung der Temperatur von 13°C auf 90°C innerhalb einer Stunde besitzen beide Proteine in Abwesenheit von h α B eine apparente Schmelztemperatur um die 75°C. Diese wird durch Hinzugabe von dem Chaperon nur unwesentlich auf 77°C verschoben (Abb. 31). Im Gegensatz dazu zeigt sich sowohl für den Wildtyp hyD als auch für E107A bei den Messungen über eine Stunde bei konstanter Temperatur T=65°C eine eindeutige Aggregationsunterdrückung in Anwesenheit von haB (Abb. 32). NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden aber nur bis zu einer Temperatur von 43,5°C durchgeführt, da bereits ab 50°C deutliche Proteinaggregation in den NMR-Röhrchen stattgefunden hat. Analog zu den Messungen bei 20°C und 37°C konnten weder für die pathogene Variante E107A noch für den Wildtyp bei mildem thermischem Stress von 43,5°C eindeutige Änderungen in den ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren in An- bzw. Abwesenheit von haß detektiert werden (Abb. 33). Anscheinend ist weder die Variante E107A noch der Wildtyp hyD soweit destabilisiert bzw. entfaltet wurden, dass eine verstärkte Interaktion zwischen den hyD- und α -Kristallinen auftritt. Mit einer längeren Inkubationszeit von mehreren Tagen bei 43,5°C wäre es nicht auszuschließen, dass evtl. verstärkt auftretende Wechselwirkungen zwischen den hyD- und α -Kristallinen auftreten [172, 177]. Diese Kontrollmessungen wurden im Rahmen dieser Dissertation aber nicht durchgeführt.

5.1.4. Wechselwirkung von bovinem und humanem Linsenhomogenat mit α - und γ -Kristallinen

Das humane Linsenhomogenat wurde aus dem löslichen Anteil von altersbedingten Kataraktlinsen gewonnen und weist einen stark erniedrigten Anteil an α -Kristallin auf (Abb. 27). Dies ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen aus der Literatur, dass die im Alterungsprozess geschädigten β/γ -Kristalline Komplexe mit dem α -Kristallin ausbilden und

somit lichtstreuende Aggregate verhindert werden. Im Laufe der Zeit führt dies zu einer Erschöpfung des begrenzten Vorrates an α -Kristallins, und zur Vergrößerung und/oder Neubildung von lichtstreuender, nicht löslichen β/γ - bzw. α - β/γ -Komplexen [87, 164, 165, 168, 170].

Um die Zusammensetzung einer gesunden humanen Linse zu imitieren, wurde zu der Mischung rekombinant exprimiertes αA - und αB -Kristallin hinzugegeben und die Zusammensetzung mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie Säule überprüft (Abb. 28).

Die an α -Kristallin verringerte Mischung aus humanen Linsenhomogenat ist i.V. zu einer Kristallinmischung aus gesunden, jungen Rinderaugen, thermisch instabiler. Erst nach Zugabe einer Mischung bestehend aus zwei Anteilen h α A und einem Anteil h α B, nicht aber reinem h α B wird das humane Linsenhomogenat gegenüber thermisch induzierter Aggregation stabilisiert (Abb. 30). Das Kristallin h α B besitzt also nur innerhalb eines begrenzten Temperaturintervalls seine volle Chaperonaktivität [34-36, 164] und strukturelle Stabilität. Durch Zugabe von α -Kristallin wird hingegen die Kristallinmischung aus humanen Augenlinsen gegenüber thermisch induziertem Stress stabilisiert. Dies wurde z.B. auch von *Horwitz et al.* beobachtet, der durch Extraktion des α -Anteils aus einer bovinen Linse eine verstärkte thermische Aggregation bei 60°C festgestellt hat. Diese wurde durch Hinzugabe von dem zuvor entfernten α -Kristallin unterdrückt [25]. Sowohl einzelne β - und γ -Kristalline als auch Mischungen aus unterschiedlichen Kristallinen können durch thermischen Stress destabilisiert werden und deren Aggregation bei höheren Temperaturen durch die Wechselwirkung mit dem α -Kristallin verhindert werden [9, 25, 170, 172].

Im Fall von der Variante E107A i.V. zum Wildtyp lassen sich keine sich im Gleichgewicht detektierbaren stärkeren Interaktionen mit einem humanen Linsenhomogenat in An- bzw. Abwesenheit von zusätzlichem α -Kristallin NMR-spektroskopisch detektieren (Abb. 33). Dies ist analog zu den Interaktionsstudien mit h α B bei 20°C bis 43,5°C. Fast alle Aminosäuren, deren Intensitäten sich in Anwesenheit von den unterschiedlichen Interaktionspartnern leicht ändern, befinden sich an der Proteinoberfläche. Die betroffenen Aminosäuren von Wildtyp h γ D sind dabei tendenziell eher in der Ctd zu finden, während sich die betroffenen Aminosäuren der Variante E107A dagegen mehr über die gesamte Struktur verteilen (Abb. 35).

Der Wildtyp h γ D und seine pathogene Variante E107A haben also in einem Temperaturbereich von 20 - 43,5°C nur schwache, transiente Interaktionen mit den rekombinant exprimierten h α A und h α B und/oder aus der humanen Linse stammenden α -, β - und γ -Kristallinen.

5.1.5. Entstehung von Katarakt durch die Variante E107A

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide h γ D-Kristalline, Wildtyp h γ D und E107A, keine starke Wechselwirkung sowohl mit dem h α B, als auch mit der an α -Kristallin verringerten und angereicherten humaner Linsenlösung eingehen. Diese wären NMR-Spektroskopisch durch Verschiebung bzw. Verschwinden von Kreuzsignalen des Rückgrates beobachtbar [164]. Alles deutet auf eine schwache, transiente Wechselwirkung zwischen

den beiden hyD-Kristallinen und ihren Interaktionspartnern hin. Dabei sind hauptsächlich hydrophobe und geladene Aminosäuren, deren Seitenketten nach außen hin gerichtet sind, betroffen (Abb. 35). Diese schwache, attraktive hydrophobe und/oder elektrostatische Wechselwirkung [178] zwischen den, bei physiologischem pH unterschiedlich geladenen, γ und α -Kristallinen wurde bereits durch unterschiedliche Veröffentlichungen postuliert. Dabei wird davon ausgegangen, dass durch Veränderung äußerer Einflüsse wie verringerten pH [22], erhöhter Temperatur [38], Bindung von Ionen [172] oder postranslatorischen Modifikationen wie Phosphorelisierung [170] eine erhöhte Anzahl an hydrophoben Bindungsstellen am α -Kristallin und somit eine erhöhte Chaperonaktivität hervorgerufen wird.

Aufgrund der unzureichenden Datenlage, kann die in der Fachwelt vorherrschende Sichtweise zur Verhinderung der Ausbildung von größeren, lichtstreuenden Aggregaten durch die Anwesenheit des α -Kristallins, weder bestätigt noch widerlegt werden. Dabei soll das Chaperon bevorzugt an teilweise entfaltete, im Fall vom γ -Kristallin an ein Intermediat mit entfalteter N-terminaler Domäne und gefalteter bzw. leicht destabilisierter C-terminaler Domäne binden und dessen Komplexbildung unterbinden [165, 168, 170, 173]. Eventuell waren die in dieser Arbeit gewählten Bedingungen auch nicht dazu geeignet ein instabiles Intermediat des γ -Kristallins im Gleichgewicht zu populieren. Es gibt jedoch Hinweise, dass h α B bzw. α -Kristallin hydrophobe exponierte Aminosäuren bzw. Bereiche aus hydrophoben Aminosäuren von Wildtyp h γ D und E107A erkennt und mit diesen schwach interagiert [18, 22, 168, 179].

Der in dieser Dissertation entstandener Hinweis, dass sowohl die Variante E107A wie auch der Wildtvp hyD keine verstärkte Wechselwirkung mit dem α -Kristallin eingeht, ist auf dem ersten Blick ein Widerspruch zu den Angaben in der Literatur. Es wird postuliert, dass die Variante E107A aufgrund seines erhöhten pl's bei physiologischem pH ein positiveres Oberflächenpotential besitzt und damit eine veränderte elektrostatische Wechselwirkung zwischen E107A und den Augenkristallinen auftritt. Im Fall von α-Kristallin sollte diese größer sein [69, 71]. Banerjee et al. konnte diese erhöhte attraktive Wechselwirkung der Variante i.V. zum Wildtyp mit dem α -Kristallin mit Hilfe von Lichtstreuung, gradueller Phasentrennung und Computersimulation nachweisen. Dabei wurden Konzentrationen von 265 bis 275 mg/ml verwendet. Diese sind um den Faktor 10 - 15 höher als die in dieser Dissertation verwendeten Konzentrationen [69]. Möglicherweise sind, die durch die Punktmutation hervorgerufenen veränderte Wechselwirkungen so gering, dass diese erst in den hohen Proteinkonzentrationen der Linse, nicht aber in verdünnten Systemen von 18-30 mg/ml eine Rolle spielen. Die schwache, anziehende Wechselwirkung zwischen α - und γ -Kristallinen erhöht die Stabilität einer hoch konzentrierten, binären Mischung von 230 - 260 mg/ml [178]. Diese Anziehung zwischen unterschiedlichen Proteinen ist sehr sensitiv gegenüber kleinsten Abweichungen und kann durch erhöhte bzw. erniedrigte Wechselwirkungen bei hohen Konzentrationen zu unterschiedlichen Arten von Phasenseparationen und somit zu Dichtefluktuationen im Brechungsindex und Lichtstreuung führen [178, 180]. Banerjee et al. berechneten den Unterschied der Wechselwirkung zwischen Wildtyp hyD und E107A mit h α B auf ~ 0,5 k_BT. Dieser geringe Unterschied reicht bereits aus, um eine dichtegetriebene Phasentrennung bei hohen Konzentrationen auszulösen. Interessanterweise ist die homologe Interaktion zwischen Wildtyp hyD und Wildtyp hyD bzw. E107A und E107A dabei nicht verändert [69].

Im Fall der Variante E107A scheint die Katarakt, nicht primär durch einen stabilen Komplex des α -Kristallins mit der Variante und damit zur Erschöpfung des begrenzten Vorrates an α -Kristallins zur Verhinderung weiterer Aggregationsprozessen in der Linse [164, 165, 168, 170] verknüpft zu sein. Hingegen führen die leicht stärkeren attraktiven Wechselwirkung mit dem α -Kristallin bei höheren Konzentrationen zur Phasentrennung und Lichtstreuung aufgrund von Dichtefluktuationen im Brechungsindex [69].

5.2. Einfluss von UV-B Strahlung auf Wildtyp hγD-Kristallin

Die sich mit dem Alter entwickelnde Katarakt wird durch unterschiedliche Umweltbedingungen hervorgerufen. Diese verursachen eine Vielzahl an verschiedenen Modifikationen in der Linse bzw. der Linsenkristallinen. Dabei zählt die Exposition mit UV-Strahlung zu den Hauptrisikofaktoren [119]. Die Proteine der Augenlinse werden durch die Strahlung irreversibel geschädigt, was zu deren Aggregation und letztendlich zur Linsentrübung führen kann. Insbesondere die hoch konservierten aromatischen Aminosäuren der β - und γ -Kristallinen spielen eine wichtige Rolle in der Energieabsorption und -Dissipation der UV-Strahlung durch FRET und Quenching und schützen somit die Retina vor UV-induzierter Schädigung. So wird z.B. im humanen yD-Kristallin die Energie der UV-Strahlung von den jeweiligen Trp Donoren W43 bzw. W131 absorbiert und durch den Intradomänen FRET auf die jeweiligen Akzeptorenpartner W69 bzw. W157 in der N- bzw. Cterminalen Domäne transferiert. Die weitere Energiedissipation erfolat über Elektronentransfer von dem angeregten Indolring auf das Rückgrat der Akzeptoren [47, 80, 117, 119, 181, 182].

Aufgrund der großen Anzahl an aromatischen Aminosäuren besteht nicht nur ein photoprotektiver Schutz der Retina, sondern zugleich auch eine erhöhte Anfälligkeit der gegenüber UV-induzierten Modifikationen und Schädigungen wie z.B. Kristalline Photooxidation [47]. Dementsprechend wurde in der Literatur eine Vielzahl an durch UV-Strahlung verursachte Modifikationen und Aggregationsbildungen von den Kristallinen beschrieben. So sind z.B. in den Aggregaten aus Katarakt befallenen Linsen - in vivo und in vitro - kovalent modifizierte Aminosäuren der y-Kristallinen wie z.B. Oxidationsprodukte von Tryptophanen [119, 130] und Cysteinen [97] identifiziert worden [100, 106, 125]. Dabei kann z.B. durch Öffnung des Indolringes von Tryptophan und Umwandlung zu Kynurenine die Stabilität von hyD stark beeinträchtigt werden und somit zur Aggregation führen [80, 97, 132]. Anderseits spielen auch Tyrosine und Phenylalanine eine wichtige Rollte in der Faltung und Stabilität von hyD [183, 184]. Laut Schafheimer et al. nehmen die Tryptophane zwar eine bedeutende photoprotektive Rolle ein, die Photoaggregation wird aber hauptsächlich durch oxidationsabhängige Schädigungen an den Tyrosinen hervorgerufen [100, 106]. Wahrscheinlich wird die Photoaggregation aus einer Kaskade aus unterschiedlichen Mechanismen verursacht. Bis jetzt wurde aber noch nicht eindeutig geklärt, ob es sich bei den entstandenen Aggregaten um kovalent verknüpfte Kristalline [97, 106, 127] und/oder amyloid ähnliche Fibrillen [125, 126, 128] handelt.

Die in der Literatur bis jetzt durchgeführten Untersuchungen befassen sich hauptsächlich mit UV-Strahlung induzierten Änderungen der Proteine in den Aggregaten. In dieser Arbeit

werden hingegen die NMR-spektroskopisch detektierbaren Veränderungen in dem löslichen Anteil von UV-B bestrahltem hγD untersucht und beschrieben.

5.2.1. Biophysikalisch detektierbare Änderungen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das $h\gamma D$ mit $\lambda_{max} = 310$ nm und einer Bestrahlungsstärke von 100 J/cm² bestrahlt. Nach der UV-B Bestrahlung befinden sich noch etwa 90 % des Proteins in Lösung. Dabei zeigt sowohl die unbestrahlte als auch die bestrahlte Probe in einem Zeitraum von mind. 24h keine Aggregation (Abb. 36 & Tabelle 16). Dies deutet darauf hin, dass der stark geschädigte Anteil des Proteins innerhalb der Bestrahlungszeit von 60 min und/oder der darauf folgenden Totzeit von ca. 30 min aggregiert. Das verbleibende Protein im Überstand ist dabei trotz eventueller UV-induzierter Modifikationen über einen langen Zeitraum stabil.

Dies ist in Übereinstimmungen mit Ergebnissen aus der Literatur. Schafheimer et al. [106] beobachten bei Aggregationsmessungen während der Bestrahlung von h γ D mit λ_{max} = 302nm und H = 14,4 J/cm² bzw. I = 2mW/cm² abhängig von der Proteinkonzentration einen schnellen Anstieg der Trübung innerhalb der ersten 40 bis 100 min mit anschließendem Plateau. Zusätzlich detektieren sie nach zwei Stunden Bestrahlungszeit einen Verlust von 10% des löslichen Proteins und können mit Hilfe von reduzierendem SDS-Gel nach 45 min Bestrahlung große Aggregate detektieren. Auch *Wang et al.* [127] haben 20 - 30 min nach Bestrahlungsbeginn mit einer UV-C Quelle ein Aggregationsplateau und größere Aggregate von h γ D festgestellt.

Des Weiteren verringert sich die Fluoreszenzintensität von löslichem $h\gamma D$ nach der Bestrahlung nur minimal (Abb. 37). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass kein bzw. nur ein sehr geringer Anteil an Tryptophan entweder chemisch modifiziert wurde und/oder sich die Lösungsmittelexposition der Trp im Inneren des bestrahlten Proteins verändert hat. Untermauert wird das Bild durch Beobachtungen von *Schafheimer et al.* [106], die genau wie in dieser Arbeit, keine großen Änderungen im Absorptionsspektrum des löslichen $h\gamma D$ vor und nach Bestrahlung feststellen können. Zusätzlich detektieren *Wang et al.* [127] durch Messungen von Circulardichroismus Spektren keine UV-induzierten Änderungen der Sekundärstruktur von der bestrahlten, löslichen Probe.

Zusammengefasst sind im löslichen Überstand des bestrahlten h γ D weder die aromatischen Aminosäuren in einem detektierbaren Ausmaß chemisch modifiziert, noch verändert sich die Struktur des Proteins. Für den nicht löslichen Anteil von h γ D wurden in der Literatur hingegen eine Vielzahl an Modifikationen an Aminosäuren, Peptidspaltungen und Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur festgestellt [51, 98-100, 102, 106, 114, 125, 127, 128].

5.2.2. NMR-spektroskopisch detektierbare Änderungen

Um eine Aussage über eine UV-B induzierte Bildung von neuen, gering besetzten Zuständen und Veränderungen der Proteinstruktur bzw. Modifikationen der Aminosäuren auf atomarer Ebene treffen zu können, wurden unterschiedliche NMR-spektroskopische Experimente durchgeführt. Die jeweiligen Spektren wurden dabei vor und nach Bestrahlung miteinander verglichen.

5.2.2.1. Rückgrat & Aliphatische Seitenketten

In den ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren können weder chemische Verschiebungen, signifikante Intensitätsänderungen einzelner Kreuzsignale noch Auftreten neuer Signale aufgrund von UV-B Strahlung beobachtet werden (Abb. 39). Da die Amidsignale sehr empfindlich auf geringe Änderungen der Tertiärstruktur reagieren, ergibt sich somit die Schlussfolgerung, dass sich diese aufgrund der UV-B Strahlung nicht verändert. Im Gegensatz dazu beobachten *Ji & Gronenborn et al.* [73] nach der Bestrahlung von h_YD mit der energiereicheren UV-C Strahlung hauptsächlich in der N-terminalen Domäne größere Intensitätsänderungen der Protonen-Amid Kreuzsignale. Diese betreffen hauptsächlich die Signale der beiden Tryptophanen, wobei das $\lambda_{max, UV-C}$ im Absorptionsmaximum von Trytophan liegt. Zusätzlich treten mit steigender Energiedosis neue Kreuzsignale auf. Dies deutet auf ein Auftreten einer neuen, zusätzlichen h_YD Population mit möglichen beschädigten W43 hin. Somit schädigt bzw. modifiziert die in der Natur bereits durch die Atmosphäre gefilterte UV-C Strahlung [90] das h_YD sehr viel stärker als die UV-B Strahlung.

Bei dem aliphatischen ¹H¹³C NMR-Korrelationsspektrum (Abb. 40) treten im Gegensatz zum ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektrum (Abb. 39) eine geringe Anzahl an zusätzlichen Signalen nach der Bestrahlung auf. Diese betrifft insbesondere die Methylgruppen. Dies deutet auf eine Population eines Zustandes B mit lokalen Änderungen hin. Diese Population B tritt zusätzlich zu der intakten, nicht entfalteten Population A im Überstand nach der Bestrahlung auf.

Wahrscheinlich treten aufgrund des erhöhten Amidprotonenaustausches der lokal flexibleren, ungeschützten Population B des bestrahlten Proteins im ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektrum keine detektierbaren zusätzliche Signale, insbesondere im Bereich von 8,0 - 8,5 ppm (¹H) (Abb. 39) auf. Somit kann keine eindeutige Aussage über die lokale Änderungen des Zustandes B bzgl. teilweiser Entfaltung gemacht werden. Durch veränderte Messbedingungen könnten diese zusätzlichen Signale detektiert werden. Zum einen kann die Amidprotonenaustauschrate bei niedrigerer Temperatur und/oder pH-Wert verringert werden. Zum anderen kann die Empfindlichkeit der Messsignale durch eine Erhöhung der Anzahl der Scans und/oder Verwendung eines höheren Magnetfeldes verbessert werden [185]. Somit könnte eine möglicherweise teilweise entfaltete Population B detektiert werden, wie es z.B. bereits von *Ji & Gronenborn et al.* [73] für die Variante W43R von hγD gezeigt worden ist.

Zusammengefasst haben sich das Rückgrat und die Faltung von h γ D durch die Bestrahlung von UV-B nicht verändert, wobei aber eine zusätzlich Population B mit lokalen Änderungen auftritt.

5.2.2.2. Aromatische Seitenketten

Bei der Aufnahme eines aromatischen ¹H¹³C HSQC Spektrums kann man die Protonen-Kohlenstoff-Korrelationen des aromatischen Ringes der aromatischen Aminosäuren Trp, Phe, Tyr und His detektieren. Nach der Bestrahlung von hyD treten drei zusätzliche Signale im aromatischen Spektrum an den Random-Coil Positionen von H ϵ_1 , Y δ^* und Y ϵ^* auf. Für die Seitenketten von Phe und Trp sind keine zusätzlichen Signale zu detektieren (Abb. 41). Dies deutet auf eine teilentfaltete Population B hin, da nicht alle aromatischen Aminosäuren betroffen sind. Gleichzeitig ergeben sich keine weiteren Änderungen im Spektrum, wie z.B. das Verschwinden einzelner Kreuzsignale oder detektierbare Intensitätsabnahmen (Abb. 42). Dies ist unerwartet. Typischerweise kann man in der NMR beim Auftreten einer zusätzlichen Population B die neuen Kreuzsignale mit den Signalen bestimmter Aminosäuren der ursprünglichen Population А durch deren chemischen Verschiebung oder Intensitätsabnahmen verknüpfen. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass der Zustand B zu gering populiert ist, um ihn über eine Abnahme der Signale des Zustandes A bestimmen zu können.

Im Fall von dem löslichen Anteil des bestrahlten hγD sind in dem aromatischen Spektrum also mindestens zwei Zustände detektierbar: die native Population A und ein Zustand B mit zusätzlichen Kreuzsignalen.

5.2.2.3. Charakterisierung von Zustand B

Population

Die Frage, wie viel von Zustand B vorliegt gestaltet sich als schwierig und kann im Rahmen dieser Dissertation nicht eindeutig geklärt werden. Vor allem zwei anscheinend entgegengesetzte Beobachtungen müssen erklärt werden. Zum einen besitzen die UV-B induzierten Zusatzsignale der Zustände B & B* eine relativ hohe Intensität (Tabelle 20 & Tabelle 21). Dies könnte für eine hohe Population sprechen. Zum anderen können keine Intensitätsabnahmen der Signale des Zustandes A detektiert werden (Tabelle 20 & Tabelle 21). Dies könnte für eine geringe Population sprechen. Explizit kann keine Abnahme der Signale von Y17 und Y29 beobachtet werden, welche eindeutig als Ursprung der UV-B induzierten Zusatzsignale identifiziert wurden (5.2.2.4).

Somit kann sich das Protein nach Bestrahlung nicht zu 100% in den UV-B induzierten Zuständen B & B* befinden, da sonst die Signale von Y17 und Y29 nach Bestrahlung vollständig verschwinden müssten. Auch eine erhöhte Population ist unwahrscheinlich, da diese durch eine eindeutige Intensitätsabnahme der Signale des Zustandes A charakterisiert sein sollten.

Die nicht beobachtbaren Intensitätsabnahmen von Y17 und Y29 deuten auf gering populierte Zustände B & B* hin. Dessen Größe muss sich innerhalb des Bereiches der Messunsicherheit der Intensitäten befinden. Diese beträgt für stärkere Signale (z.B. Y17 und Y29) bis zu 3% und für schwächere Signale bis zu 30%. All dies könnte unter der Annahme erklärt werden, dass die UV-B induzierten Zusatzsignale eine hohe intrinsische Flexibilität aufweisen und somit eine größere Relaxationszeit T₂ besitzen. Dies führt zu geringerem Signalverlust und somit stärkerem Messsignal. Somit wären die Signale von Y17 und Y29 im UV-B induzierten Zustand sehr viel intensiver als im nativen Zustand. Eine geringe Abnahme im nativen Zustand kann demnach zu einer starken Zunahme im UV-B induzierten Zustand führen.

Einige Beobachtungen unterstützen diese Hypothese qualitativ. Bereits in dem nicht bestrahlten aromatischen¹H¹³C HSQC Spektrum unterscheiden sich die Intensitäten der einzelnen Tyrosine des hyD-Kristallins bis zu Faktor 10 (Tabelle 20). Die sich an der Oberfläche befindenden Tyrosine Y17 und Y29 weisen im unbestrahlten Zustand eine aromatische Wechselwirkung auf, sind also in ihrer intrinsischen Flexibilität eingeschränkt. Nach Bestrahlung können sie somit durch veränderte Wechselwirkung mit dem oxidierten C19 flexibler werden. Tatsächlich weisen Y17 und Y29 in den Varianten Y29A und Y17A, bei denen jeweils der Partner der aromatischen Wechselwirkung fehlt, eine um den Faktor 2 - 5 höhere Intensität auf als im Wildtyp. Da Y17 ohne seinen aromatischen Stapelpartner Y29 in der Variante Y29A weiterhin mit dem C19 interagieren kann, ist dessen Flexibilität wahrscheinlich i.V. zum "freien" Y29 reduziert. Dies spiegelt sich in den reduzierten Intensitäten der "freien" Y17 i.V. zum "freien" Y29 an den Positionen Y δ^* und Y ϵ^* wieder (Tabelle 22 & Tabelle 23). Im ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektrum sind keine zusätzlichen Signale der Zustände B& B* zu detektieren, da wahrscheinlich der Effekt einer erhöhten Flexibilität durch den damit verbundenen erhöhten Amidprotonenaustausch ausgeglichen wird [185]. Des Weiteren sind gering populierte UV-B induzierte Zustände bereits in der Literatur beschrieben. Ji et al.[73] konnten für die UV-C mimikende Variante W43R von hyD einen zusätzlichen Zustand mit einem Anteil von 10% bestimmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass gering populierte Zustände B & B*, mit hoher intrinsischer Flexibilität der Tyrosinseitenketten die bestmögliche Erklärung für die hier beobachteten Effekte darstellen. Dabei handelt es sich um eine auf den oben dargelegten Beobachtungen beruhende Hypothese, die durch weiterführende Experimente bestätigt werden muss. Hierzu zählt z.B. der Vergleich mit der freien Aminosäure Tyrosin, bzw. ein in einem unstrukturierten Bereich von h γ D künstlich eingeführtes und somit ebenfalls flexibles Tyrosin, welche unter identischen experimentellen Bedingungen sehr starke Signale liefern sollten. Des Weiteren könnte evtl. durch speziell selektiv ¹³C markierte Tyrosine in h γ D über 1D ¹³C Experimente die Integrale der betreffenden Signale ausgewertet und direkt in Populationen übersetzt werden.

Intaktes Ringsystem

Ferner kann für den Zustand B davon ausgegangen werden, dass die Ringsysteme und somit die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren noch intakt sind. Wäre dies nicht der Fall, würde z.B. ein Aufbruch des aromatischen Ringes zu einem kompletten Verlust bzw. großer Änderung in den chemischen Verschiebungen von einzelnen Protonen-Kohlenstoff-Kreuzsignalen innerhalb des Spektrums führen. Bei der bestrahlten Probe treten hingegen nur drei zusätzliche Signale an den typischen Random-Coil Positionen von Tyr und His ohne zusätzliche weitere Veränderungen auf. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass im löslichen Anteil der bestrahlten Proben sich zu einem sehr geringen Anteil Protein mit z.B. chemisch modifizierten Tryptophan befindet. Deren Population ist aber so gering, dass sie

NMR-spektroskopisch nicht detektiert werden kann. Bei hier nicht gezeigten Kontrollmessungen von unbestrahlten und bestrahlten, hoch konzentrierten freien aromatischen Aminosäuren unter gleichen Bedingungen wie für das hyD, konnten im Protonen-1D Spektrum von L-Phe keine Unterschiede detektiert werden. Das bestrahlte L-Trp zeigt i.V. zur nicht bestrahlten Probe ein leicht verändertes Spektrum mit vielen zusätzlichen Signalen von neuen Spezies. Diese weisen eine geringe Intensität auf und sind im aromatischen HSQC nicht mehr detektierbar. L-Tyr weist im Protonen-1D einen neuen Zustand auf, dessen Kreuzsignale im Rauschen des aromatischen HSQC's zu erahnen sind. Eine direkte Übertragung auf die aromatischen Aminosäuren von hyD ist nicht möglich. Zum einen sind die aromatischen Aminosäuren durch den Einbau in die Proteinstruktur und daraus resultierende Schutzmechanismen besser vor direkter UV-B Strahlung geschützt. Zum anderen ist die tatsächliche Menge an aromatischen Aminosäuren i.V. zu den freien Aminosäuren sehr gering. Somit lassen sich evtl. neu entstandene Spezies mit einem modifizierten Ringsystem aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration im Gegensatz zum Zustand B mit intakten Ringsystemen nicht detektieren.

Zustände B und B*

Direkt nach UV Bestrahlung sind sowohl die Protonenlinienbreite der Zusatzsignale, insbesondere von Y δ^* mit 64 Hz, als auch deren Intensitäten i.V. zu den restlichen Kreuzsignalen erhöht und nehmen im Laufe der Monate wieder ab (Abb. 43 & Abb. 44). Dies deutet auf einen weiteren, NMR-spektroskopisch von Zustand B nicht eindeutig unterscheidbaren Zustand B* hin. Dessen Zusatzsignale überlagern sich größtenteils mit dem vom Zustand B. Durch ein erhöhtes Aggregationsverhalten von Zustand B* ist dieser im Laufe der Monate NMR-spektroskopisch nicht mehr detektierbar. Dies führt zu der beobachteten Abnahme der Intensitäten und Linienbreiten der Zusatzsignale. Ein langsamer Austausch der Zustände B und B* im ms Bereich, welcher auch zur Linienverbreiterung führen würde, ist hingegen unwahrscheinlich. Bei dieser Gleichgewichtsreaktion von B mit B* würde man z.B. bei der Aggregation von B* zwar eine Intensitätsabnahme, nicht aber eine Abnahme der Lininenbreite der UV-induzierten Zusatzsignale, wie hier beobachtet, erwarten.

Chemische Modifikation

Die zusätzlichen Signale der betroffenen aromatischen Aminosäuren im Zustand B werden durch eine chemische Modifikation anderer, nicht aromatischer Aminosäuren, hervorgerufen. Diese Modifikation ist irreversibel, da sich selbst Monate nach Bestrahlung immer noch dieselben Zusatzsignale aufzeigen. Zwar fällt die Intensität der UV-B induzierten zusätzlichen Kreuzsignale von Tyrosin relativ zu den restlichen Kreuzsignalen bereits nach einem Monat auf ~20 - 40% der ursprünglichen Werte der Zustände B und B* ab. Die Kreuzsignale bleiben dann über einen Zeitraum von mind. 4 Monaten erhalten (Abb. 43). Der Verlust der Intensität kann dabei z.B. durch die Aggregation des Zustandes B* erklärt werden. Ein Anteil von mind. 20 - 40% des $h\gamma D$ im Zustand B ist also zusätzlich zur irreversiblen chemischen Modifikation langzeitstabil.

5.2.2.4. Identifikation von Y17 und Y29 als betroffene Aminosäuren

Zusammengefasst befinden sich im Überstand der bestrahlten Probe drei detektierbare Populationen: Der native Zustand A und die UV-induzierten Zustände B und B*. Die Zustände B und B* sind lokal an den Tyr hoch flexibel, chemisch modifiziert und besitzen intakte Ringsysteme. NMR-spektroskopisch sind beide Zustände nicht unterscheidbar, wobei B über mehrere Monate stabil in Lösung bleibt und B* aggregiert.

Es verändern sich weder die Intensität der Kreuzsignale noch deren einzelne Protonen-Kohlenstoff Positionen vor und nach der Bestrahlung deutlich (Abb. 41 & Abb. 42). Daher können aus den Spektren von Wildtyp hyD keine direkten Rückschlüsse auf die betroffenen Aminosäuren, die die drei extra Kreuzsignale hervorrufen, geschlossen werden. Einzig die Art der Aminosäuren und deren Positionen innerhalb der Ringsysteme, nämlich Y ϵ^* , Y δ^* und H ϵ_1 , sind bekannt.

Durch die Verwendung von unterschiedlichen $h\gamma D$ Varianten und deren Verhalten im unbestrahlten und bestrahlten Zustand ist es jedoch möglich, die betroffenen aromatischen Aminosäuren in den Populationen B und B* als die Y17 und Y29 zu identifizieren.

Hinweise zur Identifizierung von Y17 und Y29 durch die Einzeldomänen, struktureller Betrachtung und Ergebnisse aus der Literatur

Bei der UV-B Bestrahlung der isolierten Einzeldomänen Ntd und Ctd von h γ D sticht hervor, dass sich nur im aromatischen ¹H¹³C HSQC Spektrum der Ntd, nicht aber der Ctd die UV-B induzierten Zusatzsignale von Y δ^* und Y ϵ^* ausbilden (Abb. 45, Abb. 92 & Abb. 93). Die im Volllängenkonstrukt h γ D induzierten Änderungen in den aromatischen Ringsystemen (Abb. 41) betreffen also nur aromatische Aminosäuren der N-terminalen Domäne. Dies sollte die Anzahl der möglichen 14 Tyrosine von h γ D auf die verbleibenden 7 Tyrosine in der Ntd reduzieren. Dabei wurden alle 7 Tyrosine in der Ntd im Rahmen dieser Dissertation zugeordnet. Eine genauere Charakterisierung der Einzeldomänen ist im Kapitel 5.3.3 zu finden.

Eine weitere Einengung der betroffenen Aminosäuren ergibt sich aus Hinweisen aus der Literatur und der Proteinstruktur. Wahrscheinlich befinden sich die betroffenen Tyrosine im UV-B induzierten Zustand B und B* an der Oberfläche des lokal veränderten bzw. entfalteten h γ D (5.2.2.3). Dabei sind die gestapelten Y17 und Y29 die einzigen Tyrosine, die bei der strukturellen Betrachtung dieser Anforderung entsprechen. Das zusätzliche H ϵ_1 -Signal kann dabei durch das sich in der Nähe befindende H23 hervorgerufen werden(Abb. 46). Zusätzlich haben *Schafheimer & King et al.* [100] einen Y17/C19/Y29 Cluster identifiziert, bei dem Y17 und C19 eine photochemische Einheit bilden, durch deren Wechselwirkung C19 aufgrund der UV-Bestrahlung oxidiert.

Um Y17 und Y29 eindeutig als betroffene Aminosäuren identifizieren zu können, wurden die unterschiedliche Tyrosinvarianten Y17A, Y29A und Y17AY29A im unbestrahlten und bestrahlten Zustand untersucht.

Tyrosinvarianten im nativen, unbestrahlten Zustand

Die Tyrosine Y17 und Y29 sind nur in den γ - nicht aber in den β -Kristallinen konserviert und gehören zu den Paaren der aromatischen Aminosäuren, die strukturell nicht innerhalb eines greek key Motives liegen [183]. Kong et al. [183] haben gezeigt, dass die Varianten Y17A und Y29A eine ähnliche β-Faltblattstruktur wie der Wildtyp hyD besitzen und sich weder deren thermische noch chemische Stabilität i.V. zum Wildtyp stark verändern. Die Stabilität des Proteins wird also hauptsächlich durch die hoch konservierten greek key Paaren, nicht aber durch die Interaktion von Y17 und Y29, bestimmt [183, 184]. Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass sich das Rückgrat und die Tertiärstruktur durch die Substitution von Tyrosin mit Alanin für die Varianten Y17A, Y29A und Y17AY29A i.V. zum Wildtyp nur in der Nähe der ersetzen Aminosäuren und nur innerhalb der Ntd geringfügig ändert (Abb. 17, Abb. 73 & Abb. 74). Obwohl sich weder die biochemischen Eigenschaften der Varianten, noch deren Rückgrat, Tertiärstruktur oder Fluoreszenzverhalten (Abb. 37b) i.V. zum Wildtyp stark verändern, treten Unterschiede in deren Langzeitstabilität bzgl. Aggregation und den aromatischen Seitenketten auf (Abb. 25, Abb. 82 & Abb. 83, Tabelle 16).

Im Vgl. zum Wildtyp sind sowohl bei den aromatischen ¹H¹³C HSQC Spektren der Variante Y17A(Abb. 25) als auch der Variante Y29A (Abb. 82) zusätzlich zu den eigenen, nicht mehr vorhandenen Kreuzsignalen, auch die der jeweiligen gestapelten Partner Y29 ϵ * bzw. Y17 ϵ * betroffen. Diese befinden sich nicht mehr an ihren ursprünglichen Positionen. Analoges gilt für die jeweiligen Mehrfachpeaks der Y δ *, deren Intensitäten durch die Punktmutationen reduziert werden und mit dem Erscheinen eines jeweiligen neuen Kreuzsignals in dem Bereich der Y δ * Signalen einhergehen.

Bei der Variante Y17AY29A (Abb. 83) fehlen zwar die jeweiligen Kreuzsignale an den Y ϵ^* Positionen und die Intensitäten der jeweiligen Mehrfachpeaks an den Y δ^* Positionen sind reduziert, es treten dabei aber keine zusätzlichen Kreuzsignale auf. Daher ist davon auszugehen, dass die an den Positionen Y δ^* und Y ϵ^* auftretenden zusätzlichen starken Signalen der Varianten Y17A bzw. Y29A nur durch die Aminosäuren Y29 bzw. Y17 hervorgerufen werden.

Wahrscheinlich werden in den Varianten Y17A bzw. Y29A durch das Verschwinden des Stackingpartners die chemische Umgebung des nun "freien" und isolierten Partners Y29 bzw. Y17 verändert. Dies resultiert in einer neuen Protonen-Kohlenstoff Position, deren Intensität i.V. zu den restlichen Kreuzsignalen aufgrund der größeren Flexibilität erhöht ist. Dabei sind die Intensitäten der verschobenen Kreuzsignale für die Variante Y17A an der Y ϵ^* bzw. Y δ^* Position um den Faktor 4,4 ± 1,7 bzw. 3,9 ± 0,5 i.V. zu den Intensitäten der jeweiligen restlichen Kreuzsignale erhöht, während die Faktoren für die Variante Y29A 2,0 ± 0,8 bzw. 1,7 ± 0,3 betragen. Dies deutet darauf hin, dass beim Fehlen des entsprechenden Stackingpartners die erhöhte Flexibilität von Y17 durch die Wechselwirkung mit der Thiolgruppe von C19 geringer als die der Aminosäure Y29 ist.

Interessant ist weiterhin, dass in den jeweiligen aromatischen Spektren einen leichte bzw. starke chemische Verschiebung der jeweiligen zugeordneten H16/23 ϵ_1 bzw. H16&23 δ_2 Kreuzsignals zu beobachten ist. Dabei hat die Variante Y17A einen größeren Einfluss auf das Signal von H ϵ_1 und Y29A einen größeren Einfluss auf das Signal von H δ_2 . Dies ist im Einklang mit der atomaren Struktur von h γ D (Abb. 46). Dort befinden sich jeweils der
Kohlenstoff von H23 an der Position ε_1 in der Nähe der Hydroxygruppe des aromatischen Ringes von Y17 bzw. der Kohlenstoff von H23 an der Position δ_2 in der Nähe der Hydroxygruppe des aromatischen Ringes von Y29.

Einfluss von UV-B Strahlung auf die Tyrosinvarianten

Sowohl der Wildtyp als auch die Tyrosinvarianten zeigen keine UV-induzierten Änderungen im Proteinrückgrat und in ihrem Fluoreszenzverhalten (Abb. 37b; Abb. 86b & Abb. 87). Die Bestrahlung mit UV-B hat also keine größeren strukturellen Änderungen bzw. Schädigung der Trytophane im löslichen Anteil der Probe hervorgerufen. Im Gegensatz dazu treten, abhängig von der Variante, deutliche Unterschiede in den aromatischen Ringsystemen (Abb. 47 & Abb. 94 - Abb. 96) und in der Aggregationsanfälligkeit auf (Tabelle 16 & [100])

Bei der Variante Y17A treten im aromatischen Spektrum keine Veränderungen nach UV-Bestrahlung auf. Dabei befinden sich die bereits im unbestrahlten Zustand verschobenen Kreuzsignale Y δ^* und Y ϵ^* der Aminosäure Y29 an den fast identischen Positionen wie die durch UV-B hervorgerufenen Zusatzsignale des Wildtyps. Die Variante Y17A scheint also ein Mimik für das bestrahlte h γ D darzustellen. Sie besitzt bereits im nativen Zustand die gleichen bzw. ähnlichen Änderungen in den aromatischen Ringsystemen wie der UV-induzierte Zustand B und/oder B* von Wildtyp h γ D. Bei der Variante Y29A erscheinen durch UV-Bestrahlung zusätzliche Kreuzsignale. Diese werden wahrscheinlich durch eine Population B und/oder B* mit einem flexibleren Y17 hervorgerufen.

Schafheimer & King et al. [100] beobachten eine i.V. zum Wildtyp stark verlangsamte UVinduzierte Aggregation der Varianten Y17A, nicht aber der Variante Y29A. Gleichzeitig wurde im Rahmen dieser Dissertation die These aufgestellt, dass der Zustand B im Gegensatz zu B* weniger zur Aggregation neigt (5.2.2.3). Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Variante Y17A bereits im unbestrahlten Zustand dem UV-induzierten Zustand B und die bestrahlte Variante Y29A eher dem Zustand B* entspricht. Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Dissertation nachgewiesen werden, dass die UV-induzierten Zusatzsignale an den Positionen Y δ^* und Y ϵ^* wahrscheinlich nur durch die Tyrosine Y17 und Y29 hervorgerufen werden, da die aromatischen Spektren der Variante Y17AY29A weder im unbestrahlten noch im bestrahlten Zustand die zum Wildtyp analogen UV-induzierten Zusatzsignale zeigen.

Möglicher Schutzmechanismus von hyD gegenüber UV-B Strahlung

Die Oxidation von C19 durch ROS verändert wahrscheinlich das aromatische Stapelverhalten der beiden Tyrosine Y17 und Y29. Dieser UV-B induzierter Zustand ist allerdings mindestens genauso stabil bzgl. Aggregation [100] wie das unbestrahlte $h\gamma D$. Somit kann man argumentieren, dass dieser Vorgang eine weitere Schutzfunktion durch die Deaktivierung von ROS in der Linse darstellt. Die UV-B Strahlung führt also zu einer funktionell unbedeutenden Veränderung in $h\gamma D$, statt zu weiteren indirekten Schädigungen wie Oxidationsprozessen, Ausbildung von Radikalen und Ringöffnungen der Kristalline [51]. Diese können Proteinaggregation hervorrufen. Dabei sind Y17 und Y29 in allen γ -Kristallinen

hoch konserviert [183], während das C19 in humanen und bovinen γ -Kristallinen zu 82% vorhanden ist [186].

Übergreifende Aspekte

Der Y17/C19/Y29/H23 Cluster nimmt eine wichtige Rolle bei der Aggregation und UV Schädigung von Wildtyp hyD ein. Dabei wurden bis jetzt in der Literatur zwei unterschiedliche Vorgänge identifiziert: die Zn (II) induzierte Aggregation von hyD [187] und die photoinduzierte sauerstoffabhängige Aggregation von hγD [100]. Bei der Zn (II) induzierten Aggregation haben Dominguez-Calva et al. [187] H23 und das benachbarte C19 als Zn (II) bindendes Motiv von hyD identifiziert. Es wird argumentiert, dass durch die Bindung von Zn (II) an H23 und C19 eine Dimerausbildung des monomeren hyD's induziert wird, was zur Aggregation führt. Bei der UV-Strahlung induzierten Aggregation spielen die Y17 und Y29 eine wichtige Rolle, da diese die einzigen oberflächenexponierten aromatischen Aminosäuren von hyD mit einem Cystein und Histidin in deren unmittelbarer Nähe sind. Daher ist es möglich, dass diese Aminosäuren vermehrt mit molekularem Sauerstoff reagieren und deren Seitenketten an der radikalen Photochemie teilnehmen [188, 189]. Dies kann zu Vernetzung und Photoaggregation führen [51, 100]. Schafheimer & King et al. [100] argumentieren, dass zum einen die Thiol-Gruppe von C19 mit dem durch UV-B Strahlung angeregten Y17 reagiert. Dabei entstehen entweder Thiol und/oder Tyrosylradikale, die zur Aggregation von $h\gamma D$ führen können. Zum anderen ist eine konkurrierende Seitenkettenreaktion wahrscheinlich, bei der die Oxidation von C19 durch ROS (reactive oxygen species) hervorgerufen wird. Dabei entsteht eine stabile, chemisch veränderte Spezies von hyD.. Diese Seitenkettenreaktion wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit durch die Identifizierung der UV-induzierten Zusatzsignale der Zustände B und B* im aromatischen Spektrum indirekt nachgewiesen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich durch UV-B Bestrahlung von Wildtyp $h\gamma D$ unterschiedliche Populationen im löslichen Überstand ausbilden. Die native, unveränderte Population A und die UV-induzierten, chemisch modifizierte Populationen B und B*. Diese Zustände B und B* sind an den betroffenen Tyrosinen lokal hoch flexibel, besitzen intakte Ringsysteme und zeichnen sich durch eine veränderte Wechselwirkung zwischen den im unbestrahlten Zustand gestapelten Tyrosinen Y17 und Y29 aus. NMR-spektroskopisch sind beide Zustände nicht unterscheidbar, wobei B über mehrere Monate stabil in Lösung bleibt und B* aggregiert (Abb. 62).

 $A \xrightarrow{\downarrow UV-B} A + B + B^* + Aggregate$ $\bigcup_{\substack{I \\ Aggregate}} t$

Abb. 62: Schema der unterschiedlichen Zustände von Wildtyp h $_{\gamma}$ D vor und nach UV-B Bestrahlung.

Zusätzlich wurde die Variante Y17A als UV-B mimikender Zustand B des bestrahlten Wildtyps identifiziert. Die von *Schafheimer & King et al.* postulierten UV-induzierten Modifikationen an den Tyrosinen [106] oder den weiteren aromatischen Aminosäuren im löslichen Anteil des Proteins konnten NMR spektroskopisch nicht gefunden werden.

Die Energieabsorption der UV-B Strahlung kann als Seitenkettenreaktion der radikalen Photochemie zu einer chemischen Modifikation von C19 führen Dabei oxidiert die Thiolgruppe des Cysteins zur Sulfin- bzw. Sulfonsäure [100, 106]. Für die Zustände B und B* ist es wahrscheinlich, dass sich die Wechselwirkung des aromatischen Ringes von Y17 mit der sich im direkten Kontakt befindenden UV-B induzierten oxidierten Thiolgruppe von C19 verändert [100]. Dadurch kann das aromatische Stacking von Y17 und Y29 beeinträchtigt werden, wodurch sowohl Y17 als auch Y29 von h γ D eine erhöhte Flexibilität aufweisen. Beide Zustände B und B* besitzen also wahrscheinlich intakte Tyrosine, ein chemisch verändertes C19 und bilden keine, bei der Photoaggregation von h γ D nachgewiesene, Dimere [106, 127, 128] bzw. Radikale [51, 100-103] aus.

5.2.3. hyD in Anwesenheit einer Kristallinmischung aus humanen Augenlinsen

Nicht nur das h γ D, sondern auch α - , β - und alle γ -Kristalline haben eine schützende Funktion vor UV-B induzierten Schädigungen der Linsenkristallinen und der Retina [47, 80, 92, 111, 113, 117, 119, 181, 182, 190]. Weiterhin besitzt die Linse eine Vielzahl an Metaboliten, die zur Verhinderung von photooxidativen Schädigungen der Linsenproteinen beitragen [89, 94, 95, 98, 101, 102]. Diese haben in diesem Messsystem keinen Einfluss auf das h γ D, da sie durch die Probenherstellung entfernt worden sind. Somit sollte man bei der Bestrahlung von isotopenmarkierten h γ D in Anwesenheit einer Kristallinmischung aus pathogenen, humanen Linsen den schützenden Einfluss aller Kristalline vor UV-B induzierten Schädigungen bzw. Modifikationen am h γ D beobachten können. Zwar ist der Anteil an α -Kristallin in der an Katarakt erkrankten Linse stark reduziert (Abb. 27), wodurch nur noch eine geringe Chaperonaktivität stattfinden kann [190]. Ein Großteil der β - und γ -Kristalline sind aber erhalten geblieben. Diese sollten durch ihren hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren die eingestrahlte UV-B Energie absorbieren und dissipieren können [47, 80, 106, 113, 119], wodurch die effektive Strahlendosis von dem NMR-spektroskopisch gemessenen h γ D

Tatsächlich sind in den gemessenen ${}^{1}H^{15}N$ TROSY-HSQC Spektren von hyD im Linsenhintergrund (Abb. 48), analog zum freien hyD, keine Unterschiede nach UV-B Bestrahlung zu erkennen. Dagegen sind die UV-induzierten Zusatzsignale der Zustände B und B* in den aromatischen ${}^{1}H^{13}C$ HSQC Spektren in Anwesenheit des pathogenen Linsenhomogenats im Gegensatz zum freien hyD deutlich reduziert bzw. befinden sich im Rauschen (Abb. 49 & Tabelle 17). Das hyD wird also wie erwartet durch das pathogene Linsenhomogenat vor der UV-Strahlung geschützt. Dabei werden wahrscheinlich durch die Anwesenheit der β - und γ -Kristalline in der Kristallinmischung aus humanen Augenlinsen ein Großteil der eingestrahlten Energie durch die aromatischen Aminosäuren absorbiert und dissipiert [119]. Somit wird der Anteil an UV-induzierten ROS stark verringert [106]. Dadurch wird nicht nur die Wahrscheinlichkeit einer weiteren indirekten Schädigung der Kristalline reduziert [51]. Es wird weiterhin auch die kompetitive Deaktivierung des bereits verringerten Anteils an ROS auf die γ -Kristalline A, B, S und D aus den humanen Augenlinsen und dem isotopenmarkierte hyD verteilt. Somit ist die Menge an UV-induzierter Zusatzpopulationen der markierten Probe stark reduziert.

5.3. Einfluss von UV-B Strahlung auf weitere Katarakt verursachende Varianten von hγD

5.3.1. W43R hγD

Die pathogene hγD Variante W43R zeigt i.V. zu ihrem Wildtyp aufgrund der Punktmutation im Proteininneren von einer hydrophoben mit einer geladenen Aminosäure unterschiedliche biochemische und strukturelle Eigenschaften: Eine verringerte thermische Stabilität, eine erhöhte oxidationsabhängige Aggregationsanfälligkeit und Zugänglichkeit für Proteaseverdau, sowie eine Population mit entfalteter Ntd und gefalteter Ctd [72, 73, 78]. Weiterhin hat sie einen Teil ihres photoprotektiven Schutzmechanismus gegenüber UV-Strahlung durch den Intradomänen FRET in der Ntd verloren. Dabei hat sich die Ausrichtung der Seitenketten von den aromatischen Aminosäuren, in der Ntd bis auf das Fehlen von dem Donor W43 nur leicht und in der Ctd überhaupt nicht verändert.(Abb. 21).

Die Variante W43R ist sowohl bei UV-B Strahlung (Tabelle 16) als auch bei UV-C Strahlung [72] aggregationsanfälliger als der bestrahlte Wildtyp. Dies kann auf den nur noch in der Ctd stattfindenden Intradomänen FRET [80, 119, 182] und die damit verbundene höhere Wahrscheinlichkeit für strahlungsinduzierte direkte und indirekte Schädigungen des Proteins zurück zu führen sein. Die Schädigungen beinhalten z.B. Oxidation von Seitenketten, Ausbildung und Wechselwirkung mit Radikalen, kovalenten Schädigungen, Neubildung von Disulfidbindungen und Fragmentierung [47, 97-99, 106, 125, 127, 129, 130].

Obwohl W43R nach UV-B Bestrahlung aggregationsanfälliger als im unbestrahlten Zustand ist, verändert sich das Fluoreszenzverhalten der bestrahlten und unbestrahlten Probe kaum (Abb. 37(a)). Im löslichen Anteil der bestrahlten Variante W43R befinden sich keine durch Fluoreszenz messbaren, chemisch modifizierten aromatischen Aminosäuren und/oder es findet keine Veränderung der hydrophoben Umgebung der verbleibenden drei Tryptophane statt. Der lösliche Anteil der bestrahlten W43R ist also weder entfaltet, noch hat sich deren Struktur verändert, da NMR-spektroskopisch weder im Rückgrat (Abb. 51) noch in den aromatischen Seitenketten (Abb. 52 & Abb. 54) deutliche Unterschiede zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Proben auftreten. Eine geringe Population aus teilweise entfaltetem Protein, wie von *Ji & Gronenborn et al.* [73] für W43R im unbestrahlten Zustand postuliert wird, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Diese könnte, in ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren, z.B. durch Amidprotonenaustausch, analog zum Wildtyp hyD (5.2.2), nicht detektiert werden.

Im Vergleich zum Wildtyp h γ D treten bei der als UV-C mimikende postulierten Variante W43R [73] bereits im unbestrahlten Zustand die UV-B induzierten Zusatzsignale im aromatischen ${}^{1}H^{13}C$ HSQC an den Positionen Y δ^* , Y ϵ^* und H ϵ_1 auf (Abb. 41 & Abb. 52). Gleichzeitig sind im Gegensatz zur UV-B mimikenden Variante Y17A (5.2.2.4) die Kreuzsignale von Y17 ϵ^* und Y29 ϵ^* sowohl im unbestrahlten als auch im bestrahlten Zustand von W43R vorhanden und es findet eine Intensitätserhöhung des UV-B induzierten Kreuzsignals Y δ^* um (31 ± 8) % statt. Die beim Wildtyp beobachtete Populationen B und/oder B* existieren also bei der Variante W43R bereits im unbestrahlten Zustand und nehmen durch UV-B Bestrahlung zu.

Die Variante W43R besteht also im unbestrahlten Zustand aus mindestens drei unterschiedlichen detektierbaren Zuständen A_{W43R}, B und C (Abb. 63). Dabei sind die Populationen A_{W43R} und C bereits von Ji & Gronenborn et al. [73] charakterisiert. Die Population B wurde im Rahmen dieser Dissertation zum ersten Mal für die Variante W43R gemessen. Die unbestrahlte Population A_{W43R} zeigt i.V. zum Wildtyp in der Ntd große Änderungen der Amidsignale, insbesondere für die Aminosäuren am Interface zur Ctd (Abb. 13), ähnelt aber strukturell der Kristallstruktur des Wildtyps. Einziger Unterschied ist eine leicht veränderte relative Orientierung der beiden Domänen [73]. Die UV-B induzierte Population B, hat eine geringe Aggregationsanfälligkeit und besitzt intakte aromatische Ringsysteme. Sie wird im Wildtyp durch die Oxidation von C19 als konkurrierende Seitenkettenreaktion zur UV-B induzierten, sauerstoffabhängigen Aggregation von hyD erzeugt [100]. Dabei werden die an der Oberfläche von hγD gestapelten Y17 und Y29 durch die veränderte Wechselwirkung von Y17 mit dem oxidierten C19 flexibler und erscheinen als zusätzliche Y δ^* und Y ϵ^* Signale im aromatischen ¹H¹³C HSQC ([100] & 5.2). Es ist wahrscheinlich, dass die zusätzlichen Signale der Population B in der unbestrahlten Variante W43R nicht durch die Oxidation von C19 hervorgerufen werden, sondern dass sich die Ausrichtung von H23 und C19 aufgrund der Punktmutation leicht verändert hat (Abb. 21 & Abb. 46). Dies kann im nativen Zustand von W43R zu einer veränderten Wechselwirkung von Y17 mit C19 führen, die eine NMR-spektroskopisch messbare, zur UV-B induzierten analogen Population B von hyD mit flexibleren Y17 und Y29 hervorruft. Beim Vergleich der Kristallstrukturen von W43R (4GR7) mit Wildtyp hyD (1HK0) bzw. seiner NMR-Struktur (2KLJ) konnte nur eine leicht veränderte Orientierung der Thiolgruppe von C19, nicht aber eine veränderte Ausrichtung der an der Oberfläche gestapelten Aminosäuren Y17 und Y29 identifiziert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass diese leicht veränderte Orientierung im unbestrahlten Zustand zu einer kleinen Population aus flexiblerem Y17 und Y29 führt, die zwar NMR-spektroskopisch messbar ist, aber entweder nicht auskristallisiert oder zu gering populiert ist, um bei der Ensemblemessung und Bestimmung der Kristallstruktur ins Gewicht zu fallen. Die in der Ntd entfaltete geringe Population C entspricht dem Effekt von Photoschädigung durch UV-C Strahlung [73] und führt durch eine interne Disulfidbindung Cysteinen C33 und C42 Dimerisierung zwischen den zur und somit zur oxidationsabhängigen Aggregation [78, 79, 81].

Im Vergleich zur unbestrahlten Variante W43R erhöht sich deren Population B nach Bestrahlung um 30%. Dies wird wahrscheinlich analog zum Wildtyp durch Oxidation von C19 hervorgerufen und kann somit eine konkurrierende Reaktion zu den ROS induzierten Schädigungen von weiteren Aminosäuren darstellen [100]. Trotz dieser Schutzfunktion vor indirekter UV-B Schädigung ist die pathogene Variante W43R i.V. zum Wildtyp h γ D anfälliger gegenüber UV-B induzierter Aggregation. Die Punktmutation löst bereits im unbestrahlten Zustand eine reduzierte biochemischen Stabilität [72, 73, 78], oxidationsabhängige Aggregation einer teilweise entfalteten Population C [73, 78, 79] und eine reduzierte Energiedissipation durch Intradomänen FRET und Quenching [80, 119, 182] aus. Zwar konnte im löslichen Anteil der bestrahlten Probe kein Hinweis auf chemisch modifizierte aromatische Aminosäuren gefunden werden, es ist aber nicht auszuschließen, dass sich diese Populationen bereits im aggregierten Zustand befinden.

$$A + B + C \xrightarrow{\downarrow} A + B + B^* + C + Aggregate$$

$$\bigcup_{\substack{I \\ Aggregate}} t \quad \bigcup_{\substack{I \\ Aggregate}} t$$

Abb. 63: Schema der unterschiedlichen Zustände von W43R vor und nach UV-B Bestrahlung.

Da die weiteren Tryptophanvarianten W69A, W131A und W157A physiologisch nicht relevant sind, wird hier nur kurz auf sie eingegangen. Im unbestrahlten Zustand ist die Fluoreszenzintensität der Donorvarianten W43R und W131A analog zu den Varianten W43F und W131F i.V. zum Wildtyp stark reduziert ([80]; Abb. 37(a) & Abb. 38(b)). Dies spiegelt, zusätzlich zu dem 25% fehlenden Anteil an Tryptophan, der nicht zur Absorption und Emission beitragen, den Intradomänen FRET innerhalb der Ntd bzw. Ctd wider. Dabei regt im Wildtyp das blauverschobene Fluoreszenzspektrum des Donors [80] zusätzlich zu der eingestrahlten Wellenlänge den jeweiligen Akzeptor an und trägt somit zu einer insgesamt größeren Emission bei. Diese ist bei einem fehlenden Donorpartner reduziert. Obwohl bei einem fehlenden Akzeptor 25% der Tryptophane, die zur Absorption und Emission beitragen nicht vorhanden sind, ist die Fluoreszenzintensität i.V. zum Wildtyp erhöht (Abb. 38(b) & [80]). Durch das Fehlen eines Akzeptors kann die Anregungsenergie nicht über seinen Indolring auf dessen Rückgrat strahlungslos abgegeben werden [80, 117, 119, 182]. Es findet also jeweils in der entsprechenden Domäne kein Quenching statt, was die Fluoreszenzintensität drastisch erhöht. Alle Tryptophanvarianten haben eine ähnliche UV-B sich die induzierte Aggregationsanfälligkeit, wobei Stabilität der unbestrahlten Tryptophanvarianten unterscheiden. Varianten, deren Donor fehlen, sind im unbestrahlten Zustand aggregationsanfälliger als Varianten, deren Akzeptor substituiert worden ist (Tabelle 16). Interessanterweise verändert sich das Fluoreszenzverhalten von W43R durch UV-B Strahlung im Gegensatz zu den restlichen Tryptophanvarianten kaum (Abb. 37(a) & Abb. 38(b)). Für die Varianten W69A, W131A und W157A hat sich die Fluoreszenz nach Bestrahlung im Überstand deutlich verringert (Abb. 38(b)), wobei die Varianten W69A und W157A mit jeweils einem ersetzen Akzeptor einen geringeren Fluoreszenzintensitätsverlust als die Donorvariante W131A haben. Möglicherweise wird aufgrund der strukturellen Ånderungen durch die Punktmutationen von h γ D das Tryptophan W43 anfälliger gegenüber chemischer Modifikation durch UV-B Strahlung. Dadurch könnte für die drei Trytophanvarianten das Intradomänen FRET in der Ntd reduziert und somit die Fluoreszenzintensität analog zu den unbestrahlten Varianten W43R und W131A i.V. zum Wildtyp reduziert werden. Im Gegensatz zu der pathogenen Variante W43R treten für die Varianten W69A und W157A eine UV-B induzierte Population B und/oder B* erst nach der Bestrahlung auf. Für die Variante W131A kann aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration keine eindeutige Aussage gemacht werden (Abb. 53 & Abb. 89 - Abb. 91). Die durch die Punktmutationen ausgelösten strukturellen Änderungen der Variante W157A in der Ctd bzw. der Variante W69A in der Ntd haben also im Gegensatz zur Variante W43R keinen direkten Einfluss auf die Wechselwirkung von C19 mit Y17 im nativen Zustand. Zusätzlich kann wahrscheinlich aufgrund der gewählten Messbedingungen analog zur Variante W43R keine teilweise oder komplett entfaltete Population der drei Tryptophanvarianten im unbestrahlten oder bestrahlten Zustand detektiert werden (Abb. 85 & Abb. 86 (a)).

5.3.2. E107A hγD

Die pathogene, vererbbare Variante E107A verursacht bereits im Kindesalter Katarakt [71]. Sie besitzt i.V. zum Wildtyp hyD bis auf einen erhöhten isoelektrischen Punkt eine fast identische Proteinlöslichkeit, biochemische Eigenschaften, thermische Stabilität und Proteinstruktur [69, 83] & (Abb. 14, Abb. 22 & Abb. 100). Aufgrund des erhöhten pl's und der damit verbundenen erhöhten positiven Ladung von E107A bei physiologischen pH wird eine veränderte bzw. erhöhte elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Variante und dem negativ geladenen α -Kristallin postuliert [69, 71]. Dies kann im Rahmen dieser Dissertation in einem für die Linse niedrigen Konzentrationsbereich von 18-30 mg/ml nicht bestätigt werden (Kapitel 5.1),. Banerjee et al. [69] haben hingegen bei Konzentrationen von bis zu 275 mg/ml eine erhöhte Wechselwirkung von E107A mit dem α -Kristallin beobachtet. Der durch die Variante E107A verursachte Katarakt scheint nicht primär durch eine verstärkte Bindung des α-Kristallins an die Variante und damit zur Erschöpfung des begrenzten Vorrates an α -Kristallins zur Verhinderung weiterer Aggregationsprozessen in der Linse [164, 165, 168, 170] verknüpft zu sein. Hingegen führt die leicht stärkere attraktive Wechselwirkung mit dem a-Kristallin bei höheren Konzentrationen zur Phasentrennung und Lichtstreuung aufgrund von Dichtefluktuationen im Brechungsindex [69].

Der Einfluss von UV-B Strahlung auf die Variante E107A wurde, soweit bekannt, noch nicht untersucht. Obwohl die Variante i.V. zum Wildtyp die gleichen biochemischen Eigenschaften und eine beinahe identische Struktur aufweist, ist bis jetzt nicht bekannt, ob sie auch das gleiche Verhalten bzgl. UV-induzierten Stress zeigt.

Es treten analog zum Wildtyp nur geringfügig biochemische detektierbare UV-induzierte Änderungen von E107A auf: eine leicht erhöhte Aggregationsanfälligkeit der bestrahlten Probe (Tabelle 16) und eine minimal verringerte, leicht rot verschobene Fluoreszenzintensität (Abb. 37 (a)). Insgesamt lässt sich also analog zum Wildtyp kein großer Effekt bzgl. Faltung, chemischer Modifikation der Tryptophane und Langzeitstabilität feststellen.

Mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Methoden, lassen sich im Gegensatz zu den hier verwendeten biochemischen Methoden bereits geringe UV-B induzierte Änderungen auf atomarer Ebene klarer herausarbeiten. Im unbestrahlten Zustand sind sowohl das Rückgrat (Abb. 14), als auch die aromatischen (Abb. 22) und aliphatischen (Abb. 100) Seitenketten bis auf einige wenige Kreuzsignale fast identisch zum Wildtyp. Somit besitzt sowohl der Wildtyp als auch E107A im nativen Zustand die gleiche Struktur. Zusammengefasst lassen sich nach UV-B Bestrahlung unterschiedliche Zustände in der Lösung für die Variante E107A detektieren: analog zum Wildtyp der native, unbestrahlte Zustand A, die UV-induzierten Zustände B und B*, deren Population um etwa den Faktor vier erhöht ist und zusätzlich die entfalteten Populationen D und D* (Abb. 57). Diese konnten im Rahmen dieser Dissertation für den Wildtyp nicht detektiert werden.

Prinzipiell ergibt sich für die UV-induzierten Zusatzsignale der Zustände B und B* der Variante E107A das gleiche Bild wie beim Wildtyp. Die i.V. zum unbestrahlten Zustand erhöhte Intensität fällt innerhalb eines Monats auf ~ 30 - 50% des ursprünglichen Wertes ab, bleibt dann aber über einen Zeitraum von mind. 3 Monaten erhalten (Abb. 60). Im Laufe der Monate verringern sich zusätzlich zu den Intensitätsabnahmen auch die erhöhten Protonenlinienbreiten (Abb. 61). Wie beim Wildtyp hyD scheinen auch die bei der Variante

E107A UV-B induzierten Zustände B und B* chemisch modifiziert zu sein. Dabei ähneln sich beide Zustände so stark, dass sie NMR-spektroskopisch aufgrund ihrer chemischen Verschiebungen nicht unterscheidbar sind und ein verbreitertes Signal liefern. Falls die Population B* i.V. zum UV-induzierten Zustand B instabiler ist, tendiert sie stärker zur Aggregation. Dies führt zu einer verringerten Linienbreite und Intensität der Zusatzsignale. Nach einem Zeitraum von ein bis drei Monaten besteht die UV-induzierte Population, mit einem Anteil von ~ 30 - 50% des ursprünglichen Signals, nur noch aus dem langzeitstabilen Zustand B, während B* aggregiert ist. Obwohl der relative Intensitätsunterschied direkt nach der Bestrahlung zwischen den UV-induzierten Zusatzpeak und den restlichen Tyrosinsignalen von E107A um etwa dem Faktor vier größer als beim Wildtyp ist (Tabelle 17), lässt sich aufgrund des hohen Rauschens im aromatischen Spektrum weiterhin keine genaue Abschätzung über die tatsächliche Populationsgröße treffen.

Die UV-induzierten Zusatzsignale Y δ^* , Y ϵ^* und H ϵ_1 von E107A befinden sich an den gleichen Positionen im aromatischen Spektrum wie die vom UV-B bestrahlten Wildtyps. Daher ist davon auszugehen, dass die Zustände B und B* strukturell identisch sind und durch die gleiche molekulare Ursache hervorgerufen wird: Durch die Oxidation von C19 und die damit veränderte Wechselwirkung mit Y17 wird auch die Interaktion zwischen den im nativen Zustand gestapelten Tyrosinen Y17 und Y29 verändert. Dadurch entstehen NMR-spektroskopisch detektierbare, an den Positionen Y17 und Y29 flexiblere, Populationen B und B*.

Zusätzlich zu den UV-induzierten Populationen B und B*, gibt es für die Variante E107A Hinweise auf weitere UV-B induzierte, entfaltete Populationen D und D*. Nach Bestrahlung von E107A lassen sich im Gegensatz zum Wildtyp geringe Änderungen in den Intensitäten der Kreuzsignale des Rückgrates i.V. zur unbestrahlten Probe feststellen (Abb. 55). Da sich die betroffenen Aminosäuren fast alle an der Oberfläche der C-terminalen Domäne befinden, könnte dies ein erster Hinweis auf eine zusätzliche, UV-induzierten destabilisierte Population D bzw. D* von E107A sein. Diese könnten aufgrund veränderter Wechselwirkungen von der Ctd mit der Ntd zu einer verringerten thermodynamischen Stabilität des Proteins führen. Dabei ist für den Wildtyp hyD in der Literatur bereits ein Intermediat aus entfalteter Ntd und gefalteter Ctd bekannt [43, 47, 78, 79, 81, 183, 184]. Zwar lässt sich im ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektrum der bestrahlten E107A Probe (Abb. 55) wahrscheinlich aufgrund von Amidprotonenaustausch kein Hinweis auf eine teilweise entfaltete Population D bzw. D* finden, diese wird aber in den aliphatischen und aromatischen ¹H¹³C HSQC Spektren sichtbar (Abb. 56 & Abb. 57). Für die aliphatischen Seitenketten der bestrahlten Probe treten i.V. zur unbestrahlten Probe zusätzlich zu den ursprünglichen Kreuzsignalen viele neue Signale auf. Dies entspricht einer weiteren UV-induzierten und möglicherweise entfalteten Spezies D bzw. D*. Außerdem treten in den aromatischen ¹H¹³C HSQC Spektren der Variante E107A zusätzlich zu den UV-induzierten Kreuzsignalen Y δ^* , Y ϵ^* und H ϵ_1 der Populationen B bzw. B* noch weitere Kreuzsignale auf (Abb. 57). Diese befinden sich in der Nähe der Positionen von freien aromatischen Aminosäuren, verschieben sich innerhalb eines Monats in deren Richtung und spalten sich auf (Abb. 58). Anscheinend befindet sich nach einem Monat zusätzlich zu der Population D eine noch stärker entfaltete Population D* in der Lösung. Zusammen liefern die Spektren des Rückgrats und der aromatischen und aliphatischen Seitenketten einen eindeutigen Hinweis auf UV-induzierte teilweise oder komplett entfaltete Populationen D und D*. Diese bestehen z.B. aus einer N-terminal entfalteten und C-terminal gefalteten Domäne.. Eine teilweise entfaltete Population wurde dabei bereits von Ji & Gronenborn et al. für den mit UV-C bestrahlte Wildtyp hyD postuliert [73]. Die durch UV-B Strahlung induzierte Population D von E107A ist auf Grund des starken Rauschens durch die relativen Intensitätsabnahmen der Kreuzsignale nicht abschätzbar.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen, dass die Variante E107A i.V. zum Wildtyp $h\gamma D$ anfälliger gegenüber UV-B Bestrahlung ist. Nach Bestrahlung bilden sich unterschiedliche Populationen im löslichen Überstand aus (Abb. 64). Analog zum Wildtyp die native, unveränderte Population A und die UV-induzierten, chemisch modifizierten Populationen B und B*. Diese besitzen intakte Ringsysteme, haben eine hohe lokale Flexibilität und sind, im Fall von Zustand B, über einen längeren Zeitraum nicht aggregationsanfällig. Obwohl die Populationen B und B* von E107A i.V. zum Wildtyp um den Faktor vier erhöht sind, ist die Gesamtpopulation wahrscheinlich immer noch zu gering, um sie quantitativ eindeutig aus den aromatischen ¹H¹³C HSQC Spektren bestimmen zu können. Im Gegensatz zum Wildtyp h γ D findet man bei der bestrahlten Variante E107A zusätzlich Hinweise auf Populationen im Zustand D und D*, die komplett oder teilweise entfaltet sind. Aufgrund der veränderten Wechselwirkung zwischen der N- und C-terminalen Domäne besteht die Möglichkeit, dass die Ntd weniger stabilisiert wird und sich ein Intermediat aus entfalteter Ntd und gefalteter Ctd ausgebildet hat [43, 47, 78, 79, 81, 183, 184].

$$A \xrightarrow{\bigcup UV-B} A + B + B^* + D + Aggregate$$
$$\bigcup_{t} t \qquad \bigcup_{t} t$$
Aggregate D*

Abb. 64: Schema der unterschiedlichen Zustände von E107A vor und nach UV-B Bestrahlung.

5.3.3. Die isolierten Einzeldomänen Ntd und Ctd

Die Einzeldomänen Ntd und Ctd besitzen ein gequenchtes Fluoreszenzverhalten (Abb. 38(a) & [43]), haben i.V. zum Wildtyp $h\gamma D$ eine reduzierte thermische und biochemische Stabilität [43, 116, 160, 161] und nach UV-B Bestrahlung, in einem Zeitraum von mehreren Tagen, eine erhöhte Aggregationsanfälligkeit (Tabelle 16). Dabei weist die Ntd i.V. zur Ctd und zum Wildtyp die geringste Stabilität auf.

Unterschiedliche biochemische Charakterisierungen der beiden isolierten Einzeldomänen deuten auf ein i.V. zum Wildtyp strukturell ähnlich gefaltetes Protein hin [43, 116, 160, 161] Dies kann mit Hilfe von verschiedenen NMR-spektroskopischen Methoden im Rahmen dieser Dissertation bestätigt werden. Die isolierten Einzeldomänen Ntd und Ctd besitzen jeweils sowohl für die Kreuzsignale des Rückgrats (Abb. 23 & Abb. 24) als auch für die aliphatischen (Abb. 101 & Abb. 102) und aromatischen Seitenketten (Abb. 23 & Abb. 24) eine sehr gute Dispersion mit größtenteils identischen Kreuzsignalen i.V. zum Volllängenkonstrukt h γ D. Zusätzliche Signale von z.B. entfalteten Populationen treten nicht auf. Daher ist davon auszugehen, dass beide isolierten Domäne vollständig gefaltet sind und eine fast identische Struktur wie die jeweiligen, durch einen flexiblen Linker miteinander verbundenen Domänen in h γ D besitzen. Geringe Unterschiede in den Spektren ergeben sich im Rückgrat der beiden Einzeldomänen jeweils für die Aminosäuren, die zum Interface zeigen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, in der die wichtige Rolle für die Wechselwirkung am Interface zwischen Ntd und Ctd zur Stabilisierung der gefalteten Ntd

und somit zur thermodynamischen Stabilität von Wildtyp hyD gezeigt worden ist [43, 47, 156, 157]. Außerdem sind die aromatischen Ringsysteme für die beiden Einzeldomänen i.V. zum Wildtyp so gut erhalten, dass man durch Übereinanderlegen beider Einzelspektren ein fast identisches Spektrum wie das vom Wildtyp erhält (Abb. 84). Somit sollten beide Einzeldomänen, wie bereits von *Mills et al.* [43] beobachtet wurde, unabhängig voneinander die Möglichkeit zur Energiedissipation der UV-Strahlung durch FRET und Quenching besitzen.

Die UV-B Strahlung hat unterschiedliche Einflüsse auf die Einzeldomänen. Die Ctd zeigt genau wie der Wildtyp nur eine minimale Fluoreszenzintensitätsverringerung, während sich bei der Ntd eine leichte Rotverschiebung des Emissionsmaximums und eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität i.V. zum unbestrahlten Zustand ergibt (Abb. 38 (a)). Somit verändern sich für die Ntd im Gegensatz zur Ctd oder dem Wildtyp entweder das Quenchingverhalten und/oder die Lösungsmittelzugänglichkeit der beiden Trp, z.B. ausgelöst durch Entfaltung.

Somit hat sich die Lösungsmittelzugänglichkeit der zwei Trp in der Ntd, evtl. durch teilweise Entfaltung des Proteins und/oder das Quenchingverhalten der Einzeldomäne Ntd im Gegensatz zum Wildtyp verändert. Weder die ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren (Abb. 88), noch die aliphatischen ¹H¹³C HSQC Spektren der Einzeldomänen (Abb. 103 & Abb. 104) vor bzw. nach Bestrahlung liefern dabei einen Hinweis auf eine Population aus teilweise entfaltetem Protein. Somit ist das unterschiedliche Quenchingverhalten die wahrscheinliche Erklärung. Analog zum Wildtyp ergeben sich keine detektierbare UV-B induzierten Änderungen für das Rückgrat (Abb. 88). Hingegen bilden sich bei der Einzeldomäne Ntd, nicht aber der Ctd UV-induzierte Zusatzsignale von Yδ^{*} und Yε^{*} der Populationen B und B^{*} aus (Abb. 45, Abb. 92 & Abb. 93). Die UV-B induzierte Populationen B bzw. B^{*} von hγD (Abb. 41) werden also wahrscheinlich durch Veränderungen in der Ntd und nicht der Ctd verursacht.

6. Zusammenfassung & Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurden unterschiedliche Effekte, die zur Augenlinsentrübung führen können am Beispiel des humanen γD-Kristallins und seinen Varianten untersucht.

Einer dieser Effekte ist die veränderte Wechselwirkung des Chaperons α -Kristallin mit den β und γ -Kristallinen der Linse. Dies kann zu einer verminderten Schutzfunktion der α -Kristalline und somit Linsentrübung führen. Die in der Literatur aufgrund des veränderten pl's postulierte veränderte Wechselwirkung zwischen der pathogenen Variante E107A und dem α -Kristallin konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels NMR-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden. Hingegen wurde die identische Struktur von Wildtyp h γ D und der Variante E107A durch nahezu gleiche NMR-Spektren bestätigt. Beide h γ D-Kristalline, Wildtyp und E107A, zeigen in einem Konzentrationsbereich von 18 - 30 mg/ml unter physiologischen Bedingungen oder mildem thermischen Stress keine starke Wechselwirkung sowohl mit h α B, als auch mit der an α -Kristallin reduzierten und angereicherten humanen Linsenlösung. Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine schwache transiente Wechselwirkung zwischen den beiden h γ D-Kristallinen und ihren Interaktionspartnern hin, bei der hauptsächlich lösungsmittelexponierte Seitenketten betroffen sind.

Ein stabiler Komplex zwischen dem α - und γ -Kristallin, der in anderen Arbeiten für unterschiedliche γ -Kristallin Variante postuliert wird, kann für die h γ D Variante E107A ausgeschlossen werden. Somit findet keine Erschöpfung des zur Verhinderung weiterer Aggregationsprozesse benötigten Vorrates an α -Kristallin durch die Variante E107A statt.

Ein weiterer Effekt, der einen Hauptrisikofaktor zur altersbedingten Kataraktentstehung darstellt, ist die UV-Strahlung. Im Rahmen dieser Arbeit konnten für den Wildtyp h γ D mittels NMR-spektroskopischer Methoden unterschiedliche Zustände im löslichen Anteil des UV-B bestrahlten Kristallins detektiert werden: Der native, unveränderte Zustand A und die UV-induzierten, chemisch modifizierten Zustände B und B*. B und B* sind an den betroffenen Tyrosinen lokal hoch flexibel, besitzen intakte aromatische Ringsysteme und zeichnen sich durch eine veränderte Wechselwirkung zwischen den im unbestrahlten Zustand aromatisch gestapelten Y17 und Y29 aus. Der Zustand B ist im Gegensatz zu B* über Monate stabil gegenüber Aggregation. Dabei zeigt die h γ D Variante Y17A die gleichen Charakteristika wie der Zustand B und kann somit als Mimik dieses Zustandes angesehen werden.

Bei der pathogenen Variante W43R, die i.V. zum Wildtyp h γ D anfälliger gegenüber UV-B induzierter Aggregation ist, wird bereits ohne Bestrahlung zusätzlich zum nativen Zustand A zu einem kleinen Anteil der Zustand B populiert. Dieser nimmt nach Bestrahlung um rund 30% zu. Dabei wird wahrscheinlich der Zustand B unter nicht bestrahlten Bedingungen aufgrund der Punktmutation hervorgerufen. Die Zunahme des Zustandes B nach Bestrahlung ist hingegen analog zum Wildtyp auf die Oxidation von C19 und somit veränderter Wechselwirkung von Y17 und Y29 zurückzuführen. Auch die pathogene Variante E107A ist i.V. zum Wildtyp h γ D anfälliger gegenüber UV-B Strahlung. Nach Bestrahlung treten zusätzlich zu den bereits detektierten Zuständen A, B und B* die teilweise oder komplett entfalteten Zustände D und D* auf, wobei der Anteil der Zustände B und B* i.V. zum Wildtyp um den Faktor vier erhöht ist. Die in anderen Arbeiten postulierten, UV-induzierten chemischen Modifikationen einzelner aromatischer Aminosäuren konnten im löslichen Anteil der UV-B bestrahlten Proben mittels CD- und NMR-spektroskopischer Methoden nicht nachgewiesen werden.

Die Entstehung des UV-induzierten Zustandes B scheint also eine weitere Schutzfunktion des $h\gamma$ D-Kristallins gegenüber UV-B Strahlung darzustellen. Auf Grund der der konservierten Positionen von Y17 und Y29 in der Tertiärstruktur ist dieser Schutzmechanismus auch für alle weiteren γ -Kristallinen anzunehmen. Dabei werden durch die kompetitive Deaktivierung der Reaktiven Sauerstoffspezien mittels Oxidation von C19 weitere indirekte Schädigungen und somit Aggregation der Kristalline verhindert. Die Oxidation von C19 führt hierbei zu den NMR-spektroskopisch nachweisbaren veränderten Wechselwirkung der gestapelten Y17 und Y29.

Da es sich bei der Linse um ein sehr komplexes System handelt und eine Fülle an unterschiedlichen Mechanismen zur Linsentrübung führen können, bedarf es noch eine Vielzahl an weiteren wissenschaftlichen Studien, um die Entstehung von Katarakt vollständig zu verstehen. Ein Hauptaugenmerk sollte dabei insbesondere auf Untersuchungen in den physiologisch relevanten Konzentrationsbereichen von bis zu 450 mg/ml gelegt werden. Weiterhin könnte zur Verhinderung von altersbedingter Katarakt eine externe Gabe mittels Augentropfen oder Injektionen in die Linse von z.B. α -Kristallin oder unterschiedlichen Metaboliten wie UV Filter oder Antioxidantien erforscht und entwickelt werden. Dabei könnten Lanosterol enthaltende Augentropfen, die sowohl die Anzahl als auch die Größe von bereits entstandenen Aggregaten in der Linse reduzieren, als Vorbild dienen.

7. Summary and Outlook

Cataract is the leading cause of blindness worldwide. There are a diversity of different mechanisms leading to the turbidity of the eye lens during a lifetime. Two of them have been subject of this PhD thesis using NMR spectroscopy: the interactions between the eye lens crystallins and the effect of UV-B irradiation on the human γ D-crystallin.

Altered interactions between the chaperone α -crystallin with the β - and γ -crystallins are known to cause cataract. Due to its changed pl, the pathogenic Variant E107A is expected to show stronger interactions with the α -crystallin compared to the wild type $h\gamma D$. This hypothesis couldn't be confirmed in this work. E107A doesn't show a change in the structure and any increased or changed interactions under physiological or mild thermal stress with either the chaperone $h\alpha B$, or the human lens homogenates compared to wild type $h\gamma D$. In a concentration range of 18 - 30 mg/ml E107A and wild type $h\gamma D$ display a weak and transient interaction with their interaction partners where only solvent exposed side chains are slightly affected. There is no stable complex between the α - and the $h\gamma D$ -crystallin E107A which has been postulated for other γ -crystallin variants. Consequently, there is no depletion of the limited reservoir of the α -crystallin with other, aggregation prone proteins.

One of the major risk factor for age-dependent cataract is UV-exposure. In this work different states of the UV-B irradiated, still soluble part of wild type $h\gamma$ D-crystallin could be detected: The native, unaffected state A and the UV induced, chemically modified states B and B*. B and B* demonstrate a high local flexibility close to the affected tyrosine and possess an intact

ring system. All findings are indicative to a changed interaction between the Y17 and Y29 which are stacked in the unirradiated protein. In contrast to state B^{*}, B is not prone to aggregation in a period of months. Furthermore, the $h\gamma D$ variant Y17A shows the same characteristics as state B and hence is a mimic of this UV induced state.

The pathogenic variant W43R is more prone to UV-B induced aggregation compared to its wild type $h\gamma D$. Without any irradiation, it exhibits additional to the native state A a small fraction of state B. After UV-B exposure, the amount of state B increases by 30%. It is most likely, that state B in the unirradiated case is caused by structural changes due to the point mutation while the increase after irradiation is due to oxidation of C19 and therefore changed interaction between Y17 and Y29. Also, the pathogenic variant E107A seems to be more affected by UV-B exposure compared to the wild type. After irradiation, there are additionally to the states A, B and B* the partially or completely unfolded states D and D*. Furthermore, B and B* show an increased amount by a factor 4 compared to $h\gamma D$.

In contrary to results in literature, there are no chemical modifications of single aromatic amino acids in the soluble part of the irradiated proteins which can be detected by fluorescence or NMR spectroscopy.

In summary, the formation of the UV induced state B seems to be an additional protective function of the $h\gamma$ D-crystallin against UV-B exposure. Due to the highly conserved positions of Y17 and Y29 in the tertiary structure, this can be also assumed for all γ -crystallins. As a consequence, additional indirect damage and hence aggregation of the crystallins can be prevented by the competitive deactivation of reactive oxygen species through the oxidation of C19. Meanwhile, the oxidation of C19 leads to a changed interaction of the stacked Y17 and Y29 which can be detected by NMR spectroscopy.

Since the eye lens is a highly complex system with multiple different mechanisms causing the turbidity of the lens, there is still the necessity of extended investigation to get a full insight into the development of cataract. Especially one main focus should be on studies in a physiological concentration range up to 450 mg/ml. Furthermore administrations of e.g. Lanosterol, UV filters, antioxidants or α -crystallin directly into the lens are a promising but still to be investigated tool to prevent or reverse age dependent cataract.

8. Abkürzungsverzeichnis

¹³ C	Kohlenstoffisotop
¹⁵ N	Stickstoffisotop
Abb.	Abbildung
ACD	zentrale α -Kristallin Domäne
AS	Aminosäure
b	bovine
BEST HNCA	Bandselective Excitation Short-Transient HNCA
BFSP	beaded filament structural protein
bzgl.	bezüglich
CD	Cirkulardichroismus
COSY	Correlation Spectroscopy
CSA	Chemical Shift Anisotropy
ct	constant time
Ctd	C-terminale Einzeldomäne
CTR	C-terminale Region
Da	Dalton
$\Delta\delta$	chemische Verschiebung
D ₂ O	deuteriertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
ddH ₂ O	doppelt entionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
DTT	Dithiothreitol
dYT	double yeast trypton
3	molarer Extinktionskoeffizient

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FID	freier Induktionsabfall
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
g	mittlere Erdbeschleunigung
GARP	Globally optimized Alternating-phase Rectangular Pulse
GdnHCl	Guanidiniumchlorid
h	human
hγD	humanes γD Protein/Kristallin
H ₂ O	Wasser
His-Tag	Hexahistidin-Tag
hpts.	hauptsächlich
HSQC/fHSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence/fast HSQC
INEPT	Insensitive Nuclei enhanced by polarization transfer
I	Intensität
IPTG	lso-propyl-β-D-thiogalactopyranosid
i.V.	im Vergleich
<i>J</i> -Kopplung	skalare Kopplung
Kyn	Kynurenine
λ	Wellenlänge
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIP	Major Intrinsic Protein
MSM	Mineralsalz Medium
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
Ntd	N-terminale Einzeldomäne
Ntr	N-terminale Region
	118

NFK	N-formylkynurenine
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , kernmagnetische Resonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
PFG	Pulsed-Field-Gradient
рН	pH-Wert
pl	isoelektrischer Punkt
QM-MM	Quantum Mechanics-Molecular Mechanics
RMS	Root Mean Square
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
sHSP	small Heat Shock Protein
S/N	Signal to Noise Verhältnis
т	Temperatur
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
ТРРІ	Time-Proportional Phase Increments
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
UV	Ultraviolett
WATERGATE	Water suppression by gradient tailored excitation
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

9. Anhang

9.1. Viskosität der Kristallinmischung aus bovinen Linsen

In der Linse befinden sich Proteine in einer sehr hohen Konzentration von bis zu 450 mg/ml. Um *Crowding*-Bedingungen beschreiben zu können, eignen sich unterschiedliche Methoden wie SAXS, NMR und Viskositätsmessungen, die in der Dissertation von Matthias Roos [160] zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen der translatorischen und rotatorischen Diffusion und der makroskopischen Viskosität von BSA, Lysozym und von mir hergestelltem $h\alpha B$ verwendet werden. In diesem Unterkapitel wird die makroskopische Viskosität des gesamten bovinen Linsenhomogenates mit der von dem rekombinant exprimierten $h\alpha B$ verglichen.

Die Viskosität wurde mit dem Kapillarviskosimeter *m*-VROC[™] (RheoSense, San Ramon, CA) bestimmt, das mit einem minimalen Volumen von 20 ul arbeiten kann. Die Viskosität n kann dabei über den Zusammenhang des Newtonschen Gesetzes $\sigma = \eta \dot{\gamma}_{app}$ bestimmt werden, wobei die Scherrate $\dot{\gamma}_{app}$ vom Operator vorgegeben wird und abhängig von der Flussrate Φ und der Geometrie der Messzelle ist. Die Scherspannung σ ist proportional zu Druckgradienten Messzelle dem gemessenen innerhalb der mit einem Proportionalitätsgradienten, der durch die Geometrie der Messzelle bestimmt wird. Somit ergibt sich für eine Newtonsche Flüssigkeit folgende Gleichung zur Bestimmung der $\frac{\psi(L)}{\partial L} \frac{wn}{\dot{\gamma}_{app} 2(w+h)}$ mit den geometrischen Parametern Länge L, Breite w und Viskosität: $\eta = \frac{\partial p(L)}{d}$ Höhe h der Flusszelle.



Abb. 65: Temperaturabhängigkeit der Viskosität mit Vogel-Fulcher-Abhängigkeit. (a) kristalline Mischung aus bovinen Augenlinsen. (b) h α B-Kristallin gemessen in D₂O von Matthias Roos [191]; angepasst um Korrekturfaktor auf H₂O [192]; Probenpräparation von Susanne Link

Sowohl das reine h α B (Abb. 65(b)) als auch die bovine Kristallinmischung, bestehend aus den löslichen Anteilen von α -, β -, und γ -Kristallinen der bovinen Linse, (Abb. 65(a)) zeigen im

Arrhenius-Plot einen linearen Zusammenhang zwischen der Makroviskosität η und der inversen Temperatur 1/T. Für eine Konzentration des h α B von 190 mg/ml kann eine leichte Krümmung erahnt werden, wohingegen der Zusammenhang zwischen η und 1/T bei dem bovinen Linsenhomogenat selbst für höhere Konzentrationen linear bleibt. Es findet also kein Glasübergang statt. Bei einer Konzentration von 240 mg/ml ist die Steigung der gefitteten Gerade jedoch i.V. zu den niedrigeren Konzentrationen größer.



Abb. 66: Aktivierungsenergie E_A bestimmt aus Steigung der Geraden in Abb. 65 für bovines Linsenhomogenat und h α B-Kristallin.

66 wurde Steigung des Arrhenius-Plots In Abb. die aus der berechneten Aktivierungsenergien E_A der bovinen Kristallinmischung und von rekombinant exprimierten $h\alpha B$ in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen. Der Fehler beinhaltet die beim linearen Fit bestimmte Abweichung der Geraden. Die Aktivierungsenergie für beide Proben bleibt in einem großen Konzentrationsbereich von bis zu 190 mg/ml für haß bzw. 202 mg/ml für die bovine Kristallinmischung nahezu konstant bei einem Wert von $E_A = 18 - 20$ kJ/mol. Dies entspricht der Aktivierungsenergie von Wasser. Erst für höhere Konzentrationen steigt die Aktivierungsenergie leicht an.

9.2. Thermische Interaktion

9.2.1. ByB und b α : Chaperonaktivität und thermische Stabilität

Die Interaktion des rekombinant hergestellten bovinen by B Kristallins mit einer ba Kristallinmischung aus Rinderlinsen sollte untersucht werden. Dabei wurde das by B in Abbzw. Anwesenheit von unterschiedlichen ba Konzentrationen thermischem Stress ausgesetzt und die Aggregation mittels UV/VIS-Spektroskopie beobachtet. Wie in Abb. 67 zu sehen ist, unterdrückt das Chaperon ba-Kristallin abhängig von der eingesetzten Konzentration die Aggregation des by B Kristallins. Gleichzeitig ist die ba-Kristallin Mischung in einem Temperaturbereich von 13° - 80°C stabil, während die Bildung von lichtstreuenden Komplexen erst bei etwa 85°C zu detektieren ist (Abb. 29).



Abb. 67: Temperatur- und zeitlicher Verlauf der Extinktion bei 360nm von by B-Kristallin in Ab- bzw. Anwesenheit von b α -Kristallin. (a) Thermische Stabilität von 25 μ M by B in Anwesenheit variierender b α Konzentration von 13-90°C mit einem Gradienten von 2°C/min. (b) Thermische Stabilität von 25 μ M by B in Ab-(durchgezogene Linie) bzw. Anwesenheit von 50 μ M b α (gestrichelte Linie) oder 160 μ M b α (gepunktete Linie) über eine Stunde bei unterschiedlich konstanten Temperaturen. Daten siehe [162].

9.2.2. Chemische Verschiebungen $\Delta\delta$ von hyD & E107A

Bei der Variante E107A wurden in der ersten Aufreinigung für Testzwecke keine nennenswerten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ in Anwesenheit von hαB für unterschiedliche Temperaturen detektiert. Bei der zweiten aufgereinigten Charge der gleichen Variante, die für alle folgenden Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen herangezogen wurden ist, können aber teilweise kleine $\Delta\delta$ detektiert werden. Dies trifft insbesondere bei Anwesenheit von h α B und teilweise auch bei der Mischung Variante + humane Linse + α -Kristallin auf, wobei der Effekt bei 20°C am stärksten ausgeprägt ist. Vergleicht man die Spektren des reinen E107A von der ersten und zweiten Aufreinigung fällt auf, dass sich auch hier einige Kreuzsignale leicht verschoben haben, die zum größten Teil identisch zu den $\Delta\delta$ in Anwesenheit von h α B sind. Weitere Spektren des h γ D, bei denen eine schrittweise pH-Titration von 7.3 auf 6.2 durchgeführt wurden ist, zeigen i.V. zu den Spektren von E107A in Ab- bzw. Anwesenheit von Interaktionspartnern die identischen Trends bzgl. $\Delta\delta$. Dabei sind größtenteils die gleichen Aminosäuren betroffen. Aufgrund dieser Beobachtung, den relativ geringen $\Delta\delta$ von hyD und E107A in Anwesenheit von unterschiedlichen Interaktionspartnern (Tabelle 18) und den nachträglich kontrollierten und gering variierenden pH-Werten (pH=7,5 ± 0,2 - 0,4) der einzelnen Proben kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten $\Delta\delta$ ein reiner, pH abhängiger Lösungsmitteleffekt darstellt.

Tabelle 18: Chemische Verschiebung $\Delta \delta \ge 0,04$ ppm von Wildtyp hyD-Kristallin und der Variante E107A in
Anwesenheit von unterschiedlichen Interaktionspartnern bei unterschiedlichen Temperaturen.Aminosäuren, deren Verschiebung nicht mit der Verschiebung von der pH-Titration korrelieren, sind kursiv
dargestellt. Alle Aminosäuren bis aus I103, L124 und V170 sind Lösungsmittelexponiert, wobei sich V170 am
Interface zwischen den beiden Domänen befindet.

Temp.	NMR-Probe	AS mit $\Delta \delta \ge 0,04$ ppm
20°C		
	hγD und hγD + hαB	-
	$h\gamma D$ und $h\gamma D$ + hlens	S31
	hγD und hγD + hlens + α -Kristallin	D39, G41, H88, R89, L124
37°C		
	hγD und hγD + hαB	-
	hγD und hγD + hlens	-
	hγD und hγD + hlens + α -Kristallin	H16, S20, D114
43,5°C		
	hγD und hγD + hαB	F118
	hγD und hγD + hlens	-
	hγD und hγD + hlens + α -Kristallin	H16, H122
20°C		
	E107A und E107A+ hαB	R15, E18, G41, L72, E96, Y154, I171, D172
	E107A und E107A + hlens	D172
	E107A und E107A + hlens + α -Kristallin	L72, I03, T106, <i>R153</i> ,
37°C		
	E107A und E107A+ hαB	E18, G41, R117, Y154, Q155, I171, D172
	E107A und E107A + hlens	-
	E107A und E107A + hlens + α -Kristallin	-
43,5°C		
	E107A und E107A+ hαB	R15, L72, R117, H122, Y154, V170,
	E107A und E107A + hlens	-
	E107A und E107A + hlens + α -Kristallin	-

9.2.3. Relative Intensitätsänderungen von Wildtyp hyD-Kristallin & E107A

Die Auswertung der relativen Intensitätsänderungen I_{mix}/I_{γ} einzelner Kreuzsignale bei gleichen Temperaturen gestaltet sich aufgrund des geringen "*Signal to Noise*" Verhältnisses S/N, teilweisen Proteinausfalls der Proben während der Messung und nicht immer gleichen Messbedingungen als schwierig. Daher wurde I_{mix}/I_{γ} auf den Mittelwert der relativen Intensitäten bei der jeweiligen Temperatur normiert.

Die relativen Intensitätsänderungen von $h\gamma D$ und ihrer Variante E107A bei 20°C bzw. 43,5°C in Anwesenheit von unterschiedlichen Interaktionspartnern sind in den Abb. 68 und Abb. 69 dargestellt. Analog zu den Messungen bei 37°C (Kapitel 4.3.3) lassen sich keine eindeutigen Änderungen bzgl. bestimmter einzelner identischer Aminosäuren oder Regionen des Proteins, die mit dem Interaktionspartner interagieren, identifizieren. Eine Liste mit allen betroffenen Aminosäuren, die eine relative Intensitätsänderung in Anwesenheit von unterschiedlichen Interaktionspartnern bei verschiedenen Temperaturen zeigen, ist in Tabelle 19 zu finden.



Abb. 68: relative, normierte Intensitätsänderung der Kreuzsignale bei 20°C von 100µM Wildtyp hyD-Kristallin (in (a) - (c)) oder der Variante 100µM E107A (in (d) - (f)) i.V. zu unterschiedlichen Mischungen. Gezeigt sind die auf den Mittelwert normierten relativen Intensitäten der Mischungen in Anwesenheit von hyD-Kristallin relativ zur Intensität des hyD-Kristallins. Der experimentelle Fehler wurde durch das Rauschen bestimmt und durch die Fehlerbalken dargestellt. Grenzen wurden für I_{mix}/I_{hyD-Kristallin} ≥1,33 (grün), ≤ 0,75 (orange) bzw. ≤ 0,5 (rot) gesetzt. (a) & (d): 100µM hyD-Kristallin + 800µM h α B; (b) & (e): 100µM hyD-Kristallin + 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat; (c) & (f): 100µM hyD-Kristallin + 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat + 800µM α -Kristallin.



Abb. 69: relative, normierte Intensitätsänderung der Kreuzsignale bei 43,5°C von 100µM Wildtyp hyD-Kristallin (in (a) - (c)) oder der Variante 100µM E107A (in (d) - (f)) i.V. zu unterschiedlichen Mischungen. Gezeigt sind die auf den Mittelwert normierten relativen Intensitäten der Mischungen in Anwesenheit von hyD-Kristallin relativ zur Intensität des hyD-Kristallins. Der experimentelle Fehler wurde durch das Rauschen bestimmt und durch die Fehlerbalken dargestellt. Grenzen wurden für I_{mix}/I_{hyD-Kristallin} ≥1,33 (grün), ≤ 0,75 (orange) bzw. ≤ 0,5 (rot) gesetzt. (a) & (d): 100µM hyD-Kristallin + 800µM h α B; (b) & (e): 100µM hyD-Kristallin + 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat; (c) & (f): 100µM hyD-Kristallin + 14,7 mg/ml humanes Linsenhomogenat + 800µM α -Kristallin.

Tabelle 19: relative, normierte Intensitätsänderungen der Kreuzsignale von Wildtyp hyD-Kristallin und E107A in Anwesenheit von unterschiedlichen Interaktionspartnern. Grenzen wurden für $I_{mix}/I_{\gamma-Kristallin} \ge 1,33$ (grün), $\le 0,75$ (orange) bzw. $\le 0,5$ (rot) gesetzt.

	hγD&hαB/hγD			hγD&hlens/hγD				hγD&hlens&hα-cryst/hγD					E107A+haB/E107A			7A+hle	ns/E107A	E107A+hlens+hα/E107A				
T in °C	20	37	43,5	1	20	37	43,5	1	20	37	43,5	T in °C	20	37	43,5	20	37	43,5	2	0	37	43,5
H0												HO										
M1												M1										
G2												G2										
К3												КЗ										
14												14										
T5												T5										
L6												L6										
Y7												Y7										
E8												E8										
D9												D9										
R10												R10										
G11												G11										
F12												F12										
Q13												Q13										
G14												G14										
R15												R15										
H16												H16										
Y17												Y17										
E18												E18										
C19												C19										
S20												S20										
S21												S21										
D22												D22										
H23												H23										
P24												P24										
N25												N25										
L26												L26										
Q27												Q27										
P28												P28										
Y29												Y29										
L30												L30										
S31												S31										
R32												R32										
C33												C33										
N34												N34										
S35												S35										
A36												A36										
R37												R37										
V38												V38										
D39												D39										
S40												S40										
G41												G41										
C42												C42										
W43												W43										
M44												M44										
L45												L45										
Y46												Y46										
E47												E47										

	hγD&hαB/hγD		hγE		&hler	ns/hγD	γD	hγD	&hler	ns&hα-cr	/st/hγD	E107	A+hαE	3/E107A		E107	7A+hle	ns/E107A	E107A	+hlens	+hα/E107A	
T in °C	20	37	43,5	1	20	37	43,5		20	37	43,5	T in °C	20	37	43,5		20	37	43,5	 20	37	43,5
Q48												Q48										
P49												P49										
N50												N50										
Y51												Y51										
S52												S52										
G53												G53										
L54												L54										
Q55												Q55										
Y56												Y56										
F57												F57										
L58												L58										
R59												R59										
R60												R60										
G61												G61										
D62												D62										
Y63												Y63										
A64	-											A64			<u> </u>							
D65												D65										
H66												H66										
Q67												Q67										
Q68												Q68										
W69												W69										
M70												M70										
G71												G71										
L72												L72										
S73												S73										
D74												D74										
S75												S75	_									
V76												V76										
R77							-					R77	-									
S78												S78	_									
C79												C79										
R80												R80										
L81												L81										
182												182										
P83	-	-		-				-				P83				-						
H84	-	-		-	<u> </u>			-				H84										
S85				-				-				S85				-						
G86				-	┝──							G86	-	 								
S87												S87	_									
H88												H88	_									
R89	<u> </u>			-		<u> </u>				<u> </u>		R89										
190												190						<u> </u>				
R91				-	<u> </u>					<u> </u>		R91										
L92												L92						<u> </u>				
Y93				-	<u> </u>	<u> </u>						Y93			ļ			<u> </u>				
E94	<u> </u>			-	L							E94						<u> </u>				
R95												R95						<u> </u>				
E96	-	_										E96			<u> </u>							
D97												D97										
Y98]				Y98										

	hγD&hαB/hγD		3/hγD		hγD&hle		ns/hγD		hγD&hlens&hα-			cryst/hγD		E107A+hαB/E107A			E107A+hlens/E107A					E107A	⊦hα/E107A	
T in °C	20	37	43,5		20	37	43,5		20	37	43,5		T in °C	20	37	43,5		20	37	43,5		20	37	43,5
R99													R99											
G100													G100								-			
Q101								_					Q101								-			
M102													M102								-			
I103													l103								-			
E104								_					E104								-			
F105								_					F105								-			
T106													T106								-			
E107													E107A								-			
D108													D108											
C109													C109											
S110								_					S110								-			
C111													C111								-			
L112													L112								-			
Q113													Q113											
D114													D114								-			
R115													R115											
F116													F116								-			
R117													R117								-			
F118													F118											
N119													N119											
E120													E120											
l121													l121											
H122													H122											
S123													S123											
L124													L124											
N125													N125											
V126													V126								-			
L127													L127											
E128													E128								-			
G129													G129								-			
S130								-					S130											J
W131													W131											
V132													V132								-			
L133													L133											
Y134													Y134											
E135				-				-					E135											<u> </u>
L136				-				-					L136											
S137				-				4					S137											}
N138													N138											
Y139													Y139								-			
R140													R140											
G141													G141								-			
R142						\square		1					R142											J
Q143													Q143											
Y144				1									Y144	L										ļ
L145				1									L145											
L146				1				4					L146											ļ
M147								1					M147											
P148				1				4					P148	L										
G149]									G149											



9.3. Vergleich des Rückgrates von Wildtyp hγD-Kristallin mit weiteren Varianten

Die Zuordnungen des Rückgrates von Wildtyp $h\gamma D$ und seinen Varianten W43R, E107A, Ntd, Ctd und Y17A sind in Kapitel 4.1.1 gezeigt. Gegenüberstellungen von weiteren ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren des Wildtyps $h\gamma D$ mit den nicht nichtzugeordneten Varianten W69A, W131A, W157A, Y29A und Y17AY29A werden im Folgendem gezeigt.

Für den Vergleich wurde jeweils eine nicht zugeordnete aromatische Variante mit dem Spektrum des zugeordneten Wildtyp hγD verglichen. Wie zu erwarten, weisen die Punktmutationen, in denen einer der vier Tryptophane mit einem Arginin (W43R: Abb. 13) bzw. Alanin (W69A: Abb. 70; W131A: Abb. 71; W157A: Abb. 72) ersetzt wurden sind, eine starke Änderung im Rückgrat auf. Dabei sind hauptsächlich Aminosäuren, die sich in der gleichen Domäne wie die Punktmutation und am Interface zwischen N- und C-terminaler Domäne befinden, betroffen. Zusätzlich ist die Expressions- und Aufreinigungsausbeute der beiden Varianten W43R und W131A im Vergleich zu den restlichen Varianten sehr gering. Im Gegensatz zu den Tryptophan- Punktmutationen sind die Änderungen im Rückgrat für die Tyrosinvarianten Y17A (Abb. 17), Y29A (Abb. 73) und der Doppelmutante Y17AY29A (Abb. 74) gering.



Abb. 70: Vergleich ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von 700 μM W69A (rot) mit 1,1 mM Wildtyp hγD-Kristallin (schwarz). Stärker verschobene bzw. verschwundene Kreuzsignale der Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp sind beschriftet.



Abb. 71: Vergleich ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von 285 μM W131A (rot) mit 1,1 mM Wildtyp hγD-Kristallin (schwarz). Stärker verschobene bzw. verschwundene Kreuzsignale der Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp sind beschriftet.



Abb. 72: Vergleich ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von 780 μM W157A (rot) mit 1,1 mM Wildtyp hγD-Kristallin (schwarz). Stärker verschobene bzw. verschwundene Kreuzsignale der Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp sind beschriftet.



Abb. 73: Vergleich ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von 730 μM Y29A (rot) mit 1,1 mM Wildtyp hγD-Kristallin (schwarz). Stärker verschobene bzw. verschwundene Kreuzsignale der Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp sind beschriftet.



Abb. 74: Vergleich ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren der Doppeltmutante 700 μM Y17AY29A (rot) mit 1,1 mM Wildtyp hγD-Kristallin (schwarz). Stärker verschobene bzw. verschwundene Kreuzsignale der Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp sind beschriftet.

9.4. Zuordnung der aromatische Ringe von Wildtyp hγD-Kristallin

9.4.1. Zuordnung von Kohlenstoffpositionen durch selektiv markierte Glukose

Durch die Verwendung von 1-¹³C bzw. 2-¹³C Glukose werden jeweils spezifische Kohlenstoffpositionen an den Seitenketten des aromatischen Rings mit ¹³C isotopenmarkiert. Bei Verwendung von 1-¹³C Glukose als einzige Kohlenstoffquelle werden hauptsächlich die δ -Positionen von Tyr und Phe, die δ_1 - und ε_3 -Positionen von Trp und die δ_2 - und ε_1 -Positionen von His markiert. Bei Verwendung von 2-¹³C Glukose als einzige Kohlenstoffquelle werden hauptsächlich die ε -Positionen von Tyr und Phe, die δ_1 - und ε_3 -Positionen von Trp und die δ_2 - und ε_3 -Positionen von Tyr und Phe, die δ_1 -, ζ_2 - und ζ_3 -Positionen von Trp und die δ_2 -Positionen von Tyr und Phe, die δ_1 -, ζ_2 - und ζ_3 -Positionen von Tyr und Phe, die δ_2 -Positionen von Tyr und Phe, die δ_3 -Positionen von Tyr und Phe, d

aromatischen Ringe sind in Abb. 8 dargestellt. Dabei sind die Kohlenstoffpositionen in grün markiert.

Durch den Vergleich der unterschiedlichen aromatischen Spektren des Wildtyps h γ D, der jeweils mit unterschiedlicher Glukose 1-¹³C und 2-¹³C exprimiert wurden ist, lassen sich in einem ersten Schritt die charakteristische Verschiebung der unterschiedlichen Kohlenstoffpositionen innerhalb des Ringsystems einzelner aromatischer Aminosäuren unterscheiden (Abb. 75). Eine Unterscheidung der Kreuzsignale zwischen den einzelnen Aminosäuren innerhalb des Proteins wie z.B. W43 ist damit nicht möglich. Da die Ausbeuten der Expressionen von 1-¹³C und 2-¹³C h γ D relativ gering waren, sind die aufgenommenen Spektren aufgrund der niedrigeren Proteinkonzentration stark verrauscht. Teilweise sind auftretende Signale, wie z.B. von W ζ_2 in Rot, nur durch ein tiefes Schneiden im Intensitätslevel zu erkennen.



Abb. 75: Bestimmung der Kohlenstoffpositionen in den aromatischen Ringsystemen von Wildtyp hyD-Kristallin. In Schwarz: 1,1mM vollmarkierte ¹³C Glukose (aromatisches ¹H¹³C constant time HSQC). In Grün: 260 μ M 1-¹³C markiert (Aromaten ¹H¹³C HSQC). In Rot: 100 μ M 2-¹³C markiert (Aromaten ¹H¹³C TROSY; um 80 Hz in ¹³C-Achse verschoben).

9.4.2. Zuordnung der aromatischen Aminosäuren der Einzeldomänen

Mit Hilfe der Einzeldomänen, konnten jeweils über die Verknüpfung der C_{β} der Rückgratzuordnung über das NMR-Experiment (HB)CB(CGCD)HD mit dem H_{δ} von dem aromatischen constant time ¹H¹³C HSQC verknüpft werden. Die ist in Abb. 76 exemplarisch für die Aminosäuren F12, Y17, F57 und Y63 der Ntd und in Abb. 77 für die Aminosäuren H88, F118, Y151 und Y154 der Ctd dargestellt. Durch einen TOCSY-Schritt ist es möglich, alle Kohlenstoffe mit benachbarten Protonen innerhalb einer aromatischen Aminosäure

miteinander zu verknüpfen. Z.B. in der Ntd von Y17δ* mit Y17ε* oder von W43 η_2 mit W43 ζ_2 bzw. in der Ctd von W131 η_2 mit W131 ζ_2 , von Y151δ* mit Y151ε* oder Y154δ* mit Y154ε*. Befindet sich wie beim Histidin innerhalb des aromatischen Rings ein Stickstoffatom zwischen den Kohlenstoffstoffatomen, ist die Verknüpfung der einzelnen Atompositionen über die ²*J*-Kopplung zwischen dem Stickstoff und den Protonen, die an den benachbarten Kohlenstoffen gebunden sind, notwendig. Dies wurde zusätzlich bei den Histidinen für die Verknüpfung von den Positionen C δ_2 auf C ϵ_1 ausgenutzt, wobei die Zuordnung durch die zusätzlichen Histidinsignale des His-Tags bzw. einer bereits uneindeutigen Zuordnung in (HB)CB(CGCD)HD erschwert wurde. Das entsprechende Experiment ist hier nicht gezeigt.

Abb. 76: Zuordnung von unterschiedlichen Kohlenstoffpositionen in den aromatischen Ringsystemen der N-terminalen Domäne für ausgewählte Aminosäuren.

Abb. 77: Zuordnung von unterschiedlichen Kohlenstoffpositionen in den aromatischen Ringsystemen der C-terminalen Domäne für ausgewählte Aminosäuren.

9.4.3. Zuordnung der aromatischen Aminosäuren durch Punktmutationen

Durch das Ersetzen von einzelnen aromatischen Aminosäuren mit Arginin bzw. Alanin, konnten insbesondere für die vier Tryptophane die unterschiedlichen Kohlenstoffpositionen δ_1 und ζ_2 des Volllängenkonstrukts h γ D mit Hilfe des Ausschlussprinzips eindeutig bestimmt werden (Abb. 78). Dabei fehlt bei der jeweiligen Variante das entsprechende Kreuzsignal i.V. zum Wildtyp. Für die Kohlenstoffpositionen $W\eta_2$, $W\zeta_3$ und $W\epsilon_3$ fiel die Zuordnung teilweise nicht eindeutig aus, konnte aber in Kombination mit den Ergebnissen der N- bzw. der C-terminalen Domäne verifiziert werden.

Abb. 78: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von Wildtyp hγD-Kristallin in Schwarz und deren Tryptophanvarianten in Rot. Die jeweiligen Protonen-Kohlenstoff Position innerhalb des Tryptophanrings sind umrandet.

Bei den Tyrosinvarianten Y17A und Y29A befinden sich die Signale mehrere unterschiedlicher Tyrosine für die Position Y δ^* an derselben Position innerhalb des Spektrums. Für die Kohlenstoffpositionen von Y ϵ^* sind beide Signale voneinander abhängig (Abb. 25, Abb. 81, Abb. 82 und Abb. 83). Somit konnten die eindeutigen Kohlenstoffpositionen von Y17 und Y29 nur über die Zuordnungsexperimente von der N-terminalen Domäne und nicht über die Punktmutationen der Varianten Y17A und Y29A bestimmt werden.

9.5. Vergleich der aromatischen Ringsysteme von hγD mit weiteren Varianten

Für die Zuordnung der aromatischen Ringsysteme wurden unterschiedliche Varianten von $h\gamma D$ hergestellt, deren Punktmutationen, insbesondere die der Tryptophane und den einzelnen Domänen, eine teilweise große Veränderung des Rückgrats des Proteins bewirkt haben (4.1.1 und 9.3). In Abschnitt 4.1.3 wurden bereits das Spektrum der aromatischen Seitenketten des Wildtyps mit den Spektren von den biologisch relevanten Varianten W43R & E107A, den Einzeldomänen Ntd & Ctd sowie der "UV-mimikenden" Variante Y17A verglichen. Die Spektren der verbleibenden Varianten W69A, W131A, W157A, Y29A,

Y17AY29A und der übereinander gelagerten Einzeldomänen Ntd und Ctd werden im Folgendem Abschnitt gezeigt:

Für die Tryptophan Punktvarianten W69A (Abb. 79), W131A (Abb. 80) und W157A (Abb. 81) ergeben sich i.V. zum Wildtyp generell nur geringe Unterschiede der aromatischen Seitenketten von Tyr, Phe und His. Die aromatischen Ringsysteme, insbesondere die Ausrichtung der verbleibenden drei Tryptophanseitenketten bleibt unverändert.

Die Tyrosinvariante Y29A (Abb. 82) zeigt analog zu der Variante Y17A (Abb. 25) das Verschwinden der jeweiligen Kreuzsignale von Y17 und Y29 an den Protonen-Kohlenstoffpositionen ε^* und δ^* mit gleichzeitigem Auftreten eines entsprechenden neuen Signals. Bei der Variante Y17AY29A (Abb. 83) verschwinden analog zu Y17A und Y29A die Kreuzsignale an den Protonen-Kohlenstoffpositionen ε^* und δ^* , ohne dass neue Signale auftreten. Zusätzlich haben alle drei Varianten einen Einfluss auf das H16&23 δ_2 und H16/23 ε_1 Kreuzsignal. Somit beeinflussen sich die im nativen Zustand gestapelten Tyrosine Y17 und Y29 gegenseitig und befinden sich beim Verschwinden ihres Tyrosin Interaktionspartners in einer neuen chemischen Umgebung. Ferner haben sie auch einen Einfluss auf die räumliche Ausrichtung der aromatischen Seitenkette von H16 und/oder H 23, nicht aber auf die der restlichen aromatischen Aminosäuren.

Die isolierten Einzeldomänen Ntd und Ctd besitzen jeweils etwa die Hälfte der Kreuzsignale des Volllängenkonstrukts h γ D. Durch Übereinanderlegen der einzelnen aromatischen Spektren der Einzeldomänen lässt sich ein fast identisches Spektrum von h γ D erzeugen (Abb. 84). Beide isolierten Einzeldomänen besitzen also, i.V. zu den durch einen Linker verbundenen Domänen des Wildtyps, gleiche aromatische Ringsysteme.

Abb. 79: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 1,1mM Wildtyp h γ D-Kristallin in Schwarz und 700 μ M W69A in Rot. Verschwundene bzw. verschobene Kreuzsignale der Variante i.V. zum Wildtyp sind mit der entsprechenden Aminosäure beschriftet. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäure unter einem Kreuzsignal.


Abb. 80: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 1,1mM Wildtyp h_γD-Kristallin in Schwarz und 285μM W131A in Rot. Verschwundene bzw. verschobene Kreuzsignale der Variante i.V. zum Wildtyp sind mit der entsprechenden Aminosäure beschriftet. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäuren unter einem Kreuzsignal.



Abb. 81: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 1,1mM Wildtyp hγD-Kristallin in Schwarz und 780μM W157A in Rot. Verschwundene bzw. verschobene Kreuzsignale der Variante i.V. zum Wildtyp sind mit der entsprechenden Aminosäure beschriftet. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäuren unter einem Kreuzsignal.



Abb. 82: Aromatische ¹H¹³C Constant Time HSQC Spektren von 1,1mM Wildtyp h γ D-Kristallin in Schwarz und 730 μ M Y29A in Rot. Verschwundene bzw. verschobene Kreuzsignale der Variante i.V. zum Wildtyp sind mit der entsprechenden Aminosäure beschriftet. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäure unter einem Kreuzsignal.



Abb. 83: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 1,1mM Wildtyp hγD-Kristallin in Schwarz und 700μM Y17AY29A in Rot. Verschwundene bzw. verschobene Kreuzsignale der Variante i.V. zum Wildtyp sind mit der entsprechenden Aminosäure beschriftet. In klein und kursiv: Kreuzsignalen mit unsicheren Zuordnungen. x/z: entweder Aminosäure x oder z unter dem Kreuzsignal. x & z: mehrere Aminosäuren unter einem Kreuzsignal.



Abb. 84: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 1,1mM Wildtyp hγD-Kristallin in Schwarz, 560μM Ntd in Blau und 550μM Ctd in Grün.

9.6. Vergleich weiterer Varianten vor und nach UV-B Bestrahlung

Die für die Zuordnung der aromatischen Ringsysteme von hγD benötigten Varianten wurden analog zum Wildtyp und den pathogenen Varianten W43R und E107A UV-B Strahlung ausgesetzt. Bei den Varianten handelt es sich um die Tryptophanvarianten W69A, W131A und W157A, den Tyrosinvarianten Y17A, Y29A und Y17AY29A und den isolierten Einzeldomänen Ntd und Ctd.

9.6.1. Rückgrat weiterer Varianten

Auf den ersten Blick verändern sich weder die Intensitäten noch die Position der Amid-Kreuzsignale von den Tyrosinvarianten und den Einzeldomänen durch die UV-B Bestrahlung stark (Abb. 86(b) - Abb. 88). Für die Tryptophanvarianten treten kleinere Intensitätsveränderungen auf (Abb. 85 - Abb. 86(a)), wobei eine quantitative Auswertung aufgrund des teilweise schlechten S/N und der fehlenden direkten Zuordnung nur bedingt möglich ist. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit hierauf verzichtet. Generell lässt sich mittels der ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren die bereits bei der Aggregations- und Fluoreszenzuntersuchung angedeutete erhöhte Anfälligkeit der Tryptophanvarianten gegenüber UV-B Strahlung bestätigen (4.4 & 5.3.1).



Abb. 85: ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von unbestrahlten (blau) und UV-B bestrahlten Varianten (rot). (a) 100μM W69A. (b) 88μM W131A



Abb. 86: ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von unbestrahlten (blau) und UV-B bestrahlten Varianten (rot). (a) 100µM W157A. (b) 100µM Y17A



Abb. 87: ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von unbestrahlten (blau) und UV-B bestrahlten Varianten (rot). (a) 100μM Y29A. (b) 100μM Y17AY29A



Abb. 88: ¹H¹⁵N TROSY-HSQC Spektren von unbestrahlten (blau) und UV-B bestrahlten Varianten (rot). (a) 100µM Ntd. (b) 100µM Ctd

9.6.2. Aromatische Ringsysteme weiterer Varianten

Im Folgenden Abschnitt sind die vollständigen aromatischen ¹H¹³C constant time HSQC Spektren aller h γ D Varianten, von denen bereits Ausschnitte im Ergebnisteil gezeigt worden sind, abgebildet. Die vollständigen aromatischen Spektren vom Wildtyp h γ D und seinen pathogenen Varianten W43R und E107A sind ebenfalls im Ergebnisteil zu finden (4.5 & 4.6). Zusammengefasst zeigen die Tryptophanvarianten W69A (Abb. 89) und W157A (Abb. 90), die isolierte Einzeldomäne Ntd (Abb. 92) und die Tyrosinvariante Y29A (Abb. 95) die UV-B induzierten zusätzlichen Kreuzsignale des Zustandes B und/oder B* an den Protonen-Kohlenstoffpositionen Y ϵ^* und Y δ^* . Für die Variante W131A (Abb. 90) ist aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration keine eindeutige Aussage möglich. Die UV-B Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die aromatischen Spektren der isolierten Einzeldomäne Ctd (Abb. 93), der Variante Y17A (Abb. 94) und der Variante Y17AY29A (Abb. 96). Dabei scheint sich die Variante Y17A bereits vor Bestrahlung komplett im Zustand B und/oder B* zu befinden, während die Varianten Ctd und Y17AY29A aufgrund der fehlenden Tyrosine Y17 und Y29 keine UV-B induzierten Zusatzsignale zeigt (5.2.2.4).



Abb. 89: Aromatische ¹H¹³C constant time HSQC Spektren von 100µM W69A vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot).



Abb. 90: Aromatische ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von 88 μ M W31A vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot).



Abb. 91: Aromatische ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von 100 μ M W157A vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot).



Abb. 92: Aromatische $^1\text{H}^{13}\text{C}$ constant time HSQC Spektren von 100 μM Ntd vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot).



Abb. 93: Aromatische ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von 100 μ M Ctd vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot).



Abb. 94: Aromatische ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von 100 μ M Y17A vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot).



Abb. 95: Aromatische ${}^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von 100 μ M Y29A vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot).



Abb. 96: Aromatische 1 H 13 C constant time HSQC Spektren von 100 μ M Y17AY29A vor (blau) und nach UV-B Bestrahlung (rot).

9.6.3. Relative Intensitätsänderungen der aromatischen Aminosäuren von Wildtyp hγD-Kristallin und weiterer Varianten

Da das aromatischen ¹H¹³C constant time HSQC Spektrum des zugeordneten Wildtyps hγD bis auf jeweils wenige Ausnahmen mit den aromatischen Spektren der Tryptophan- und Tyrosinvarianten übereinstimmt (9.5), lässt sich die Zuordnung von hγD auf alle Varianten übertragen. Für die isolierten Einzeldomänen wurden separat eigene Zuordnungen der Kreuzsignale durchgeführt (4.1.2). Insgesamt lassen sich bei den Trytophan- und Tyrosinvarianten aufgrund der großen Fehler, die aus dem S/N Verhältnis entstehen, nur bedingt Aussagen über UV-induzierte Intensitätsänderungen treffen. Das S/N Verhältnis für die isolierten Einzeldomänen ist aufgrund der reduzierten Größe der Proteine und somit verbundenen längeren Relaxationszeiten deutlich verbessert. Eine quantitative Auswertung liefert aber keinen Hinweis auf einzelne Signale der aromatische Aminosäuren, deren Intensitäten sich aufgrund der UV-B Strahlung verändert haben.

Eine Übersicht unterschiedlicher Intensitätsveränderungen für den Wildtyp $h\gamma$ D-Kristallin und seinen Tyrosinvarianten sind in den Tabelle 20 - Tabelle 23 zu finden.

		vor Bestrahlung	nach Bestrahlung
Υδ*			
	Y7 oder 46	0,7	0,8
	Y7 oder 46	0,8	1,2
	Y17&98	6,1	9,0
	Y29&51&139	5,0	7,4
	Y63	4,0	5,5
	Y144?&151	3,6	5,5
	Y154	3,0	4,2
	UV- induziertes		8,6
	Zusatzsignal		
	RMS	0,2	0,2
Yε*			
	Y7 oder 46 oder 56	0,6	0,4
	Y7 oder 46 oder 56	0,8	1,4
	Y7 oder 46 oder 56	0,6	1,3
	Y17	4,7	6,5
	Y29	4,6	6,2
	Y63	4,0	5,8
	Y98&144	4,2	6,4
	Y139	3,8	5,6
	Y151	4,0	5,0
	Y154	3,8	5,7
	UV- induziertes	2,15	11,0
	Zusatzsignal + Y51		
	RMS	0,2	0,2

Tabelle 20: Absolute Intensitäten aller Tyrosine von 100 μ M Wildtyp h γ D-Kristallin & Intensitäten des Rauschens (RMS) vor- und nach Bestrahlung.

Tabelle 21: Relative Intensitäten 100μM Wildtyp hγD-Kristallin für ausgewählte Tyrosinsignale.

	Fehler [%] durch das Rauschen auf das jeweilige Signal		I/I _{MW}		I _{UV} /I _{nativ}
	vor	nach	vor	nach	
	Bestrahlung	Bestrahlung	Bestrahlung	Bestrahlung	
Υ17ε*	3,4	3,7	1,6 ± 0,6	1,1 ± 0,5	1,0 ± 0,1
Υ29ε*	3,5	3,9	1,5 ± 0,6	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,1
Y17&98δ*	2,6	2,7	1,4 ±0,4	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,04
Y29&51&139δ*	3,2	3,2	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,1
Yε*_UV+Y51ε*		2,2		1,9 ± 0,8	3,7 ± 0,3
Yδ*_UV		2,8		1,4 ± 0,4	

Tabelle 22: Relative Intensitäten der hγD Variante Y17A (100μM) für ausgewählte Tyrosinsignale.

	Fehler [%] durch das Rauschen auf das jeweilige Signal		das I/I _{MW} eilige		I _{UV} /I _{nativ}
	vor Bestrahlung	nach Bestrahlung	vor Bestrahlung	nach Bestrahlung	
Υ98 δ*	3,1	3,7	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1
Y51&139δ*	3,3	4,0	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1
Y29ε*_"frei"	0,9	1,0	4,4 ± 1,7	4,6 ± 1,8	1,1 ± 0,01
Y29δ*_"frei"	0,9	1,1	3,9 ± 0,5	4,0 ± 0,6	1,1 ± 0,01

Tabelle 23: Veränderte Intensitäten der konzentrierten h γ D Varianten Y17A, Y29A und Y17AY29A (700 μ M – 1,1mM) von den Kreuzsignalen Y17 und Y29 auf Grund der fehlenden aromatischen π - π Stapelpartnern.

$I_{Y \delta 17, frei} = (2, 7 \pm 1, 5) I_{Y \delta 17, gestapelt}$
$I_{Y \delta 29, frei} = (4,9 \pm 4,8)I_{Y \delta 29, gestapelt}$
$I_{Y \varepsilon 17, \text{frei}} = (2, 0 \pm 0, 8) I_{Y \varepsilon 17, \text{gestapelt}}$
$I_{Y \varepsilon 29, frei} = (3, 7 \pm 1, 3)I_{Y \varepsilon 29, gestapelt}$



Abb. 97: Relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderungen von W69A, W131A und W157A vor und nach UV-B Bestrahlung der einzelnen Kohlenstoffpositionen der aromatischen Aminosäuren. (a) Tyrosine. (b) Tryptophane. (c) Phenylalanine. Kreuzsignale, die mehrere Aminosäuren unter einem Peak haben sind mit "&" gekennzeichnet. Kreuzsignale, die entweder der Aminosäure X oder Y zugeordnet wurden sind, sind mit "," markiert. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.



Abb. 98: Relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderungen von Y17A, Y29A und Y17AY29A vor und nach UV-B Bestrahlung der einzelnen Kohlenstoffpositionen der aromatischen Aminosäuren. (a) Tyrosine. (b) Tryptophane. (c) Phenylalanine. Kreuzsignale, die mehrere Aminosäuren unter einem Peak haben sind mit "&" gekennzeichnet. Kreuzsignale, die entweder der Aminosäure X oder Y zugeordnet wurden sind, sind mit "," markiert. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.



Abb. 99: Relative, auf den Mittelwert normierte Intensitätsänderungen der N- und C-terminalen Domäne vor und nach UV-B Bestrahlung der einzelnen Kohlenstoffpositionen der aromatischen Aminosäuren. (a) Tyrosine. (b) Tryptophane. (c) Phenylalanine. Kreuzsignale, die mehrere Aminosäuren unter einem Peak haben sind mit "&" gekennzeichnet. Kreuzsignale, die entweder der Aminosäure X oder Y zugeordnet wurden sind, sind mit "," markiert. Fehlerbalken entsprechen dem experimentellen Fehler.

9.7. Aliphatische Spektren der hγD Varianten E107A, Ntd und Ctd

Für die aliphatischen ¹H¹³C HSQC Spektren von Wildtyp h_YD-Kristallin und seinen Varianten wurden im Rahmen dieser Dissertation keine Zuordnung der aliphatischen Seitenketten durchgeführt. Trotzdem lassen sich qualitative Aussagen treffen. Die Kreuzsignale von h_YD und der pathogenen Variante E107A (Abb. 100) sind größtenteils deckungsgleich. Für die isolierten Einzeldomänen Ntd und Ctd treten i.V. zum Wildtyp nur jeweils etwa die Hälfte der Signale auf (Abb. 101 & Abb. 102), während die UV-B Strahlung keinen großen Einfluss auf die aliphatischen Seitenketten von Ntd (Abb. 103) und Ctd (Abb. 104) zu haben scheint.



Abb. 100: Aliphatische ¹H¹³C HSQC Spektren von nativem 100 μ M Wildtyp h γ D-Kristallin (schwarz) und nativem 100 μ M E107A (rot).



Abb. 101: Aliphatische 1 H 13 C HSQC Spektren von nativem 100µM Wildtyp hyD-Kristallin (schwarz) und nativem 100µM Ntd (rot).



Abb. 102: Aliphatische ${}^{1}H^{13}C$ HSQC Spektren von nativem 100 μ M Wildtyp h γ D-Kristallin (schwarz) und nativem 100 μ M Ctd (rot).



Abb. 103: Aliphatische 1 H 13 C HSQC Spektren von unbestrahltem 100 μ M Ntd (blau) und bestrahltem 100 μ M Ntd (rot).



Abb. 104: Aliphatische 1 H 13 C HSQC Spektren von unbestrahltem 100µM Ctd (blau) und bestrahltem 100µM Ctd (rot).

9.8. Abbildungen & Tabellen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Aufbau der Augenlinse	1
Abb. 2	Oligomerisierung und Chaperonaktivität von α -Kristallin	3
Abb. 3	Aufbau der βγ-Kristalline	5
Abb. 4	Linsen mit unterschiedlichen Katarakterkrankungen	9
Abb. 5	Relative UV-Absorption der unterschiedlichen Augenkompartimente	12
Abb. 6	hγD mit aromatischen Aminosäuren	15
Abb. 7	UV-B Emissionsspektrum der Bestrahlungseinheit	29
Abb. 8	Nomenklatur der Atompositionen an den aromatischen Ringen	32
Abb. 9	Pulssequenz des aromatischen ¹ H ¹³ C constant time HSQC Experiments	33
Abb. 10	Charakteristische J-Kopplungskonstanten in Proteinen	35
Abb. 11	NMR-Zuordnungsschema der aromatischen Ringsysteme	36
Abb. 12	¹ H ¹ ⁵ N TROSY-HSQC Spektrum von Wildtyp hγD-Kristallin	38
Abb. 13	Rückgratzuordnung von W43R i.V. zum Wildtyp hyD-Kristallin	40
Abb. 14	Rückgratzuordnung von E107A i.V. zum Wildtyp hγD-Kristallin	41
Abb. 15	Rückgratzuordnung von Ntd i.V. zum Wildtyp hγD-Kristallin	42
Abb. 16	Rückgratzuordnung von Ctd i.V. zum Wildtyp hγD-Kristallin	43
Abb. 17	Rückgratzuordnung von Y17A i.V. zum Wildtyp hγD-Kristallin	44
Abb. 18	Zuordnung der aromatischen Ringsysteme von Ntd	45
Abb. 19	Zuordnung der aromatischen Ringsysteme von Ctd	46
	Zuordnung der aromatischen Ringsysteme von Wildtyp hγD-Kristallin	47
Abb. 20		
Abb. 21	Vergleich aromatischer ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von hyD und W43R	48
Abb. 22	Vergleich aromatischer ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von hyD und E107A	49
Abb. 23	Vergleich aromatischer ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von hyD und Ntd	49
Abb. 24	Vergleich aromatischer ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von hvD und Ctd	50
Abb. 25	Vergleich aromatischer ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von hvD und Y17A	51
Abb. 26	Bovines Linsenhomogenat-Chromatogramm	52
Abb. 27	Erkrankte und gesunde humane Linsenhomogenate-Chromatogramm	53
Abb. 28	Humanes Linsenhomogenat & Kristallmischungen-Chromatogramm	54
Abb. 29	Temperatur- und zeitlicher Verlauf der Extinktion von b α und h α B	55
Abb. 30	Temperaturverlauf Extinktion unterschiedlicher Linsenkristallinmischungen	56
Abb. 31	Temperaturverlauf Extinktion hyD & E107A in An- bzw. Abwesenheit von h α B	57
Abb. 32	Zeitlicher Verlauf Extinktion h γ D & E107A in An- bzw. Abwesenheit von h α B	58
Abb. 33	¹ H ¹⁵ N TROSY-HSQC Spektren hγD & E107A in An- bzw. Abwesenheit	60
	unterschiedlicher Interaktionspartner bei 37°C	
Abb. 34	Relative normierte Intensitätsänderungen hyD Wildtyp & E107A in An- bzw.	62
	Abwesenheit unterschiedlicher Interaktionspartner bei 37°C	
Abb. 35	Betroffene Aminosäuren an der Oberfläche von hγD & E107A die auf	63
	Interaktionspartner reagieren	
Abb. 36	Intensitätsabfall NMR Proben unterschiedlicher hγD Varianten über 24h	65
Abb. 37	Fluoreszenzverhalten unterschiedlicher hyD Varianten vor und nach UV-B Bestrahlung	67
Abb. 38	Fluoreszenzverhalten unterschiedlicher hγD Varianten vor und nach UV-B Bestrahlung	67
Abb. 39	Intensitätsveränderung hyD Rückgrat vor und nach UV-B Bestrahlung	69
Abb. 40	Aliphatische ¹ H ¹³ C Spektren hγD vor und nach UV-B Bestrahlung	70
Abb. 41	Aromatische ¹ H ¹³ C Spektren hγD vor und nach UV-B Bestrahlung	71
Abb. 42	Intensitätsveränderung aromatische Seitenketten hγD vor und nach UV-B Bestrahlung	72
Abb. 43	Zeitentwicklung der UV-induzierten Tvr-Kreuzsignale von hvD vor und nach UV-B	73
	Bestrahlung	
Abb. 44	Zeitentwicklung der ¹ H Linienbreite der UV-induzierten Tyr-Kreuzsignale von hyD vor	74
	und nach UV-B Bestrahlung	
Abb. 45	Ausschnitte aus aromatischen ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren der Tyr-	75
	Kreuzsignale von hγD, Ntd und Ctd vor und nach UV-B Bestrahlung	
Abb. 46	Ausschnitt von hγD (pdb 2klj)	75
Abb. 47	Ausschnitte aus aromatischen ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren der Tyr-	76
	Kreuzsignale von hγD, Y17A, Y29A und Y17AY29A vor und nach UV-B Bestrahlung	
Abb. 48	Intensitätsveränderung Rückgrat von hγD in An- und Abwesenheit von humaner	78

	Linsenkristallinmischung vor und nach UV-B Bestrahlung	
Abb. 49	Aromatische ¹ H ¹³ C Spektren hγD in Anwesenheit humaner Linsenkristallinmischung vor und nach UV-B Bestrahlung	79
Abb. 50	Intensitätsveränderung aromatische Seitenketten von hγD in Anwesenheit humaner Linsenkristallinmischung vor und nach UV-B Bestrahlung	80
Abb. 51	Intensitätsveränderung Rückgrat von W43R vor und nach UV-B Bestrahlung	82
Abb. 52	Aromatische ¹ H ¹³ C Spektren W43R vor und nach UV-B Bestrahlung	83
Abb. 53	Ausschnitte aus aromatischen ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren der Tyr-	83
	Kreuzsignale von hγD und den Tryptophanvarianten vor und nach UV-B Bestrahlung	
Abb. 54	Intensitätsveränderung aromatische Seitenketten von W43R vor und nach UV-B Bestrahlung	84
Abb. 55	Intensitätsveränderung Rückgrat von E107A vor und nach UV-B Bestrahlung	85
Abb. 56	Aliphatische ¹ H ¹³ C Spektren E107A vor und nach UV-B Bestrahlung	86
Abb. 57	Aromatische 'H''C Spektren E107A vor und nach UV-B Bestrahlung	87
Abb. 58	Zeitentwicklung der UV-induzierten Tyr-Kreuzsignale von E107A vor und nach UV-B Bestrahlung i.V. zum freien L-Tyrosin	87
Abb. 59	Intensitätsveränderung aromatische Seitenketten von E107A vor und nach UV-B Bestrahlung	88
Abb. 60	Zeitentwicklung der UV-induzierten Tyr-Kreuzsignale von E107A vor und nach UV-B Bestrahlung	89
Abb. 61	Zeitentwicklung der ¹ H Linienbreite der UV-induzierten Tyr-Kreuzsignale von E107A vor und nach UV-B Bestrahlung	89
Abb. 62	Schema der unterschiedlichen Zustände von hvD vor und nach UV-B Bestrahlung	105
Abb. 63	Schema der unterschiedlichen Zustände von W43R vor und nach UV-B Bestrahlung	109
Abb. 64	Schema der unterschiedlichen Zustände von E107A vor und nach UV-B Bestrahlung	112
Abb. 65	Temperaturabhängigkeit der Viskosität von boviner Linsenkristallinmischung und haß	120
Abb. 66	Aktivierungsenergie der bovinen Linsenkristallinmischung und h α B	121
Abb. 67	Temperatur- und zeitlicher Verlauf der Extinktion von by B in An- bzw. Abwesenheit von b α	122
Abb. 68	Relative normierte Intensitätsänderungen hγD Wildtyp & E107A in An- bzw.	124
Abb. 69	Relative normierte Intensitätsänderungen h γ D Wildtyp& E107A in An- bzw.	125
Abb 70	Vergleich aromatischer ¹ H ¹⁵ N TROSY-HSOC Spektren von hvD und W69A	130
Abb. 70	Vergleich aromatischer ¹ H ¹⁵ N TROSY-HSOC Spektren von hvD und W131A	131
Abb 72	Vergleich aromatischer ¹ H ¹⁵ N TROSY-HSOC Spektren von hvD und W157A	132
Abb. 73	Vergleich aromatischer ¹ H ¹⁵ N TROSY-HSOC Spektren von hvD und Y29A	133
Abb. 74	Vergleich aromatischer ¹ H ¹⁵ N TROSY-HSOC Spektren von hvD und Y17AY29A	134
Abb. 75	Bestimmung der Kohlenstoffpositionen in den aromatischen Ringsvetemen von hvD	135
Abb. 76	Beispielhafte Zuordnung unterschiedlicher Kohlenstoffpositionen in den aromatischen Ringsystemen von Ntd	136
Abb. 77	Beispielhafte Zuordnung unterschiedlicher Kohlenstoffpositionen in den aromatischen Ringsystemen von Ctd	137
Abb. 78	Aromatische $^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von hvD und Tryptophanyarianten	138
Abb 79	Aromatische $^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von hyD und W69A	139
Abb 80	Aromatische ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von hvD und W131A	140
Abb 81	Aromatische $^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von hyD und W157A	140
Abb. 82	Aromatische $^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von hyD und V29A	141
Abb. 83	Aromatische $^{1}H^{13}C$ constant time HSOC Spektren von hyD und V17AV20A	141
Abb. 84	Aromatische $^{1}H^{13}C$ constant time HSQC Spektren von hyD Ntd und Ctd	142
Abb. 85	¹ H ¹⁵ N TROSY-HSOC Spektren W69A und W131A vor und nach LIV-B Bestrahlung	142
Abb. 86	¹ H ¹⁵ N TROSY-HSOC Spektren W157A und Y17A vor und nach UV-B Bestrahlung	140
Abb. 87	¹ H ¹⁵ N TROSY-HSQC Spektren Y29A und Y17AY29A vor und nach UV-B Bestrahlung	145
Abb. 88	¹ H ¹⁵ N TROSY-HSQC Spektren Ntd und Ctd vor und nach UV-B Bestrahlung	146
Abb. 89	Aromatische ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von W69A vor und nach UV-B Bestrahlung	147
Abb. 90	Aromatische ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von W131A vor und nach UV-B Bestrahlung	148
Abb. 91	Aromatische ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von W157A vor und nach UV-B Bestrahlung	148
Abb. 92	Aromatische ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von Ntd vor und nach UV-B	149

	Bestrahlung	
Abb. 93	Aromatische ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von Ctd vor und nach UV-B	149
	Bestrahlung	
Abb. 94	Aromatische ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von Y17A vor und nach UV-B	150
	Bestrahlung	
Abb. 95	Aromatische ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von Y29A vor und nach UV-B	150
	Bestrahlung	
Abb. 96	Aromatische ¹ H ¹³ C constant time HSQC Spektren von Y17AY29A vor und nach UV-B	151
	Bestrahlung	
Abb. 97	Intensitätsveränderung aromatische Seitenketten von W69A, W131A und W157A vor	153
	und nach UV-B Bestrahlung	
Abb. 98	Intensitätsveränderung aromatische Seitenketten von Y17A, Y29A und Y17AY29A vor	154
	und nach UV-B Bestrahlung	
Abb. 99	Intensitätsveränderung aromatische Seitenketten von Ntd und Ctd vor und nach UV-B	155
	Bestrahlung	
Abb. 100	Vergleich aliphatische ¹ H ¹³ C Spektren hγD und E107A	156
Abb. 101	Vergleich aliphatische ¹ H ¹³ C Spektren hγD und Ntd	156
Abb. 102	Vergleich aliphatische ¹ H ¹³ C Spektren hγD und Ctd	157
Abb. 103	Aliphatische ¹ H ¹³ C Spektren Ntd vor und nach UV-B Bestrahlung	157
Abb. 104	Aliphatische ¹ H ¹³ C Spektren Ctd vor und nach UV-B Bestrahlung	158

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Gereinigte Kristalline	18
Tabelle 2	Bakterienstämme und Plasmide	19
Tabelle 3	Kits für molekularbiologische Arbeiten	19
Tabelle 4	Enzyme	19
Tabelle 5	Zusammensetzung unterschiedlicher Medien und Lösungen	19
Tabelle 6	Chemikalien	20
Tabelle 7	Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 8	Geräte und Software	21
Tabelle 9	Reaktionsbedingungen der PCR	23
Tabelle 10	Chemikalien der PCR	23
Tabelle 11	Chemikalien & Reaktionsbedingungen für Verdau und Ligation	24
Tabelle 12	Verwendete Puffer zur Reinigung von h $lpha$ B	25
Tabelle 13	Verwendete Puffer zur Reinigung von γ-Kristallinen	26
Tabelle 14	Verwendete Puffer zur Gewinnung der Kristalline aus Linsen	27
Tabelle 15	Identifizierung einzelner Kristalline aus boviner Linse	53
Tabelle 16	Konzentrationsverhältnisse einzelner Varianten vor und nach UV-B Bestrahlung	65
Tabelle 17	Intensitäten der UV-B induzierten Tyr Signalen	90
Tabelle 18	$\Delta\delta$ von hyD und E107A in Anwesenheit unterschiedlicher Interaktionspartner	123
Tabelle 19	Intensitätsänderungen von hγD und E107A in Anwesenheit unterschiedlicher	126
	Interaktionspartner	
Tabelle 20	Absolute Intensitäten aller Tyrosine von Wildtyp h γ D-Kristallin vor- und nach	152
	Bestrahlung	
Tabelle 21	Relative Intensitäten Wildtyp hγD-Kristallin für ausgewählte Tyrosinsignale	152
Tabelle 22	Relative Intensitäten Y17A hyD für ausgewählte Tyrosinsignale	152
Tabelle 23	Veränderte Intensitäten der hyD Varianten Y17A, Y29A und Y17AY29A von den	153
	Kreuzsignalen Y17 und Y29 auf Grund der fehlenden aromatischen π - π	
	Stapelpartnern	

Primer- und Proteinsequenzen

Primersequenzen

> hγD W43R_fw

TTC ATA CAG CAT GCG ACA ACC GCT ATC AAC ACG

> hγD W43R_rev

AGC GGT TGT CGC ATG CTG TAT GAA CAG C

> hγD E107A_fw

ACA GCT ACA ATC TGC GGT AAA TTC GAT CAT CTG ACC

> hyD E107A_rev

GAA TTT ACC GCA GAT TGT AGC TGT CTG CAG

> hyD Nde1_Nterm

GCT CAT ATG GGT AAA ATT ACC CTG

> hγD BamH1_Cterm

GAA GGA TCC TCA TTA GCT AAA ATC AAT AAC GCG AC

> byB Nde1_Nterm

CCG CAT ATG GGC AAA ATC ACC TTT TAT G

> bγB BamH1_Cterm

GCA GGA TCC TCA TCA ATA AAA ATC CAT AAC GCG ACG

Aminosäurensequenzen

> bγB P02526

MGKITFYEDR	GFQGHCYECS	SDCPNLQPYF	SRCNSIRVDS	GCWMLYERPN
YQGHQYFLRR	GDYPDYQQWM	GFNDSIRSCR	LIPQHTGTFR	MRIYERDDFR
GQMSEITDDC	PSLQDRFHLT	EVHSLNVLEG	SWVLYEMPSY	RGRQYLLRPG
EYRRYLDWGA	MNAKVGSLRR	VMDFY		

> hγD P07320

MGKITLYEDR	GFQGRH Y ECS	SDHPNLQP Y L	SRCNSARVDS	GC W MLYEQPN
YSGLQYFLRR	GDYADHQQ W M	GLSDSVRSCR	LIPHSGSHRI	RLYEREDYRG
QMIEFT E DCS	CLQDRFRFNE	IHSLNVLEGS	WVLYELSNYR	GRQYLLMPGD
YRRYQD W GA	TNARVGSLRR	VIDFS		

Punktmutationen der folgenden Varianten sind in fett gekennzeichnet: W43R, W69A, W131A, W157A, Y17A, Y29A, Y17A_Y29A, E107A

> hγD Ntd

MGKITLYEDR GFQGRHYECS SDHPNLQPYL SRCNSARVDS GCWMLYEQPN YSGLQYFLRR GDYADHQQWM GLSDSVRSCR LIPHSGS

> hγD Ctd

SGSHRI RLYEREDYRG QMIEFTEDCS CLQDRFRFNE IHSLNVLEGS WVLYELSNYR GRQYLLMPGD YRRYQDWGA TNARVGSLRR VIDFS

9.9. Publikationen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden in Kooperation mit unterschiedlichen Partnern des SFB - Transregio 102 folgende Publikationen veröffentlicht:

- [193] Camilles M, Link S, Balbach J, Saalwächter K, Krushelnitsky A.; Corrigendum to quantitative NMR study of heat-induced aggregation of eye-lens crystallin proteins under crowding conditions. BBAPAP Volume 1866/10 2018 1055-1061]. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom. 1867(4): p. 453-454.
- [194] Camilles M, Link S, Balbach J, Saalwächter K, Krushelnitsky A.; *Quantitative NMR* study of heat-induced aggregation of eye-lens crystallin proteins under crowding conditions. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.
- [161] Roos M, Ott M, Hofmann M, Link S, Rössler E, Balbach J, Krushelnitsky A, Saalwächter K.; Coupling and Decoupling of Rotational and Translational Diffusion of Proteins under Crowding Conditions. J Am Chem Soc. 138(32): p. 10365-72.
- [195] Roos M, Hofmann M, Link S, Ott M, Balbach J, Rössler E, Saalwächter K, Krushelnitsky A.; The "long tail" of the protein tumbling correlation function: observation by (1)H NMR relaxometry in a wide frequency and concentration range. J Biomol NMR. 63(4): p. 403-415.
- [191] Roos M, Link S, Balbach J, Krushelnitsky A, Saalwächter K.; NMR-detected Brownian dynamics of alphaB-crystallin over a wide range of concentrations. Biophys J. 108(1): p. 98-106.

Veröffentlichung in Vorbereitung:

Identification of an UV - B induced stable state B of hyD crystallin

9.10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Susanne Weininger, geb. Link
Geburtsdatum:	05.01.1985
Geburtsort:	Bietigheim – Bissingen
Familienstand:	verheiratet, ein Sohn

Werdegang

ab 02/2013	wissenschaftliche Mitarbeiterin/Promotion Institut für Physik, Arbeitsgruppe Biophysik an der MLU Halle-Wittenberg Elternzeit
05/2012 - 01/2013	u.a. Praktikum bei DUALIS MedTech GmbH, Aushilfe in Bäckerei
10/2005 - 04/2012	Studium der Physik mit Schwerpunkt Biophysik an der TU München; Abschluss: Diplom-Physikerin
07/2004 - 04/2005	Soziales Jahr als Englischlehrerin in einem Kindergarten in Thailand
09/2001 - 06/2004	Lichtenstern Gymnasium Sachsenheim, Abschluss: Abitur, allgemeine Hochschulreife
09/1995 - 07/2001	Maximilian-Lutz Realschule Besigheim, Abschluss: Realschulabschluss (mittlere Reife)

9.11. Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

"Molekulare Ursachen der Kataraktentstehung – Einfluss von UV-B Strahlung und Interaktion einzelner Kristalline"

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe und diese Dissertation weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer anderen Fakultät vorgelegt.

Halle (Saale), den 27.02.2020

Susanne Weininger

9.12. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Fachgruppe Biophysik unter der Leitung von Prof. Dr. Jochen Balbach an der MLU Halle angefertigt. Bei ihm möchte ich mich ganz besonders für das interessante Thema, für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und seine hervorragende wissenschaftliche und zwischenmenschliche Betreuung bedanken.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an alle anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Dem Biohof Barthel für die Bereitstellung der bovinen Augenlinsen und dem Universitätsklinikum Halle/Augenheilkunde für das zeitintensive und aufwändige Sammeln der kataraktbefallenen humanen Augenlinsen. Dabei möchte ich mich besonders bei Dr. med. Erik Chankiewitz und Dr. rer. nat. Cornelia Wiese-Rischke bedanken.

Weiterhin vielen lieben Dank an Dr. Anne Diehl vom Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie/NMR und Kathrin Waldheim an der MLU/Biophysik für die Herstellung der Proteine h α A bzw. der h γ D Variante Y17AY29A.

Ganz besonders möchte ich mich außerdem bei der AG Sinz an der MLU/Pharmazie, insbesondere bei Prof. Dr. Andrea Sinz, Antje Herbrich-Peters und Dr. Christine Piotrowski, für die Bereitstellung der UV-Bestrahlungseinheit bedanken. Zusätzlichen Dank gebührt auch Dr. Christian Ihling von der AG Sinz für die Durchführung und Auswertung erster Massenspektroskopischer Untersuchungen, der HALOmem Gruppe unter Prof. Dr. Kirsten Bacia, insbesondere Dr. Sebastian Daum und Claudia Müller, sowie Dr. Maria Ott und Dr. Hauke Lilie aus der Abteilung Proteinbiochemie/MLU für die Bereitstellung von unterschiedlichen Geräten und die Betreuung und Beratung bei verschiedenen biochemischen und biophysikalischer Methoden und Fragestellungen.

Vielen Dank auch bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitglieder der Fachgruppe Biophysik, die nicht nur durch ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit, sondern auch durch abwechslungsreiche Gespräche zu einer tollen Atmosphäre beigetragen haben: Stefan Gröger, Dr. Ulrich Weininger, Kathrin Waldheim, Dr. Tobias Gruber, Dr. Monika Baumann, Heike Böcker, Bruno Voigt, Constanze Westphal, Dr. Qi Zhang, Dr. Amit Kumar, Heiner Raum, Matthias Dreydoppel, Paul Becker, Natalie Breitkopf, Matthias Altenstein, Dr. Mathias Henze, Dr. Andi Klamt, Rica Patzschke und Prof. Dr. Detlef Reichert. Besonderen Dank gilt dabei Uli und Stefan bei der Unterstützung von NMRspektroskopischen Fragen und Heike, Kathrin, Bruno, Monika und Tobias bei der Unterstützung im Labor. Vielen Dank auch an meine ehemaligen Bachelor- und Masterstudenten Anja Krumbholz, Agnes Oeting, Robert Broneske und Hannes Jurack.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Festkörper-NMR Gruppe für die tolle Atmosphäre und interessanten Gespräche. Besonders bedanken möchte ich mich dabei bei Prof. Dr. Kay Saalwächter, Dr. Alexey Krushelnitsky, Dr. Matthias Roos, Maria Camilles und Maik Rothe für die tolle und lohnenswerte Zusammenarbeit bei unterschiedlichen wissenschaftlichen Projekten.

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Uli, Bruno, Heiner, Constanze und Hannes für die Korrekturen an meiner Dissertation bedanken.

Weiterhin möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung beim SBF TRR 102 (Polymere unter Zwangsbedingungen) während meiner Promotion bedanken. Vielen Dank an Thomas Michael sowie Susanne Morgan für die gewissenhafte und begeisterte Organisation und Verwaltung innerhalb des SFB und der integrierten Graduiertenschule.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden ganz herzlich bedanken. Ohne eure Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

9.13. Literaturverzeichnis

- 1. Pascolini, D. and S.P. Mariotti, *Global estimates of visual impairment: 2010.* Br J Ophthalmol. **96**(5): p. 614-8.
- 2. Shiels, A., T.M. Bennett, and J.F. Hejtmancik, *Cat-Map: putting cataract on the map.* Mol Vis. **16**: p. 2007-15.
- 3. Klein, R. and B.E. Klein, *The prevalence of age-related eye diseases and visual impairment in aging: current estimates.* Invest Ophthalmol Vis Sci. **54**(14): p. ORSF5-ORSF13.
- 4. Francis, P.J., et al., *Lens biology: development and human cataractogenesis*. Trends Genet, 1999. **15**(5): p. 191-6.
- 5. Francis, H.A.a.W., M. Hart, *Adler's physiology of the eye: clinical application*. 9 ed. 1992, St Louis.
- 6. Goodsell, D. *molecule of the month*. 2010.
- Hejtmancik, J.F., Congenital cataracts and their molecular genetics. Semin Cell Dev Biol, 2008.
 19(2): p. 134-49.
- 8. Bloemendal, H., *The vertebrate eye lens*. Science, 1977. **197**(4299): p. 127-38.
- 9. Bloemendal, H., et al., *Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins.* Prog Biophys Mol Biol, 2004. **86**(3): p. 407-85.
- 10. Carver, J.A., *Probing the structure and interactions of crystallin proteins by NMR spectroscopy*. Prog Retin Eye Res, 1999. **18**(4): p. 431-62.
- 11. Sharma, K.K. and P. Santhoshkumar, *Lens aging: effects of crystallins.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(10): p. 1095-108.
- 12. Anbarasu, K. and J. Sivakumar, *Multidimensional significance of crystallin protein-protein interactions and their implications in various human diseases.* Biochim Biophys Acta. **1860**(1 Pt B): p. 222-33.
- 13. Haslbeck, M. and E. Vierling, A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. J Mol Biol. **427**(7): p. 1537-48.
- 14. Laganowsky, A., et al., *Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function.* Protein Sci. **19**(5): p. 1031-43.
- 15. Jehle, S., et al., *alphaB-crystallin: a hybrid solid-state/solution-state NMR investigation reveals structural aspects of the heterogeneous oligomer.* J Mol Biol, 2009. **385**(5): p. 1481-97.
- 16. Bagneris, C., et al., *Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20*. J Mol Biol, 2009. **392**(5): p. 1242-52.
- 17. Kriehuber, T., et al., *Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins.* FASEB J. **24**(10): p. 3633-42.
- 18. Mainz, A., et al., *The chaperone alphaB-crystallin uses different interfaces to capture an amorphous and an amyloid client.* Nat Struct Mol Biol. **22**(11): p. 898-905.
- 19. Delbecq, S.P., S. Jehle, and R. Klevit, *Binding determinants of the small heat shock protein, alphaB-crystallin: recognition of the 'lxl' motif.* EMBO J. **31**(24): p. 4587-94.
- 20. Delbecq, S.P., J.C. Rosenbaum, and R.E. Klevit, *A Mechanism of Subunit Recruitment in Human Small Heat Shock Protein Oligomers.* Biochemistry. **54**(28): p. 4276-84.
- 21. Baldwin, A.J., et al., *Quaternary dynamics of alphaB-crystallin as a direct consequence of localised tertiary fluctuations in the C-terminus.* J Mol Biol. **413**(2): p. 310-20.
- 22. Jehle, S., et al., *Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of alphaB-crystallin oligomers.* Nat Struct Mol Biol. **17**(9): p. 1037-42.
- 23. Delbecq, S.P. and R.E. Klevit, *One size does not fit all: the oligomeric states of alphaB crystallin.* FEBS Lett. **587**(8): p. 1073-80.
- 24. Braun, N., et al., *Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone alphaB-crystallin elucidated by a triple hybrid approach.* Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(51): p. 20491-6.

- 25. Horwitz, J., *Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10449-53.
- 26. Inoue, R., et al., *New insight into the dynamical system of alphaB-crystallin oligomers.* Sci Rep. **6**: p. 29208.
- 27. Waudby, C.A., et al., *The interaction of alphaB-crystallin with mature alpha-synuclein amyloid fibrils inhibits their elongation*. Biophys J. **98**(5): p. 843-51.
- 28. Shammas, S.L., et al., *Binding of the molecular chaperone alphaB-crystallin to Abeta amyloid fibrils inhibits fibril elongation*. Biophys J. **101**(7): p. 1681-9.
- 29. Regini, J.W., et al., *The interaction of unfolding alpha-lactalbumin and malate dehydrogenase with the molecular chaperone alphaB-crystallin: a light and X-ray scattering investigation.* Mol Vis. **16**: p. 2446-56.
- 30. Treweek, T.M., et al., *Small heat-shock proteins: important players in regulating cellular proteostasis.* Cell Mol Life Sci. **72**(3): p. 429-451.
- 31. Sandilands, A., et al., *Altered aggregation properties of mutant gamma-crystallins cause inherited cataract.* EMBO J, 2002. **21**(22): p. 6005-14.
- 32. Andley, U.P., *Crystallins in the eye: Function and pathology*. Prog Retin Eye Res, 2007. **26**(1): p. 78-98.
- 33. Markossian, K.A., I.K. Yudin, and B.I. Kurganov, *Mechanism of suppression of protein aggregation by alpha-crystallin*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(3): p. 1314-45.
- 34. Sun, T.X., N.J. Akhtar, and J.J. Liang, *Thermodynamic stability of human lens recombinant alphaA- and alphaB-crystallins.* J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34067-71.
- 35. Khanova, H.A., et al., *Effect of alpha-crystallin on thermal denaturation and aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.* Biophys Chem, 2007. **125**(2-3): p. 521-31.
- 36. Sun, T.X. and J.J. Liang, *Intermolecular exchange and stabilization of recombinant human alphaA- and alphaB-crystallin.* J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 286-90.
- 37. Maiti, M., M. Kono, and B. Chakrabarti, *Heat-induced changes in the conformation of alphaand beta-crystallins: unique thermal stability of alpha-crystallin.* FEBS Lett, 1988. **236**(1): p. 109-14.
- 38. van Boekel, M.A., et al., *Eye lens alphaA- and alphaB-crystallin: complex stability versus chaperone-like activity.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1434**(1): p. 114-23.
- 39. Surewicz, W.K. and P.R. Olesen, *On the thermal stability of alpha-crystallin: a new insight from infrared spectroscopy.* Biochemistry, 1995. **34**(30): p. 9655-60.
- 40. Horwitz, J., *Alpha crystallin: the quest for a homogeneous quaternary structure.* Exp Eye Res, 2009. **88**(2): p. 190-4.
- 41. Hasan, A., et al., *Thermal stability of human alpha-crystallins sensed by amide hydrogen exchange.* Protein Sci, 2004. **13**(2): p. 332-41.
- 42. Farnsworth, P.N., et al., *Effects of temperature and concentration on bovine lens alpha-crystallin secondary structure: a circular dichroism spectroscopic study.* Int J Biol Macromol, 1997. **20**(4): p. 283-91.
- 43. Mills, I.A., et al., Folding and stability of the isolated Greek key domains of the long-lived human lens proteins gammaD-crystallin and gammaS-crystallin. Protein Sci, 2007. **16**(11): p. 2427-44.
- 44. Vendra, V.P., et al., *Structural integrity of the Greek key motif in betagamma-crystallins is vital for central eye lens transparency*. PLoS One. **8**(8): p. e70336.
- 45. Sakaue, H., et al., *Alpha B- and betaA3-crystallins containing d-aspartic acids exist in a monomeric state.* Biochim Biophys Acta. **1854**(1): p. 1-9.
- 46. Vendra, V.P. and D. Balasubramanian, *Structural and aggregation behavior of the human gammaD-crystallin mutant E107A, associated with congenital nuclear cataract.* Mol Vis. **16**: p. 2822-8.

- 47. Kosinski-Collins, M.S., S.L. Flaugh, and J. King, *Probing folding and fluorescence quenching in human gammaD crystallin Greek key domains using triple tryptophan mutant proteins.* Protein Sci, 2004. **13**(8): p. 2223-35.
- 48. Serebryany, E. and J.A. King, *The betagamma-crystallins: native state stability and pathways to aggregation.* Prog Biophys Mol Biol. **115**(1): p. 32-41.
- 49. Asherie, N., et al., *Enhanced crystallization of the Cys18 to Ser mutant of bovine gammaB crystallin.* J Mol Biol, 2001. **314**(4): p. 663-9.
- 50. Sen, A.C., M.T. Walsh, and B. Chakrabarti, *An insight into domain structures and thermal stability of gamma-crystallins*. J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 11898-907.
- 51. Pattison, D.I., A.S. Rahmanto, and M.J. Davies, *Photo-oxidation of proteins*. Photochem Photobiol Sci. **11**(1): p. 38-53.
- 52. Kosinski-Collins, M.S. and J. King, *In vitro unfolding, refolding, and polymerization of human gammaD crystallin, a protein involved in cataract formation.* Protein Sci, 2003. **12**(3): p. 480-90.
- 53. Mayr, E.M., R. Jaenicke, and R. Glockshuber, *The domains in gammaB-crystallin: identical fold-different stabilities.* J Mol Biol, 1997. **269**(2): p. 260-9.
- 54. Wieligmann, K., E.M. Mayr, and R. Jaenicke, *Folding and self-assembly of the domains of betaB2-crystallin from rat eye lens.* J Mol Biol, 1999. **286**(4): p. 989-94.
- 55. Vendra, V.P., et al., *Gamma crystallins of the human eye lens*. Biochim Biophys Acta. **1860**(1 Pt B): p. 333-43.
- 56. Roshan, M., et al., *A novel human CRYGD mutation in a juvenile autosomal dominant cataract.* Mol Vis. **16**: p. 887-96.
- 57. Flaugh, S.L., M.S. Kosinski-Collins, and J. King, *Interdomain side-chain interactions in human gammaD crystallin influencing folding and stability.* Protein Sci, 2005. **14**(8): p. 2030-43.
- Flaugh, S.L., M.S. Kosinski-Collins, and J. King, *Contributions of hydrophobic domain interface interactions to the folding and stability of human gammaD-crystallin.* Protein Sci, 2005. 14(3): p. 569-81.
- 59. Das, P., J.A. King, and R. Zhou, *beta-Strand interactions at the domain interface critical for the stability of human lens gammaD-crystallin.* Protein Sci. **19**(1): p. 131-40.
- 60. Evans, P., et al., *The P23T cataract mutation causes loss of solubility of folded gammaD-crystallin.* J Mol Biol, 2004. **343**(2): p. 435-44.
- 61. Pande, A., et al., *Decrease in protein solubility and cataract formation caused by the Pro23 to Thr mutation in human gamma D-crystallin.* Biochemistry, 2005. **44**(7): p. 2491-500.
- 62. Pande, A., et al., *NMR study of the cataract-linked P23T mutant of human gammaD-crystallin shows minor changes in hydrophobic patches that reflect its retrograde solubility.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **382**(1): p. 196-9.
- 63. Pande, A., et al., *Molecular basis of a progressive juvenile-onset hereditary cataract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 1993-8.
- 64. Stephan, D.A., et al., *Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the gammaD-crystallin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(3): p. 1008-12.
- 65. VanderVeen, D.K., et al., *Crystalline cataract caused by a heterozygous missense mutation in gammaD-crystallin (CRYGD).* Mol Vis. **17**: p. 3333-8.
- 66. Kmoch, S., et al., *Link between a novel human gammaD-crystallin allele and a unique cataract phenotype explained by protein crystallography.* Hum Mol Genet, 2000. **9**(12): p. 1779-86.
- 67. Pande, A., et al., *Crystal cataracts: human genetic cataract caused by protein crystallization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6116-20.
- 68. Basak, A., et al., *High-resolution X-ray crystal structures of human gammaD crystallin (1.25 A) and the R58H mutant (1.15 A) associated with aculeiform cataract.* J Mol Biol, 2003. **328**(5): p. 1137-47.
- 69. Banerjee, P.R., et al., *Cataract-associated mutant E107A of human gammaD-crystallin shows increased attraction to alpha-crystallin and enhanced light scattering.* Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(2): p. 574-9.

- 70. Ji, F., J. Jung, and A.M. Gronenborn, *Structural and biochemical characterization of the childhood cataract-associated R76S mutant of human gammaD-crystallin.* Biochemistry. **51**(12): p. 2588-96.
- 71. Messina-Baas, O.M., L.M. Gonzalez-Huerta, and S.A. Cuevas-Covarrubias, *Two affected siblings with nuclear cataract associated with a novel missense mutation in the CRYGD gene.* Mol Vis, 2006. **12**: p. 995-1000.
- 72. Wang, B., et al., A novel CRYGD mutation (p.Trp43Arg) causing autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. Hum Mutat. **32**(1): p. E1939-47.
- 73. Ji, F., et al., *The human W42R gammaD-crystallin mutant structure provides a link between congenital and age-related cataracts.* J Biol Chem. **288**(1): p. 99-109.
- 74. Santana, A., et al., *Mutation analysis of CRYAA, CRYGC, and CRYGD associated with autosomal dominant congenital cataract in Brazilian families.* Mol Vis, 2009. **15**: p. 793-800.
- 75. Hansen, L., et al., *Comprehensive mutational screening in a cohort of Danish families with hereditary congenital cataract.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(7): p. 3291-303.
- 76. Zhai, Y., et al., A nonsense mutation of gammaD-crystallin associated with congenital nuclear and posterior polar cataract in a Chinese family. Int J Med Sci. **11**(2): p. 158-63.
- 77. Zhang, L.Y., et al., *A novel deletion variant of gammaD-crystallin responsible for congenital nuclear cataract.* Mol Vis, 2007. **13**: p. 2096-104.
- 78. Serebryany, E., et al., *An Internal Disulfide Locks a Misfolded Aggregation-prone Intermediate in Cataract-linked Mutants of Human gammaD-Crystallin.* J Biol Chem. **291**(36): p. 19172-83.
- 79. Serebryany, E., et al., *Dynamic disulfide exchange in a crystallin protein in the human eye lens promotes cataract-associated aggregation.* J Biol Chem. **293**(46): p. 17997-18009.
- 80. Chen, J., et al., *Mechanism of the highly efficient quenching of tryptophan fluorescence in human gammaD-crystallin.* Biochemistry, 2006. **45**(38): p. 11552-63.
- 81. Serebryany, E. and J.A. King, *Wild-type human gammaD-crystallin promotes aggregation of its oxidation-mimicking, misfolding-prone W42Q mutant.* J Biol Chem. **290**(18): p. 11491-503.
- 82. Wong, E.K., et al., *Molecular Mechanism of Aggregation of the Cataract-Related gammaD-Crystallin W42R Variant from Multiscale Atomistic Simulations.* Biochemistry. **58**(35): p. 3691-3699.
- 83. Broneske, R., *Interaktionsstudie humaner Augenlinsenkristalline*, in *Biochemie & Physik*. 2016, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle.
- 84. Klein, B.E., R. Klein, and K.E. Lee, *Incidence of age-related cataract over a 10-year interval: the Beaver Dam Eye Study.* Ophthalmology, 2002. **109**(11): p. 2052-7.
- 85. Shiels, A. and J.F. Hejtmancik, *Molecular Genetics of Cataract*. Prog Mol Biol Transl Sci. **134**: p. 203-18.
- 86. NEI. *Cataract; A white congenital cataract*. [cited 2012; Available from: https://www.flickr.com/photos/nationaleyeinstitute/7544344214/in/photostream/.
- 87. Hejtmancik, J.F. and M. Kantorow, *Molecular genetics of age-related cataract.* Exp Eye Res, 2004. **79**(1): p. 3-9.
- 88. Huang, B. and W. He, *Molecular characteristics of inherited congenital cataracts*. Eur J Med Genet. **53**(6): p. 347-57.
- 89. Tsentalovich, Y.P., et al., *Metabolomic composition of normal aged and cataractous human lenses.* Exp Eye Res. **134**: p. 15-23.
- 90. McCarty, C.A. and H.R. Taylor, *A review of the epidemiologic evidence linking ultraviolet radiation and cataracts.* Dev Ophthalmol, 2002. **35**: p. 21-31.
- 91. Sliney, D.H., *How light reaches the eye and its components.* Int J Toxicol, 2002. **21**(6): p. 501-9.
- 92. Mäntele, P.D.W., *Biopyhsik*. 2012, Stuttgart: Ulmer UTB.
- 93. Noll, R.W.u.F., *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner Studienbücher Chemie. 1998, Stuttgart: Teubner.

- 94. Streete, I.M., J.F. Jamie, and R.J. Truscott, *Lenticular levels of amino acids and free UV filters differ significantly between normals and cataract patients.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004.
 45(11): p. 4091-8.
- 95. Gakamsky, A., et al., *Tryptophan and Non-Tryptophan Fluorescence of the Eye Lens Proteins Provides Diagnostics of Cataract at the Molecular Level.* Sci Rep. **7**: p. 40375.
- 96. Gakamsky, D.M., et al., *Exploring the possibility of early cataract diagnostics based on tryptophan fluorescence.* J R Soc Interface. **8**(64): p. 1616-21.
- 97. Serebryany, E., et al., *Aggregation of Trp > Glu point mutants of human gamma-D crystallin provides a model for hereditary or UV-induced cataract.* Protein Sci. **25**(6): p. 1115-28.
- 98. Hains, P.G. and R.J. Truscott, *Post-translational modifications in the nuclear region of young, aged, and cataract human lenses.* J Proteome Res, 2007. **6**(10): p. 3935-43.
- 99. Hains, P.G. and R.J. Truscott, *Proteomic analysis of the oxidation of cysteine residues in human age-related nuclear cataract lenses.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(12): p. 1959-64.
- 100. Schafheimer, N., et al., *Tyrosine/cysteine cluster sensitizing human gammaD-crystallin to ultraviolet radiation-induced photoaggregation in vitro*. Biochemistry. **53**(6): p. 979-90.
- 101. Bova, L.M., et al., UV filter compounds in human lenses: the origin of 4-(2-amino-3hydroxyphenyl)-4-oxobutanoic acid O-beta-D-glucoside. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(13): p. 3237-44.
- 102. Korlimbinis, A. and R.J. Truscott, *Identification of 3-hydroxykynurenine bound to proteins in the human lens. A possible role in age-related nuclear cataract.* Biochemistry, 2006. **45**(6): p. 1950-60.
- 103. R.V. Bensasson, E.J.L.a.T.G.T., *Excited states and free readicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 1993.
- 104. WHO, *The Effects of Solar UV Radiation on the Eye.* Programme for the Prevention of Blindness Office of Global and Integrated Environmental Health, 1993.
- 105. Sliney, D.H., *UV radiation ocular exposure dosimetry.* J Photochem Photobiol B, 1995. **31**(1-2): p. 69-77.
- 106. Schafheimer, N. and J. King, *Tryptophan cluster protects human gammaD-crystallin from ultraviolet radiation-induced photoaggregation in vitro*. Photochem Photobiol. **89**(5): p. 1106-15.
- 107. Robman, L. and H. Taylor, *External factors in the development of cataract.* Eye (Lond), 2005. **19**(10): p. 1074-82.
- 108. Sliney, D.H., *Geometrical gradients in the distribution of temperature and absorbed ultraviolet radiation in ocular tissues.* Dev Ophthalmol, 2002. **35**: p. 40-59.
- 109. Mainster, M.A. and P.L. Turner, *Ultraviolet-B phototoxicity and hypothetical photomelanomagenesis: intraocular and crystalline lens photoprotection.* Am J Ophthalmol. **149**(4): p. 543-9.
- 110. Barker FM, B.G., *The direct spectral transmittance of the excised human lens as a function of age*, U.F.a.D.A.W. DC, Editor. 1991.
- 111. Lakowicz, J.R., ed. *Principles of Fluorescence Spectorscopy*. Third Edition ed. 2006, Springer: New York.
- 112. Moens, P.D., M.K. Helms, and D.M. Jameson, *Detection of tryptophan to tryptophan energy transfer in proteins*. Protein J, 2004. **23**(1): p. 79-83.
- 113. Borkman, R.F. and S.R. Phillips, *Tyrosine-to-tryptophan energy transfer and the structure of calf gamma-II crystallin.* Exp Eye Res, 1985. **40**(6): p. 819-26.
- 114. Kurzel, R.B., et al., *Tryptophan excited states and cataracts in the human lens*. Nature, 1973. **241**(5385): p. 132-3.
- 115. Vivian, J.T. and P.R. Callis, *Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins*. Biophys J, 2001. **80**(5): p. 2093-109.
- 116. Chen, Y. and M.D. Barkley, *Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins*. Biochemistry, 1998. **37**(28): p. 9976-82.

- 117. Muino, P.L. and P.R. Callis, Solvent effects on the fluorescence quenching of tryptophan by amides via electron transfer. Experimental and computational studies. J Phys Chem B, 2009. **113**(9): p. 2572-7.
- 118. Gebicki, J.M., et al., *Reduction of protein radicals by GSH and ascorbate: potential biological significance.* Amino Acids. **39**(5): p. 1131-7.
- 119. Chen, J., P.R. Callis, and J. King, *Mechanism of the very efficient quenching of tryptophan fluorescence in human gamma D- and gamma S-crystallins: the gamma-crystallin fold may have evolved to protect tryptophan residues from ultraviolet photodamage.* Biochemistry, 2009. **48**(17): p. 3708-16.
- 120. Van Montfort, R.L., et al., *Crystal structure of truncated human betaB1-crystallin.* Protein Sci, 2003. **12**(11): p. 2606-12.
- 121. Purkiss, A.G., et al., *The X-ray crystal structure of human gamma S-crystallin C-terminal domain.* J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 4199-205.
- 122. Norledge, B.V., et al., *Towards a molecular understanding of phase separation in the lens: a comparison of the X-ray structures of two high Tc gamma-crystallins, gammaE and gammaF, with two low Tc gamma-crystallins, gammaB and gammaD.* Exp Eye Res, 1997. **65**(5): p. 609-30.
- 123. Kumaraswamy, V.S., et al., *An eye lens protein-water structure: 1.2 A resolution structure of gammaB-crystallin at 150 K.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1996. **52**(Pt 4): p. 611-22.
- 124. Shimeld, S.M., et al., *Urochordate betagamma-crystallin and the evolutionary origin of the vertebrate eye lens.* Curr Biol, 2005. **15**(18): p. 1684-9.
- 125. Moran, S.D., et al., *Amyloid fiber formation in human gammaD-Crystallin induced by UV-B photodamage*. Biochemistry. **52**(36): p. 6169-81.
- 126. Alperstein, A.M., et al., *Amyloid found in human cataracts with two-dimensional infrared spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A. **116**(14): p. 6602-6607.
- 127. Wang, S.S. and W.S. Wen, *Examining the influence of ultraviolet C irradiation on recombinant human gammaD-crystallin.* Mol Vis. **16**: p. 2777-90.
- 128. Cetinel, S., et al., UV-B induced fibrillization of crystallin protein mixtures. PLoS One. **12**(5): p. e0177991.
- 129. Moran, S.D., S.M. Decatur, and M.T. Zanni, *Structural and sequence analysis of the human gammaD-crystallin amyloid fibril core using 2D IR spectroscopy, segmental 13C labeling, and mass spectrometry.* J Am Chem Soc. **134**(44): p. 18410-6.
- 130. Searle, B.C., et al., *Identification of protein modifications using MS/MS de novo sequencing and the OpenSea alignment algorithm.* J Proteome Res, 2005. **4**(2): p. 546-54.
- 131. Truscott, R.J., *Age-related nuclear cataract-oxidation is the key.* Exp Eye Res, 2005. **80**(5): p. 709-25.
- 132. Xia, Z., et al., UV-radiation induced disruption of dry-cavities in human gammaD-crystallin results in decreased stability and faster unfolding. Sci Rep. **3**: p. 1560.
- 133. Tallmadge, D.H. and R.F. Borkman, *The rates of photolysis of the four individual tryptophan residues in UV exposed calf gamma-II crystallin.* Photochem Photobiol, 1990. **51**(3): p. 363-8.
- 134. Piotrowski, C., C.H. Ihling, and A. Sinz, *Extending the cross-linking/mass spectrometry strategy: Facile incorporation of photo-activatable amino acids into the model protein calmodulin in Escherichia coli cells.* Methods. **89**: p. 121-7.
- 135. Delaglio, F., et al., *NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes.* J Biomol NMR, 1995. **6**(3): p. 277-93.
- 136. Zhang, Q., Selection of an artificial binding protein against the ectodomain of PTH1R, in Naturwissenschaftliche Fakultät I. 14.03.2013, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle (Saale).
- 137. Schagger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem, 1987. **166**(2): p. 368-79.

- 138. Horwitz, J., et al., *Lens alpha-crystallin: function and structure*. Eye (Lond), 1999. **13 (Pt 3b)**: p. 403-8.
- 139. Miesbauer, L.R., et al., *Post-translational modifications of water-soluble human lens crystallins from young adults.* J Biol Chem, 1994. **269**(17): p. 12494-502.
- 140. Oetting, A., *Einsatz humaner Linsenextrakte zur biophysikalischen Charakterisierung von Katarakt,* in *Naturwissenschaftliche Fakultät II.* 2016, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle.
- 141. Lossl, P. and A. Sinz, *Combining Amine-Reactive Cross-Linkers and Photo-Reactive Amino Acids for 3D-Structure Analysis of Proteins and Protein Complexes*. Methods Mol Biol. **1394**: p. 109-127.
- 142. J. Cavanagh, W.J.F., A.G. Palmer III, M. Rance, N.J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy*. Second Edition ed. 2007.
- 143. Sattler, M., J. Schleucher, and C. Griesinger, *Heteronuclear multidimensional NMR* experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1999. **34**(2): p. 93-158.
- 144. Bodenhausen, G. and D.J. Ruben, *Natural Abundance N-15 Nmr by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy.* Chemical Physics Letters, 1980. **69**(1): p. 185-189.
- 145. Piotto, M., V. Saudek, and V. Sklenar, *Gradient-Tailored Excitation for Single-Quantum Nmr-Spectroscopy of Aqueous-Solutions.* Journal of Biomolecular Nmr, 1992. **2**(6): p. 661-665.
- 146. Liu, M.L., et al., *Three-dimensional maximum-quantum correlation HMQC NMR spectroscopy* (*3D MAXY-HMQC*). Journal of Magnetic Resonance, 1997. **129**(1): p. 67-73.
- 147. States, D.J., R.A. Haberkorn, and D.J. Ruben, *A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in 4 Quadrants.* Journal of Magnetic Resonance, 1982. **48**(2): p. 286-292.
- 148. Morris, G.A., *Multidimensional NMR Methods for the Solution State*, ed. J.W. Emsley. 2010: John Wiley & Sons Ltd.
- 149. Mori, S., et al., *Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation.* J Magn Reson B, 1995. **108**(1): p. 94-8.
- 150. Weigelt, J., *Single scan, sensitivity- and gradient-enhanced TROSY for multidimensional NMR experiments.* Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(41): p. 10778-10779.
- 151. Geen, H. and R. Freeman, *Band-Selective Radiofrequency Pulses*. Journal of Magnetic Resonance, 1991. **93**(1): p. 93-141.
- Shaka, A.J., P.B. Barker, and R. Freeman, *Computer-Optimized Decoupling Scheme for Wideband Applications and Low-Level Operation*. Journal of Magnetic Resonance, 1985.
 64(3): p. 547-552.
- 153. Wüthrich, K., *NMR of Proteins and Nuclei Acids*. 1986, New York: WILEY.
- 154. Ikura, M., L.E. Kay, and A. Bax, A Novel-Approach for Sequential Assignment of H-1, C-13, and N-15 Spectra of Larger Proteins Heteronuclear Triple-Resonance 3-Dimensional Nmr-Spectroscopy Application to Calmodulin. Biochemistry, 1990. **29**(19): p. 4659-4667.
- 155. Kay, L.E., et al., *3-Dimensional Triple-Resonance Nmr-Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins.* Journal of Magnetic Resonance, 1990. **89**(3): p. 496-514.
- 156. Lescop, E., P. Schanda, and B. Brutscher, *A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment.* Journal of Magnetic Resonance, 2007. **187**(1): p. 163-169.
- 157. Grzesiek, S. and A. Bax, *Correlating Backbone Amide and Side-Chain Resonances in Larger Proteins by Multiple Relayed Triple Resonance Nmr.* Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(16): p. 6291-6293.
- 158. Yamazaki, T., J.D. Formankay, and L.E. Kay, 2-Dimensional Nmr Experiments for Correlating C-13-Beta and H-1-Delta/Epsilon Chemical-Shifts of Aromatic Residues in C-13-Labeled Proteins Via Scalar Couplings. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(23): p. 11054-11055.

- 159. Pelton, J.G., et al., *Tautomeric States of the Active-Site Histidines of Phosphorylated and Unphosphorylated Iii(Glc), a Signal-Transducing Protein from Escherichia-Coli, Using 2-Dimensional Heteronuclear Nmr Techniques.* Protein Science, 1993. **2**(4): p. 543-558.
- 160. Roos, M., Brownian Dynamics of Globular Proteins, in Naturwissenschaftlich Fakultaet II Chemie, Physik und Mathematik. 2016, Martin-Luther-University: Halle.
- 161. Roos, M., et al., *Coupling and Decoupling of Rotational and Translational Diffusion of Proteins under Crowding Conditions*. J Am Chem Soc. **138**(32): p. 10365-72.
- 162. Krumbholz, A., *Stabilitätsuntersuchungen am gB-Kristallin der bovinen Linse*, in *Naturwissenschafltiche Fakultät II*. 2015, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle.
- 163. Jurack, H., Einfluss von UVB-Strahlung und thermischen Stress auf das humane gD-Kristallin, in Naturwissenschaftliche Fakultät II. 2017, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle.
- 164. Kingsley, C.N., et al., *Preferential and specific binding of human alphaB-crystallin to a cataract-related variant of gammaS-crystallin*. Structure. **21**(12): p. 2221-7.
- 165. Moreau, K.L. and J.A. King, *Cataract-causing defect of a mutant gamma-crystallin proceeds through an aggregation pathway which bypasses recognition by the alpha-crystallin chaperone*. PLoS One. **7**(5): p. e37256.
- 166. Wang, J., et al., *Determination of multicomponent protein structures in solution using global orientation and shape restraints.* J Am Chem Soc, 2009. **131**(30): p. 10507-15.
- 167. Platzer, G., M. Okon, and L.P. McIntosh, *pH-dependent random coil (1)H, (13)C, and (15)N chemical shifts of the ionizable amino acids: a guide for protein pK a measurements.* J Biomol NMR. **60**(2-3): p. 109-29.
- 168. Acosta-Sampson, L. and J. King, *Partially folded aggregation intermediates of human gammaD-, gammaC-, and gammaS-crystallin are recognized and bound by human alphaB-crystallin chaperone.* J Mol Biol. **401**(1): p. 134-52.
- 169. Michiel, M., et al., *Aggregation of deamidated human betaB2-crystallin and incomplete rescue by alpha-crystallin chaperone.* Exp Eye Res. **90**(6): p. 688-98.
- 170. Mishra, S., R.A. Stein, and H.S. McHaourab, *Cataract-linked gammaD-crystallin mutants have weak affinity to lens chaperones alpha-crystallins.* FEBS Lett. **586**(4): p. 330-6.
- 171. McHaourab, H.S., M.S. Kumar, and H.A. Koteiche, *Specificity of alphaA-crystallin binding to destabilized mutants of betaB1-crystallin.* FEBS Lett, 2007. **581**(10): p. 1939-43.
- 172. Ghosh, K.S., A. Pande, and J. Pande, *Binding of gamma-crystallin substrate prevents the binding of copper and zinc ions to the molecular chaperone alpha-crystallin.* Biochemistry. 50(16): p. 3279-81.
- 173. Abgar, S., et al., Study of the chaperoning mechanism of bovine lens alpha-crystallin, a member of the alpha-small heat shock superfamily. Biophys J, 2001. **80**(4): p. 1986-95.
- 174. Abgar, S., et al., *Chaperone-like activity of bovine lens alpha-crystallin in the presence of dithiothreitol-destabilized proteins: characterization of the formed complexes.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(2): p. 619-25.
- 175. Lindner, R.A., A. Kapur, and J.A. Carver, *The interaction of the molecular chaperone, alpha-crystallin, with molten globule states of bovine alpha-lactalbumin.* J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27722-9.
- 176. Carver, J.A., et al., *The interaction of the molecular chaperone alpha-crystallin with unfolding alpha-lactalbumin: a structural and kinetic spectroscopic study.* J Mol Biol, 2002. **318**(3): p. 815-27.
- 177. Friedrich, M.G. and R.J. Truscott, *Large-scale binding of alpha-crystallin to cell membranes of aged normal human lenses: a phenomenon that can be induced by mild thermal stress.* Invest Ophthalmol Vis Sci. **51**(10): p. 5145-52.
- 178. Dorsaz, N., et al., *Colloidal characterization and thermodynamic stability of binary eye lens protein mixtures.* J Phys Chem B, 2009. **113**(6): p. 1693-709.
- 179. Banerjee, P.R., et al., *Molecular mechanism of the chaperone function of mini-alpha-crystallin, a 19-residue peptide of human alpha-crystallin.* Biochemistry. **54**(2): p. 505-15.
- 180. Stradner, A., et al., *New insight into cataract formation: enhanced stability through mutual attraction.* Phys Rev Lett, 2007. **99**(19): p. 198103.
- 181. Xu, J., et al., *Femtosecond fluorescence spectra of tryptophan in human gamma-crystallin mutants: site-dependent ultrafast quenching.* J Am Chem Soc, 2009. **131**(46): p. 16751-7.
- 182. Chen, J., et al., *Mechanism of the efficient tryptophan fluorescence quenching in human gammaD-crystallin studied by time-resolved fluorescence.* Biochemistry, 2008. **47**(40): p. 10705-21.
- 183. Kong, F. and J. King, *Contributions of aromatic pairs to the folding and stability of long-lived human gammaD-crystallin.* Protein Sci. **20**(3): p. 513-28.
- 184. Yang, Z., et al., *Dissecting the contributions of beta-hairpin tyrosine pairs to the folding and stability of long-lived human gammaD-crystallins.* Nanoscale. **6**(3): p. 1797-807.
- 185. Bai, Y., et al., *Protein stability parameters measured by hydrogen exchange*. Proteins, 1994. **20**(1): p. 4-14.
- 186. uniprot. *Sequence allignment*. Available from: https://www.uniprot.org/help/sequence-alignments.
- 187. Quintanar, L., et al., *Copper and Zinc Ions Specifically Promote Nonamyloid Aggregation of the Highly Stable Human gamma-D Crystallin*. ACS Chem Biol. **11**(1): p. 263-72.
- 188. McCall, J.D. and K.S. Anseth, *Thiol-ene photopolymerizations provide a facile method to encapsulate proteins and maintain their bioactivity*. Biomacromolecules. **13**(8): p. 2410-7.
- 189. Shen, H.R., et al., *Photodynamic crosslinking of proteins. I. Model studies using histidine- and lysine-containing N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers.* J Photochem Photobiol B, 1996. **34**(2-3): p. 203-10.
- 190. Liao, J.H., J.S. Lee, and S.H. Chiou, *Distinct roles of alphaA- and alphaB-crystallins under thermal and UV stresses.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **295**(4): p. 854-61.
- 191. Roos, M., et al., *NMR-detected brownian dynamics of alphaB-crystallin over a wide range of concentrations*. Biophys J. **108**(1): p. 98-106.
- Harris, K.R. and L.A. Woolf, *Temperature and volume dependence of the viscosity of water and heavy water at low temperatures*. Journal of Chemical and Engineering Data, 2004.
 49(4): p. 1064-1069.
- 193. Camilles, M., et al., *Corrigendum to quantitative NMR study of heat-induced aggregation of eye-lens crystallin proteins under crowding conditions. BBAPAP Volume 1866/10 2018 1055-1061].* Biochim Biophys Acta Proteins Proteom. **1867**(4): p. 453-454.
- 194. Camilles, M., et al., *Quantitative NMR study of heat-induced aggregation of eye-lens crystallin proteins under crowding conditions.* Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.
- 195. Roos, M., et al., *The "long tail" of the protein tumbling correlation function: observation by* (1)H NMR relaxometry in a wide frequency and concentration range. J Biomol NMR. **63**(4): p. 403-415.