

Faltung und Dynamik von Onconase
Bedeutung eines konservierten Faltungsintermediats und der
C-terminalen Disulfidbrücke

DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I-Biowissenschaften
der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von
Cindy Schulenburg
geboren am 18.04.1982 in Salzwedel

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann
2. PD Dr. Ralph Golbik
3. Prof. Dr. Reinhard Sterner

Halle (Saale), 07. Mai 2009

1	ABKÜRZUNGEN	4
2	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	7
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	9
3.1	PROTEINSTABILITÄT	9
3.1.1	BESTIMMUNG DER PARAMETER DER THERMODYNAMISCHEN STABILITÄT	11
3.1.2	BESTIMMUNG DER PARAMETER DER KINETISCHEN STABILITÄT	13
3.2	INTERMEDIATE IN DER PROTEINFALTUNG	14
3.2.1	INTERMEDIATANALYSE	15
3.2.2	ANALYSE DER FALTUNG	17
3.3	PEPTIDYL-PROLYL-CIS/TRANS-ISOMERISIERUNG	18
3.4	EINFLUSS VON DISULFIDBRÜCKEN AUF DIE PROTEINSTABILITÄT UND -FALTUNG	20
3.5	AUSGEWÄHLTE TECHNIKEN ZUR UNTERSUCHUNG VON FALTUNGSREAKTIONEN	22
3.5.1	SCHNELLE MISCHTECHNIKEN	22
3.5.2	NMR-SPEKTROSKOPIE	24
3.6	DIE RNASE A SUPERFAMILIE	29
3.6.1	RNASE A	30
3.6.2	ONCONASE	33
4	MATERIALIEN UND METHODEN	38
4.1	MATERIALIEN	38
4.1.1	BAKTERIENSTÄMME, VEKTOREN UND PRIMER	38
4.1.2	NÄHRMEDIEN	39
4.1.3	PROTEINE	39
4.1.4	CHEMIKALIEN	40
4.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	41
4.2.1	KLONIERUNG DES <i>C87A/C104A-ONC-GENS</i> IN DEN VEKTOR pET26B(+)	41
4.2.2	TRANSFORMATION	42
4.2.3	GLYCERINKULTUREN	42
4.2.4	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA	42
4.3	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	43
4.3.1	GENEXPRESSION	43
4.3.2	ZELLAUFSCHLUSS, PRÄPARATION UND SOLUBILISIERUNG VON <i>INCLUSION BODIES</i>	43
4.3.3	OXIDATIV-PRÄPARATIVE RENATURIERUNG	44
4.3.4	KONZENTRIERUNG	44
4.3.5	PROTEINREINIGUNG	44
4.3.6	ZYKLISIERUNG DES N-TERMINALEN GLUTAMINRESTES ZUM PYROGLUTAMATREST	44
4.3.7	MASSENSPEKTROMETRIE	45
4.3.8	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	45
4.3.9	GEFRIERTROCKNUNG	45
4.3.10	SDS-PAGE NACH LAEMMLI	45
4.3.11	AKTIVITÄTSTEST	46
4.3.12	CD-SPEKTROSKOPIE	46
4.3.13	FLUORESZENZMESSUNGEN	47
4.3.14	BESTIMMUNG DER INTRINSISCHEN GESCHWINDIGKEITSKONSTANTEN	51
4.3.15	NMR-MESSUNGEN	52
4.3.16	AMIDPROTONENAUSTAUSCHEXPERIMENTE	54

4.3.17	KRISTALLISATION	55
5	ERGEBNISSE	57
5.1	KINETISCHE PHASEN IN DER FALTUNG VON ONCONASE	57
5.1.1	INDIZIEN FÜR EINEN KOMPLEXEN FALTUNGSPROZESS	57
5.1.2	ANALYSE DER FALTUNGSKINETIK MIT <i>STOPPED-FLOW</i> -FLUORESCENZSPEKTROSKOPIE	57
5.2	ZUORDNUNG DER KINETISCHEN FALTUNGSPHASEN ZU FALTUNGSEREIGNISSEN	60
5.2.1	ANS-BINDUNGSSTUDIEN	60
5.2.2	EINFLUSS VON PPIASEN AUF DIE RÜCKFALTUNGSREAKTION	63
5.2.3	UNTERSUCHUNG DER RÜCKFALTUNG MITTELS ECHTZEIT-NMR-SPEKTROSKOPIE	64
5.2.4	TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER RÜCKFALTUNGSREAKTION	66
5.2.5	BILDUNG VON NATIVEM PROTEIN WÄHREND DER RÜCKFALTUNG	67
5.2.6	REAKTIVIERUNGSMESSUNG	68
5.2.7	UNTERSUCHUNG VON $k_{\text{FAST}}^{\text{F}}$ MIT HILFE VON DOPPELSPRUNGEXPERIMENTEN	69
5.2.8	ECHTZEIT-NMR-UNTERSUCHUNG DER ENTFALTUNG	74
5.3	FALTUNGSMECHANISMUS VON ONCONASE	75
5.4	IDENTIFIZIERUNG DER AN DER BILDUNG VON I_{ONC} BETEILIGTEN AMINOSÄURERESTE	77
5.4.1	VERGLEICHS- UND KONTROLLMESSUNGEN	77
5.4.2	<i>QUENCHED-FLOW</i> -H/D-AUSTAUSCHEXPERIMENTE	78
5.5	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DER C-TERMINALEN DISULFIDBRÜCKE AUF DIE FALTUNG VON ONCONASE	81
5.5.1	UNTERSUCHUNG DER FALTUNGSREAKTIONEN VON C87A/C104A-ONC AUF SCHNELLE FALTUNGSEREIGNISSE	81
5.5.2	EINFLUSS DER MUTATIONEN AUF DIE TERTIÄRSTRUKTUR	85
5.5.3	AUSWIRKUNG DER EINGEFÜHRTEEN MUTATIONEN AUF DIE PROTEINDYNAMIK	88
6	DISKUSSION	92
6.1	FALTUNGSVERHALTEN VON ONCONASE	92
6.2	VERGLEICH DES FALTUNGSVERHALTENS VON ONCONASE UND RNASE A	96
6.3	EINFLUSS DER C-TERMINALEN DISULFIDBRÜCKE AUF DIE FALTUNG VON ONCONASE	98
7	ZUSAMMENFASSUNG	102
8	LITERATURVERZEICHNIS	104
9	ANHANG	111

1 Abkürzungen

[D]	Denaturationskonzentration
$[D]_{50\%}$	Denaturationskonzentration, bei der $[N]=[U]$ ist
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<E	Pyroglutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-MS	<i>electrospray-ionization mass spectrometry</i>
f_D	Anteil an entfaltetem Protein
f_N	Anteil an nativem Protein
GdnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GdnSCN	Guanidiniumthiocyanat
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
h	Plancksches Wirkungsquantum
H/D	Wasserstoff/Deuterium
H/H	Wasserstoff/Wasserstoff
hNOE	<i>heteronuclear Overhauser effect</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
I	Intermediat
I_{ONC}	Intermediat von Onconase
<i>ibs</i>	<i>inclusion bodies</i>
IC ₅₀	Konzentration an Toxin, bei der 50% der Zellen abgetötet sind
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
k_B	Boltzmann-Konstante
K_D	Gleichgewichtskonstante der Entfaltung
k_{cl}	Geschwindigkeitskonstante der Amidprotonenschließreaktion
k_{ex}	Geschwindigkeitskonstante der H/D Amidprotonenaustauschreaktion

1. Abkürzungen

k_f, k_u	intrinsische Geschwindigkeitskonstante der Rück- bzw. Entfaltungsreaktion
k_{HX}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante der H/D-Amidprotonenaustauschreaktion
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
k_{op}	Geschwindigkeitskonstante der Amidprotonenöffnungsreaktion
k_{NI}, k_{IN}	intrinsische Geschwindigkeitskonstanten der Umwandlungsreaktionen von I und N
k_{NU}, k_{UN}	intrinsische Geschwindigkeitskonstanten der Umwandlungsreaktionen von N und U
k_{UI}, k_{IU}	intrinsische Geschwindigkeitskonstanten der Umwandlungsreaktionen von U und I
$m_{\Delta G}$	Anstieg der ΔG^0 vs. [D]-Kurve
m_D, m_N	Anstieg des Signals der Basislinie im post- bzw. prätransitionalen Bereich von Übergangskurven
MALDI-TOF MEXICO	<i>matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds</i>
N	nativer Zustand
[N]	Konzentration an nativem Protein
N _{ONC}	native Onconase
NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
OD	optische Dichte
ONC	Onconase
PCR	Polymerasekettenreaktion
R	universelle Gaskonstante
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
S	Messsignal
S_U, S_N	Signal des entfalteten bzw. nativen Proteins
S_U^0, S_N^0	Signal des entfalteten bzw. nativen Proteins in Abwesenheit von Denaturans (extrapolierter Wert)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
t	Zeit
T	Temperatur

1. Abkürzungen

T_m	Temperatur am Transitionsmittelpunkt
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TROSY	<i>transverse relaxation optimized spectroscopy</i>
U	entfalteter Zustand
[U]	Konzentration an entfaltetem Protein
U _{ONC}	entfaltete Onconase
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
ΔC_p	Differenz der Wärmekapazität zwischen nativem und entfaltetem Zustand
ΔG^0	Änderung der freien Standardenthalpie
$\Delta G_{H_2O}^0$	Änderung der freien Enthalpie in Abwesenheit von Denaturans
$\Delta\Delta G_{H_2O}^0$	Differenz der freien Enthalpien zwischen Wildtypenzym und Enzymvariante
$\Delta G_f^\#, \Delta G_u^\#$	Differenz der freien Aktivierungsenthalpie der Rück- bzw. Entfaltungsreaktion
ΔH^0	Änderung der Standardenthalpie
ΔS^0	Änderung der Standardentropie
ε	Extinktionskoeffizient

Aus dem Englischen übernommene Begriffe, für die kein äquivalenter deutscher Begriff existiert, werden in *kursiver Schreibweise* dargestellt. Abkürzungen für Aminosäuren (Einbuchstabencode bzw. Dreibuchstabencode) werden gemäß der IUPAC-IUB-Nomenklatur verwendet.

2 Einleitung und Aufgabenstellung

Eine der fundamentalen und immer noch unbeantworteten Fragen in der Strukturbiologie ist, wie ungefaltete Polypeptidketten nach ihrer Synthese an Ribosomen in ihre aktive, tertiäre Struktur falten. Dieses sogenannte Faltungsproblem wurde bereits um 1960, nach der ersten atomaren Auflösung einer Proteinstruktur, formuliert (Dill *et al.*, 2008). Es beinhaltet die Fragen nach dem Faltungscode und dem Faltungsmechanismus. Dass die korrekte Faltung einer Polypeptidkette zu ihrer nativen und aktiven Form in ihrer Aminosäuresequenz verschlüsselt sein muss, formulierte Anfinsen bereits 1973 (Anfinsen, 1973). Dabei stellt der Unterschied zwischen der freien Enthalpie des nativen und entfalteten Zustands die Triebkraft der Proteinfaltung dar (Jaenicke, 1996).

Die native Struktur eines Proteins stellt unter nativen Bedingungen einen thermodynamisch stabilen Zustand dar. Da eine statistisch definierte Suche nach der korrekten nativen Struktur, ausgehend von der entfalteten Polypeptidkette, viel zu lange dauern würde um Lebensprozesse zu ermöglichen, muss das Erreichen dieses Zustands gerichtet ablaufen. Daher schlug Levinthal vor, dass die Bildung von teilgefalteten Zwischenzuständen, so genannten Intermediaten, den Konformationsraum einer faltenden Polypeptidkette einschränkt und somit die Faltung in einem physiologisch sinnvollen Zeitbereich erfolgen kann (Levinthal, 1968).

Bis heute ist nicht bekannt, ob eine ähnliche Tertiärstruktur gleichbedeutend mit einem vergleichbaren Faltungsmechanismus ist. Ein Ansatz zur Bestimmung des Einflusses der Tertiärstruktur auf den Faltungsmechanismus ist die Untersuchung von Proteinen mit großer Sequenzidentität bzw. -ähnlichkeit und verschiedenen Tertiärstrukturen oder mit niedriger Sequenzähnlichkeit und einer vergleichbaren Tertiärstruktur. Die Analyse des Faltungsverhaltens verschiedener Mitglieder einer Strukturfamilie bildet dabei ein geeignetes Konzept zur Untersuchung des Einflusses der Tertiärstruktur auf den Faltungsmechanismus.

Onconase® (ONC, Alfacell Corporation, Somerset, NJ, USA) ist das kleinste Mitglied der Ribonuclease A (RNase A) Superfamilie. Der Hauptvertreter dieser Strukturfamilie, die RNase A, ist eines der am intensivsten untersuchten Proteine, über dessen komplexen Faltungsmechanismus überdurchschnittlich viel bekannt ist (Neira und Rico, 1997). Trotz einer Sequenzidentität von nur 28% sind die Tertiärstrukturen von RNase A und ONC weitgehend übereinstimmend (Mosimann

2. Einleitung und Aufgabenstellung

et al., 1994). Im Vergleich zur RNase A zeichnet sich ONC jedoch durch eine extrem hohe thermodynamische Stabilität aus (Notomista *et al.*, 2000).

Ziel dieser Arbeit war es, das Faltungsverhalten von ONC zu untersuchen und mit den bereits vorhandenen Erkenntnissen zur Faltung des homologen Proteins RNase A zu vergleichen. Damit sollten Informationen zum Einfluss der Tertiärstruktur auf den Faltungsweg homologer RNasen erhalten werden. Die während der Faltung von ONC beobachteten Faltungsphasen sollten charakterisiert und strukturellen Faltungsereignissen zugeordnet werden. Hierfür sollte neben der Fluoreszenzspektroskopie die NMR-Spektroskopie in Kombination mit schnellen Mischtechniken genutzt werden. Weiterhin sollten Faltungs- und Dynamikstudien an einer Variante von ONC, die aufgrund der Eliminierung der C-terminalen Disulfidbrücke einen großen Stabilitätsverlust aufweist (Arnold *et al.*, 2006), durchgeführt und mit den Ergebnissen zu ONC verglichen werden. Die erzielten Ergebnisse sollten Ursachen für die hohe thermodynamische Stabilität von ONC aufzeigen.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Proteinstabilität

Der native, gefaltete Zustand eines Proteins (N) ist durch eine kompakte tertiäre Struktur definiert. Diese ist unter anderem durch einen kleinen Gyrationradius, im Inneren verborgene hydrophobe Aminosäurereste und/oder eine verminderte proteolytische Angreifbarkeit charakterisiert (Eftink und Ghiron, 1976; Rose *et al.*, 1985; Hubbard, 1998). Der native Zustand wird durch kovalente Bindungen (Disulfidbrücken) und nichtkovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, ionische und hydrophobe Interaktionen sowie van-der-Waals-Kräfte, stabilisiert. Neben der biologischen Aktivität zeigt der native Zustand auch verschiedene spektroskopische und proteinchemische Eigenschaften, durch die er identifiziert werden kann. So führen spezifische Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten zu definierten Sekundär- und Tertiärstrukturen, die ein charakteristisches Fluoreszenz- bzw. Circular dichroismus-(CD)-spektrum erzeugen.

Durch entfaltende Einflüsse, wie Temperatur, Druck oder Denaturanzien können die nichtkovalenten Wechselwirkungen gestört werden. Dies führt zum Verlust der tertiären Struktur und somit zur Entfaltung (Denaturierung) von Proteinen. Der entfaltete Zustand (U) stellt ein heterogenes Gemisch vieler Konformationen dar, die zueinander im Gleichgewicht stehen und sich enthalpisch und entropisch stark voneinander unterscheiden können.

Allgemein wird zwischen thermodynamischer und kinetischer Stabilität unterschieden. Die thermodynamische Stabilität beschreibt das Gleichgewicht zwischen N und U und ist durch die freie Standardenthalpie des Denaturierungsgleichgewichts (ΔG^0) gekennzeichnet. Charakteristische Parameter stellen dabei die Übergangstemperatur (T_m) bzw. die Denaturationskonzentration ($[D]$) am Übergangsmittelpunkt ($[D]_{50\%}$) dar. Bei dieser Temperatur bzw. Konzentration ist der Anteil an nativem Protein gleich dem des entfalteten Proteins. ΔG^0 beschreibt die Differenz der freien Standardenthalpien von N und U (Abb. 3-1) und wird experimentell anhand von thermisch- bzw. chemisch-induzierten Übergangskurven ermittelt.

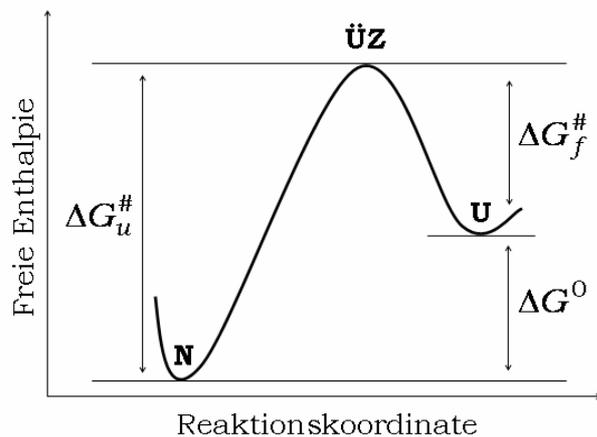


Abb. 3-1: Schematische Darstellung des Energieprofils eines Proteins unter nativen Bedingungen.

N - nativer Zustand, ÜZ - Übergangszustand, U - entfalteter Zustand, $\Delta G_u^\#$, $\Delta G_f^\#$ - freie Aktivierungsenthalpie der Entfaltung bzw. Rückfaltung, ΔG^0 - freie Standardenthalpie

Kinetische Untersuchungen beschreiben hingegen den zeitlichen Verlauf der Umwandlung von U in N bzw. N in U und dienen zur Aufklärung von Faltungs- und Entfaltungswegen. Das einfachste Faltungsmodell ist das Zweizustandsmodell, bei dem N und U direkt miteinander im Gleichgewicht stehen (Abb. 3-2).

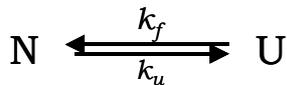


Abb. 3-2: Schematische Darstellung eines Zweizustandsmodells.

N - nativer Zustand, U - entfalteter Zustand, k_u , k_f - Geschwindigkeitskonstanten der Ent- bzw. Rückfaltungsreaktion

Mit Hilfe der Eyring-Gleichung lässt sich aus den Geschwindigkeitskonstanten der Ent- (k_u) bzw. Rückfaltungsreaktion (k_f) die freie Aktivierungsenthalpie der Ent- (Differenz zwischen N und dem Übergangszustand ($\Delta G_u^\#$)) bzw. der Rückfaltungsreaktion (Differenz zwischen dem Übergangszustand und U ($\Delta G_f^\#$)) (Abb. 3-1) bestimmen. Gleichung 3-1 gibt die Eyring-Gleichung für die Entfaltungsreaktion an.

$$\Delta G_u^\# = R \cdot T \cdot \left(\ln \left(\frac{k_B}{h} \right) - \ln \left(\frac{k_u}{T} \right) \right) \quad (3-1)$$

k_B	Boltzmann-Konstante
h	Plancksches Wirkungsquantum

Der Zusammenhang zwischen thermodynamischer und kinetischer Stabilität ist in Gleichung 3-2 für das Zweizustandsmodell dargestellt.

$$\Delta G^0 = \Delta G_u^\# - \Delta G_f^\# \quad (3-2)$$

Dabei setzt sich ΔG^0 nach der Gibbs-Gleichung (Gleichung 3-3) aus einem enthalpischen (ΔH^0) und einem entropischen (ΔS^0) Term zusammen.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad (3-3)$$

3.1.1 Bestimmung der Parameter der thermodynamischen Stabilität

Thermodynamische Parameter sind nur für vollständig reversibel faltende Proteine bestimmbar. Im Zweizustandsmodell (Abb. 3-2) ist ΔG^0 unmittelbar mit k_u und k_f verknüpft (Gleichung 3-4).

$$\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln \frac{k_u}{k_f} = -R \cdot T \cdot \ln K_D \quad (3-4)$$

Mit steigender [D] verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen N und U zugunsten von U. Unterscheiden sich U und N in ihren optischen (Absorption, CD, Fluoreszenz) oder hydrodynamischen (Sedimentationsgeschwindigkeit) Eigenschaften, kann die Verschiebung des Gleichgewichts zu veränderten Signalintensitäten führen. Aus diesen sind dann die Konzentrationen an N und U bestimmbar (Fersht, 1999). Nach Gleichung 3-5 ist die Änderung des Signals mit steigender [D] im prä- und posttransitionalen Bereich näherungsweise linear.

$$S_N = S_N^0 + m_N \cdot [D] \quad \text{bzw.} \quad S_U = S_U^0 + m_D \cdot [D] \quad (3-5)$$

S_N, S_U	Signal N bzw. U bei definierter [D]
S_N^0, S_U^0	Signal von N bzw. U in Abwesenheit von D (extrapolierter Wert)
m_N, m_U	Anstieg des Signals von N bzw. U in Abhängigkeit von [D]

Zur Bestimmung des relativen Anteils von N (f_N) muss der lineare Anstieg im prä- und posttransitionalen Bereich berücksichtigt werden. Mittels Gleichung 3-6 lässt sich aus den Signalintensitäten f_N bestimmen (Santoro und Bolen, 1988).

$$f_N = \frac{[N]}{[N] + [U]} = \frac{S - S_U}{S_N - S_U} \quad (3-6)$$

3. Theoretische Grundlagen

Aus f_N lässt sich nach Gleichung 3-7 die Gleichgewichtskonstante K_D ermitteln, welche zur Bestimmung von ΔG^0 bei jeder [D] nach Gleichung 3-4 dient.

$$K_D = \frac{[U]}{[N]} = \frac{k_u}{k_f} = \frac{1-f_N}{f_N} = \frac{S_N - S}{S - S_U} \quad (3-7)$$

Zur Bestimmung von ΔG^0 in Abwesenheit von D wurden verschiedene Extrapolationsmethoden entwickelt (Pace, 1986). Dabei ist die lineare Extrapolation nach Gleichung 3-8 die einfachste und am häufigsten genutzte Methode.

$$\Delta G^0 = \Delta G_{H_2O}^0 - m_{\Delta G} \cdot [D] \quad (3-8)$$

Hierbei entspricht $m_{\Delta G}$ dem Anstieg von ΔG^0 in Abhängigkeit von [D]. Da im Übergangsmittelpunkt [N] gleich [U] und $\Delta G^0 = 0$ ist, ergibt sich aus Gleichung 3-8 die Gleichung 3-9.

$$\Delta G_{H_2O}^0 = m_{\Delta G} \cdot [D]_{50\%} \quad (3-9)$$

Hier entspricht $[D]_{50\%}$ der [D] am Übergangsmittelpunkt. Durch Kombination der Gleichungen 3-6 bis 3-9 erhält man nun für die gemessene Signalintensität die in Gleichung 3-10 dargestellte Abhängigkeit.

$$S = \frac{S_N + S_U \cdot \exp[(m_{\Delta G} \cdot [D] - [D]_{50\%}) / R \cdot T]}{1 + \exp[m_{\Delta G} \cdot ([D] - [D]_{50\%}) / R \cdot T]} \quad (3-10)$$

Zur Bestimmung von $m_{\Delta G}$ und $[D]_{50\%}$ setzt man für S_N und S_U die lineare Abhängigkeit nach Gleichung 3-5 ein und erhält somit Gleichung 3-11 (Santoro und Bolen, 1988).

$$S = \frac{(S_N^0 + m_N \cdot [D]) + (S_U^0 + m_U \cdot [D]) \cdot \exp[(m_{\Delta G} \cdot [D] - [D]_{50\%}) / R \cdot T]}{1 + \exp[(m_{\Delta G} \cdot [D] - [D]_{50\%}) / R \cdot T]} \quad (3-11)$$

Aus den erhaltenen Parametern kann nun nach Gleichung 3-9 $\Delta G_{H_2O}^0$ bestimmt werden.

Auch durch die Auswertung thermisch-induzierter Übergangskurven lassen sich die thermodynamischen Parameter eines Proteins bestimmen. Hier besteht jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen ΔG^0 und der Temperatur.

$\Delta G^0(T)$ lässt sich bei bekannter spezifischer Wärmekapazität (ΔC_p) durch die Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gleichung 3-12) bestimmen (Pace *et al.*, 1990).

$$\Delta G^0(T) = \Delta H_m^0(T_m) \cdot \left(\frac{1-T}{T_m} \right) - \Delta C_p \cdot \left[T - T_m - T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \quad (3-12)$$

ΔC_p Differenz der Wärmekapazität zwischen nativem und entfaltetem Zustand

3.1.2 Bestimmung der Parameter der kinetischen Stabilität

Die Parameter der kinetischen Stabilität charakterisieren den zeitlichen Verlauf der Ent- und Rückfaltungsreaktionen eines Proteins bis zur Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts. Die kinetische Stabilität kann auch für irreversibel entfaltende Proteine bestimmt werden.

Im Zweizustandsmodell (Abb. 3-2) erfolgt die Umwandlung von N nach U (Entfaltungsreaktion) und U nach N (Rückfaltungsreaktion) jeweils nach einer Reaktion erster Ordnung (Gleichung 3-13).

$$S = A \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t) + B \quad (3-13)$$

S	Signal
A	Signalamplitude
B	<i>offset</i>
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
t	Zeit

Die so ermittelte beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) setzt sich aus den Teilgeschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltungsreaktion zusammen (Gleichung 3-14).

$$k_{obs} = k_u + k_f \quad (3-14)$$

Mit Hilfe der Eyring-Gleichung (Gleichung 3-1) kann nun aus k_u bzw. k_f ΔG_u^\ddagger bzw. ΔG_f^\ddagger bestimmt werden.

3. Theoretische Grundlagen

Bei einem Zweizustandsmodell ergibt die Auftragung des Logarithmus von k_u bzw. k_f als Funktion der $[D]$ eine lineare Abhängigkeit. Die halblogarithmische Auftragung von k_{obs} als Funktion von $[D]$ bei gegebener Temperatur und pH-Wert bezeichnet man als Chevron-Plot (Abb. 3-3).

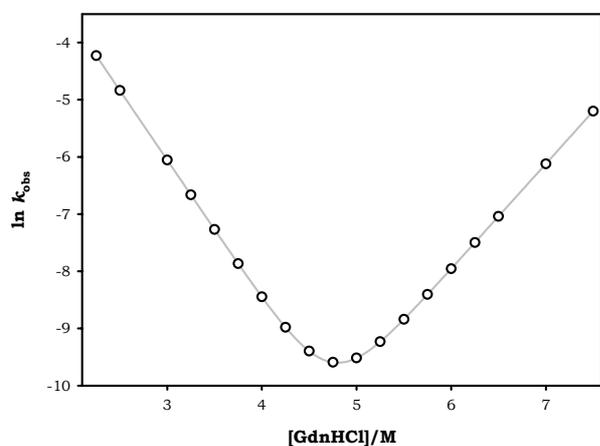


Abb. 3-3: Schematische Darstellung eines Chevron-Plots.

Mit Hilfe von Gleichung 3-15 kann bei einem Zweizustandsmodell der vollständige Verlauf von $\ln k_{obs}$ als Funktion von $[D]$ im Chevron-Plot dargestellt werden (Maxwell *et al.*, 2005).

$$\ln k_{obs} = \ln[\exp(A + m_f \cdot [D])/R \cdot T) + \exp(B + m_u \cdot [D])/R \cdot T] \quad (3-15)$$

Hierbei entsprechen m_f und m_u den Anstiegen des Rück- bzw. Entfaltungssastes, und $A = \ln k_f^0$ und $B = \ln k_u^0$, wobei k_f^0 und k_u^0 die extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten der Rück- bzw. Entfaltungsreaktion in Abwesenheit von Denaturans darstellen. Bei Proteinen, die nach dem Zweizustandsmodell falten, ist die Summe des Betrags von m_f und m_u gleich dem Anstieg chemisch-induzierter Übergangskurven ($m_{\Delta G}$, Gleichung 3-11) (Doyle *et al.*, 1996).

3.2 Intermediate in der Proteinfaltung

Während der Faltung von Proteinen können partiell gefaltete Intermediate durchlaufen werden, die die Faltung der Polypeptidkette gezielt zur nativen Konformation lenken. Dies kann zu einer Beschleunigung der Gesamtfaltungsreaktion führen (Wagner und Kiefhaber, 1999). Allerdings können Intermediate die Faltungsreaktion auch verlangsamen oder gar kinetische Fallen darstellen (Baldwin, 1996). Daher wird allgemein zwischen *on-pathway*- und *off-pathway*-

Intermediaten unterschieden (Abb. 3-4). Während *on-pathway*-Intermediate zum nativen Zustand leiten, sind *off-pathway*-Intermediate teilweise fehlgefaltet und führen nicht bzw. erst nach Reorganisation zum nativen Zustand.

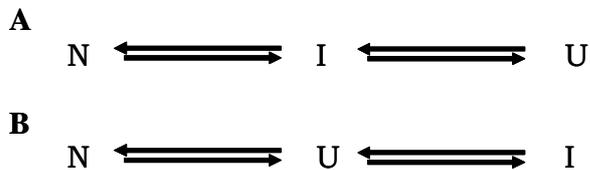


Abb. 3-4: Darstellung von *on-pathway*- (A) und *off-pathway*- (B) Intermediaten.

N - nativer Zustand, U - entfalteter Zustand, I - Intermediat

Intermediate, die strukturell, spektroskopisch und oft auch hinsichtlich der Aktivität dem nativen Protein ähneln, werden als *native-like intermediates* (I_N) bezeichnet. Solch ein Intermediat kann z. B. der *molten-globule*-Zustand sein. Er ist ein stabiles Zwischenprodukt, das bereits eine dem nativen Zustand ähnliche Sekundärstruktur besitzt. Jedoch fehlen ihm die meisten spezifischen Tertiärkontakte.

3.2.1 Intermediatanalyse

Sind Faltungsintermediate stabil und entfalten kooperativ, sind diese bereits im Gleichgewicht erkennbar und leicht charakterisierbar. Viele Intermediate sind jedoch zu kurzlebig, um im Gleichgewicht ausreichend populiert zu werden. Das Auftreten solcher Intermediate wird oftmals erst über mehrphasige Faltungskinetiken bzw. nicht-lineare Faltungsäste im Chevron-Plot (Abb. 3-3) erkannt. In diesen Fällen ist eine Intermediatanalyse auf indirektem Weg nötig.

Oft können Intermediate leichter während der Rückfaltungsreaktion als während der Entfaltungsreaktion detektiert werden, da bei der Umgestaltung lokal gebildeter Strukturen hohe Energiebarrieren überwunden werden müssen. Somit ist die Bildungsgeschwindigkeit des Intermediats größer als die Geschwindigkeit des Zerfalls, was in einer Akkumulation und somit in der Detektierbarkeit des Intermediats resultiert. Aufgrund der meist großen strukturellen Ähnlichkeit des Übergangszustands zu N und der Destabilisierung von eventuell auftretenden Intermediaten unter entfaltenden Bedingungen, werden bei der Entfaltungsreaktion oftmals keine Intermediate detektiert. Dennoch werden diese auf Grund der mikroskopischen Reversibilität auch während der Entfaltungsreaktion durchlaufen. Die Detektierbarkeit von Intermediaten hängt zunächst von zwei Faktoren ab. Erstens muss das Intermediat ausreichend populierbar sein. Somit muss die Bildung des Intermediats schneller verlaufen als seine Weiterreaktion. Abb. 3-5

3. Theoretische Grundlagen

demonstriert zwei unterschiedliche Beispiele. Beide dargestellten Proteine durchlaufen während der Rückfaltungsreaktion zwei Intermediate. Jedoch ist im Fall von Protein A nur I_1 ausreichend stabil um detektiert werden zu können. Bei der Faltung von Protein B wird hingegen nur I_2 ausreichend für eine Detektion akkumuliert.

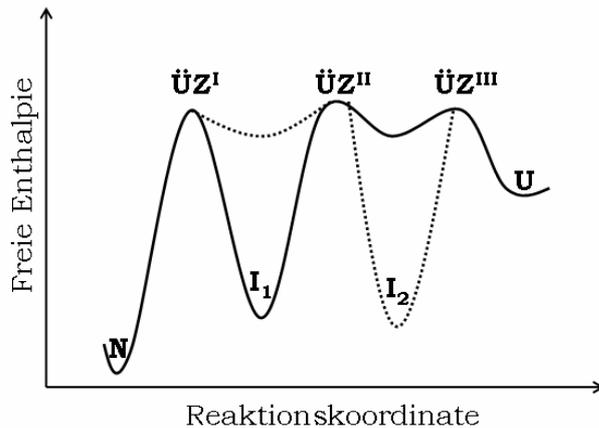


Abb. 3-5: Schematische Darstellung des Energieprofils von zwei Proteinen unter entfaltenden Bedingungen.

N - nativer Zustand, $\ddot{U}Z^{I/II/III}$ - Übergangszustände, U - entfalteter Zustand, $I_{1/2}$ - Intermediate, durchgezogene Linie - Protein A, gestrichelte Linie - Protein B

Zweitens, muss durch das Auftreten eines Intermediats eine Änderung des Messsignals hervorgerufen werden, um es von N und U unterscheiden zu können. So muss das Intermediat beispielsweise andere strukturelle oder spektroskopische Eigenschaften bzw. eine andere biologische Aktivität als N und U aufweisen.

Weist ein Intermediat individuelle spektroskopische oder strukturelle Eigenschaften auf und ist ausreichend populär, können erste Erkenntnisse zum Auftreten und zu seiner Stabilität erhalten werden.

Über so genannte Doppelsprungexperimente kann die Faltung eines Intermediats weitgehend unabhängig von anderen Faltungsreaktionen untersucht werden. Bei dem so genannten N-Test (Schmid, 1983) wird zunächst die Rückfaltung des komplett entfalteten Proteins initiiert. Nach definierten Rückfaltungszeiten wird die Rückfaltungsreaktion unterbrochen, indem das Protein wiederum in entfaltende Bedingungen überführt wird. Die Entfaltungsreaktion wird aufgezeichnet. Die Amplitude der Entfaltungsreaktion gibt Auskunft über den Anteil an Protein, der während der definierten Rückfaltungszeit tatsächlich den zu beschreibenden Zustand (Intermediat oder nativer Zustand) erreicht hat. Somit erhält man Informationen über die Entstehung und den Zerfall von verschiedenen Faltungszuständen. Weiterhin kann über diese Experimente festgestellt werden, ob die Intermediate *on-pathway*- oder *off-pathway*-Intermediate sind. Wird N mit einer *lag*-Phase gebildet, so wird vor der Entstehung von N zunächst ein Intermediat

durchlaufen. Das Intermediat ist demzufolge ein *on-pathway*-Intermediat (Abb. 3-4A). Nimmt die Amplitude von N jedoch von Beginn mit steigender *delay*-Zeit zu, wird N direkt gebildet. Daher ist ein vorkommendes Intermediat in diesem Fall ein *off-pathway*-Intermediat (Abb. 3-4B).

Um Intermediate detektieren zu können muss der geschwindigkeitsbestimmende Schritt jedoch nicht immer die letzte Reaktion im Faltungsmechanismus darstellen. Führt man die oben beschriebenen Doppelsprungexperimente bei konstanter Rückfaltungszeit und variierenden [D] durch, können auch Faltungsreaktionen sichtbar gemacht werden, welche im Einzelsprung aufgrund von zuvor auftretenden geschwindigkeitsbestimmenden Schritten nicht detektierbar sind.

Intermediate, die sich in ihrer Hydrophobizität von N und U unterscheiden, können mit dem hydrophoben Farbstoff 1-Anilino-8-naphthalensulfonat (ANS) nachgewiesen werden. Durch die Bindung von ANS an hydrophobe Bereiche verschiebt sich das Wellenlängenmaximum des Fluoreszenzspektrums von ANS von 515 auf 479 nm. Weiterhin nimmt die Fluoreszenzintensität stark zu (Stryer, 1965).

Mit Hilfe von Wasserstoff/Deuterium (H/D) Austauschexperimenten in Kombination mit Kernmagnetischer Resonanz (NMR) Spektroskopie oder Massenspektrometrie können im Intermediat bereits gefaltete Bereiche von ungefalteten unterschieden werden. Auch Echtzeit-NMR Experimente können bei ausreichender Populierbarkeit und bekannter Zuordnung, Auskunft zur Struktur von Intermediaten geben.

Weiterhin können durch die Messung der enzymatischen Aktivität während der Faltungsreaktion Aussagen zur katalytischen Aktivität von Intermediaten gemacht werden.

3.2.2 Analyse der Faltung

Proteine, welche detektierbare Intermediate aufweisen, werden durch das Zweizustandsmodell nicht adäquat beschrieben. In solchen Fällen kann das in Abb. 3-2 dargestellte Schema um die Intermediate erweitert werden (Ikai und Tanford, 1973). Die Umwandlung vom nativen zum entfalteten Zustand wird dann durch eine Reaktion n -ter Ordnung beschrieben. Allgemein gilt, dass ein kinetischer Mechanismus mit n verschiedenen Zuständen zu $n-1$ Gleichgewichtsreaktionen führt (Bachmann und Kiefhaber, 2005). Somit impliziert eine doppelt exponentielle Faltungsreaktion das Vorhandensein eines Intermediate. In Abb. 3-6 sind alle möglichen Faltungsmechanismen dargestellt, die ein Intermediat enthalten.

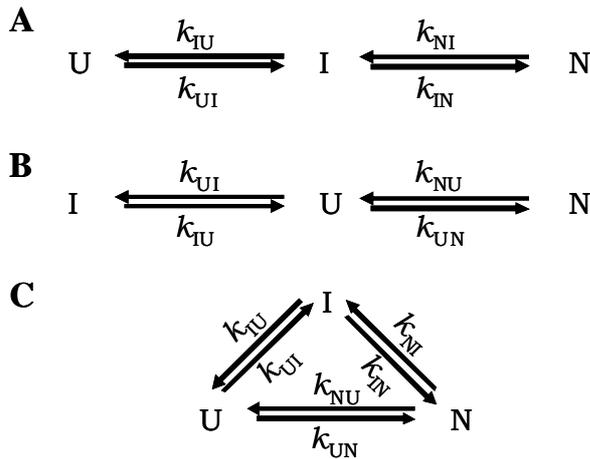


Abb. 3-6: Darstellung von Faltungsmechanismen mit einem Intermediat.

A: sequenzielles Dreizustandsmodell mit *on-pathway*-Intermediat, B: sequenzielles Dreizustandsmodell mit *off-pathway*-Intermediat, C: trianguläres Dreizustandsmodell
 N - nativer Zustand, U - entfalteter Zustand, I – Intermediat, k_{NI} , k_{IN} , k_{NU} , k_{UN} , k_{UI} , k_{IU} – intrinsische Geschwindigkeitskonstanten der Umwandlungsreaktionen von I und N, N und U sowie I und U.

Generell wird der einfachste Faltungsmechanismus gesucht, der die experimentellen Daten ausreichend beschreibt. Alternative Faltungsmechanismen sollten dabei eindeutig ausgeschlossen werden. Zwischen möglichen Faltungsmechanismen kann durch eine globale Anpassung verschiedener kinetischer Daten (aus Einfach- und Doppelsprungexperimenten) mit der spezifischen analytischen Lösung des Differentialgleichungssystems der möglichen Faltungsmechanismen unterschieden werden. Für Faltungsmechanismen monomerer Proteine, bei denen alle Faltungsreaktionen Reaktionen 1. Ordnung sind, sind die analytischen Lösungen der Differentialgleichungen für Faltungsmodelle mit 3 oder weniger auftretenden Spezies in der Literatur beschrieben (Ikai und Tanford, 1973; Bachmann und Kiefhaber, 2005).

3.3 Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung

Peptidbindungen weisen einen partiellen Doppelbindungscharakter auf. Der Abstand zwischen dem Carbonylkohlenstoffatom und dem Stickstoffatom ist um 0,15 Å kürzer als für eine C-N Bindung erwartet. Aus diesem Grund sind Peptidbindungen planar und die der Peptidbindung benachbarten Kohlenstoffatome können sowohl in *cis*-, als auch in *trans*- Konformation vorliegen. Aus sterischen Gründen liegen dennoch sowohl in nativen als auch in entfaltenen Proteinen mehr als 99% der Peptidbindungen in *trans*-Konformation vor (Brandts *et al.*, 1975).

Die Peptidbindungen zwischen einem Prolinrest und dem N-terminal benachbarten Aminosäurerest (Peptidyl-prolyl-Bindung) bildet jedoch eine Ausnahme. Im nativen

3. Theoretische Grundlagen

Protein liegen ungefähr 7% der Peptidyl-prolyl-Bindungen in *cis*-Konformation vor (Stewart *et al.*, 1990). Dabei wird die Konformation einer Peptidyl-prolyl-Bindung durch die umgebenden Aminosäurereste bestimmt (Reimer *et al.*, 1998). Im entfalteten Protein befinden sich zwischen 10 und 30% der Peptidyl-prolyl-Bindungen in *cis*-Konformation (Cheng und Bovey, 1977; Grathwohl und Wüthrich, 1981). Während der Rückfaltung von Proteinen müssen demnach verschiedene Peptidyl-prolyl-Bindungen zunächst isomerisieren (Abb. 3-7), um in die native Konformation zu gelangen. Diese als Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung bezeichneten Reaktionen laufen mit Geschwindigkeitskonstanten zwischen $0,1 \text{ s}^{-1}$ und $0,01 \text{ s}^{-1}$ langsam ab, da auf Grund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung die freie Aktivierungsenthalpie der Isomerisierungsreaktion hoch ist ($\Delta G^0_{cis/trans} = 75\text{--}90 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Bhat *et al.*, 2003).

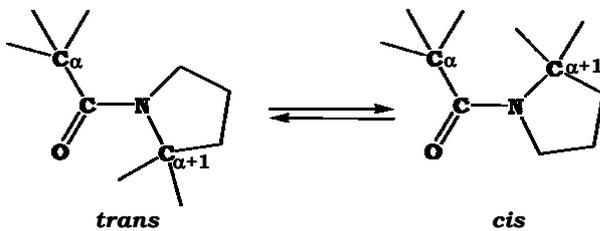


Abb. 3-7: Schematische Darstellung der *cis/trans* Isomerisierungsreaktion einer Peptidyl-prolyl-Bindung.

Im entfalteten Zustand befinden sich entsprechend der *cis/trans* Verteilung auch Proteinmoleküle, in denen alle Peptidyl-prolyl-Bindungen bereits in der nativen Konformation vorliegen (U_F -Zustand). Da bei diesen Molekülen keine Bindung isomerisieren muss, falten sie schneller zu N zurück als Moleküle mit zum Teil nicht-nativen Peptidyl-prolyl-Bindungen (U_S -Zustand).

Die Isomerisierungsreaktion von nicht-nativen Peptidyl-prolyl-Bindungen muss nicht immer den ersten Schritt einer Rückfaltungsreaktion darstellen. So können Proteine auch zunächst zu einem Intermediat falten, welches nach der Isomerisierung einer oder mehrerer Peptidyl-prolyl-Bindungen in den nativen Zustand weiterfaltet.

Im Jahr 1984 wurde die Existenz von Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) nachgewiesen (Fischer *et al.*, 1984). Diese Enzyme beschleunigen die Isomerisierungsreaktionen von Peptidyl-prolyl-Bindungen, ohne das Gleichgewicht zwischen N und U zu beeinflussen (Schmid *et al.*, 1993). Dabei ist die Anzahl der katalytischen Zyklen von PPIasen nicht limitiert, da die Enzyme keine Regenerationsreaktion durchlaufen müssen. Bisher wurden drei Unterfamilien dieser Enzymklasse identifiziert: die FKBP (FK506 *binding protein*), Cyclophiline und Parvuline (Galat, 1993; Fanghanel und Fischer, 2004).

Falls eine langsame Faltungsreaktion in Gegenwart von PPIasen nicht beschleunigt wird, kann eine Isomerisierungsreaktion nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Die entsprechende Peptidyl-prolyl-Bindung könnte für PPIasen nicht ausreichend zugänglich sein (Lang *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1988).

3.4 Einfluss von Disulfidbrücken auf die Proteinstabilität und -faltung

Disulfidbrücken werden durch zwei Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen gebildet. Zunächst reagiert ein Redoxmittel mit einer Cysteinthiolgruppe des Proteins. Das entstehende gemischte Disulfid reagiert dann intramolekular mit einer zweiten proteinogenen Cysteinthiolgruppe unter Ausbildung eines Disulfids (Abb. 3-8).

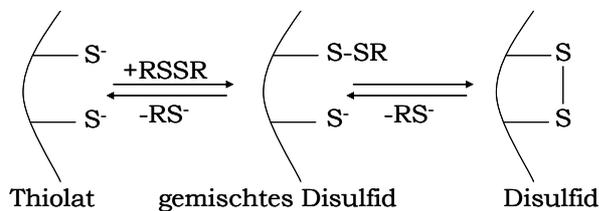


Abb. 3-8: Schematische Darstellung der Bildung eines Disulfids.

Neben dem Einfluss der Reaktivität der Thiolgruppen und des Disulfiddonators spielt auch deren räumliche Nähe und Zugänglichkeit bei der Bildung der Disulfide eine große Rolle. Die Ausbildung von Disulfidbrücken ist eine langsame Reaktion, die durch Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs) katalysiert werden kann (Freedman *et al.*, 1981). PDIs beschleunigen sowohl die Bildung als auch die Reorganisation von Disulfidbrücken. Dabei katalysiert die oxidierte Form der PDI die Bildung, während die reduzierte Form falsch verknüpfte Disulfidbrücken wieder auflösen kann. Die Anzahl von katalytischen Zyklen von PDIs ist von der Verfügbarkeit von Oxidationsäquivalenten zur Regenerierung abhängig (Bulaj, 2005).

Allgemein existieren zwei Modelle, die den Einfluss von Disulfidbrücken auf die Proteinstabilität beschreiben. Nach Flory (1956) führen entropische Effekte zur Stabilisierung durch Disulfidbrücken. Disulfidbrücken vermindern die zugänglichen Konformationen im entfalteten Zustand, wodurch die Entropie im entfalteten Zustand verringert wird. Eine Verringerung der Entropie ist nach der Gibbs-Gleichung (Gleichung 3-3) mit einer Erhöhung der freien Enthalpie des entfalteten Zustands verbunden. Somit wird das Gleichgewicht zwischen N und U zugunsten von N verschoben (Bulaj, 2005). Diese als Entropiemodell bezeichnete Theorie bezieht nur reversibel faltende Systeme in die Betrachtung ein (Flory, 1956). Der Einfluss

einer Disulfidbrücke auf die Entropie kann nach folgender Gleichung berechnet werden (Pace *et al.*, 1988):

$$\Delta S = -2,1 - \left(\frac{2}{3}\right) \cdot R \cdot \ln n \quad (3-16)$$

Dabei entspricht n der Anzahl von Aminosäureresten zwischen den beiden die Disulfidbrücke bildenden Cysteinresten und R der universellen Gaskonstanten.

Das Enthalpiemodell beschreibt hingegen die Enthalpie als treibende Kraft der Stabilisierung durch Disulfidbrücken (Doig *et al.*, 1990; Doig und Williams, 1991). Durch Disulfidbrücken werden in U sterische Hinderungen verursacht. Daher können weniger Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäureresten ausgebildet werden. Durch die auftretenden freien Wasserstoffbrückendonoren bzw. -akzeptoren wird U destabilisiert. Folglich verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen N und U zugunsten N.

Das komplizierte Wechselspiel aus entropischen und enthalpischen Effekten erschwert die Vorhersage des Einflusses von Disulfidbrücken auf die Protein-stabilität und lässt keine generelle Aussage zu. Disulfidbrücken können somit sowohl zur Proteinstabilisierung als auch zur Destabilisierung beitragen (Betz und Pielak, 1992). Systematische Studien ergaben, dass die Position der Disulfidbrücke ausschlaggebend für den Effekt der Stabilisierung ist. Beispielsweise stabilisieren Disulfidbrücken, die zur Fixierung flexibler Regionen beitragen (Mason *et al.*, 2002). Zum Einfluss von Disulfidbrücken auf die Proteinfaltung ist wenig bekannt. Für verschiedene Proteine konnte gezeigt werden, dass diese unter reduzierenden Bedingungen auch ohne Einfluss von Denaturanzien vollständig entfalten. Es wird davon ausgegangen, dass Disulfidbrücken den nativen Zustand fixieren und somit die Entfaltungsreaktion behindert (Mansfeld *et al.*, 1997; Mason *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2007). Andere Theorien beschreiben, dass durch die Disulfidbrücken der entfaltete Zustand destabilisiert wird und daher die Rückfaltungsreaktion beschleunigt wird (Mucke und Schmid, 1994). Somit gibt es auch im Hinblick auf die Proteinfaltung keine eindeutige Aussage hinsichtlich des Einflusses von Disulfidbrücken. Der Vergleich von Proteinen mit ihren Disulfidvarianten zeigt, dass durch Deletion einer Disulfidbrücke der gesamte Faltungsmechanismus eines Proteins verändert werden kann (Mucke und Schmid, 1994).

3.5 Ausgewählte Techniken zur Untersuchung von Faltungsreaktionen

3.5.1 Schnelle Mischtechniken

Faltungsreaktionen können sehr schnell ablaufen. Die sie induzierenden Veränderungen des Systems (Temperatur, pH-Wert, Denaturanzien) müssen daher sehr schnell erfolgen. Dies ist mit schnellen Mischtechniken wie z. B. der *stopped-flow* oder der *quenched-flow*-Technik möglich. Dabei werden mit Hilfe von Druck verschiedene Lösungen schnell und effizient miteinander vermischt. Es können auch zwei oder mehr Mischschritte in Folge durchgeführt werden. Dabei wird ein unterbrochener Fluss angelegt, bei dem das Reaktionsgemisch nach einem Mischschritt in einer Probenschleife zwischengelagert wird, bis es zum nächsten Mischschritt geleitet wird. Das Volumen der Probenschleife bestimmt dabei die *delay*-Zeit zwischen den einzelnen Mischschritten.

3.5.1.1 *Stopped-flow*-Technik

Eine häufig angewendete Mischmethode ist die *stopped-flow*-Technik, mit deren Hilfe Reaktionen vom Millisekunden- bis Minutenbereich beobachtet werden können (Eftink und Shastry, 1997). Die Aufzeichnung der Daten erfolgt kontinuierlich (in Echtzeit) in Kombination mit optischen Detektionsmethoden wie der Fluoreszenz-, Absorptions- oder CD-Spektroskopie. Je nach Zielsetzung können ein (Einfachsprung) oder mehrere (Doppel- bzw. Tripelsprung) Mischschritte durchgeführt werden.

In Abhängigkeit vom verwendeten Protein und der Detektionsmethode werden unterschiedliche Mengen an Protein benötigt. Um die Menge an einzusetzendem Protein zu reduzieren, wird bevorzugt mit einem Ausschlussfilter gearbeitet, der es ermöglicht das Signal über einen Wellenlängenbereich aufzuzeichnen.

3.5.1.2 *Quenched-flow*-Technik

Bei der *quenched-flow*-Technik können ebenfalls zwei oder drei Mischschritte aufeinanderfolgend durchgeführt werden. Jedoch erfolgt die Aufzeichnung der Daten nicht kontinuierlich. Die Visualisierung erfolgt nachträglich mit analytischen Detektionsmethoden wie NMR-Spektroskopie, Elektronenspinresonanz oder Massenspektrometrie. Die *quenched-flow*-Technik wird häufig in Kombination mit H/D-Austauschexperimenten angewendet. Dabei wird die unterschiedliche Lösungsmittelzugänglichkeit von Protonen in labilen bzw. stabilen Strukturregionen genutzt. Die Kombination von *quenched-flow*-Technik mit H/D-Austauschexperi-

3. Theoretische Grundlagen

menten und NMR-Spektroskopie erlaubt eine zeitgenaue Analyse der Proteinfaltung im Millisekundenbereich und ermöglicht eine zusätzliche Auflösung der Reaktion auf Aminosäureebene (Roder und Wuthrich, 1986). Mit Hilfe dieser Technik kann die Strukturbildung von transienten Faltungsintermediaten auf Grund unterschiedlicher H/D-Austauschverhalten der Amidprotonen während der Rückfaltungsreaktion verfolgt werden (Udgaonkar und Baldwin, 1988; Radford *et al.*, 1992). Für die Durchführung solcher Experimente kann protoniertes Protein vorgelegt und die Austauschreaktion der Amidprotonen gegen Deuterium untersucht werden, oder deuteriertes Protein verwendet werden, dessen Amiddeuteronen während des Experiments gegen Wasserstoff ausgetauscht werden.

Durch die verschiedenen Mischschritte und somit auch Verdünnungsschritte muss von hoch konzentrierten Proteinlösungen ausgegangen werden. Erfolgt die Visualisierung des Austauschs mittels NMR-Spektroskopie, wird bevorzugt ^{15}N - und/oder ^{13}C -markiertes Protein verwendet.

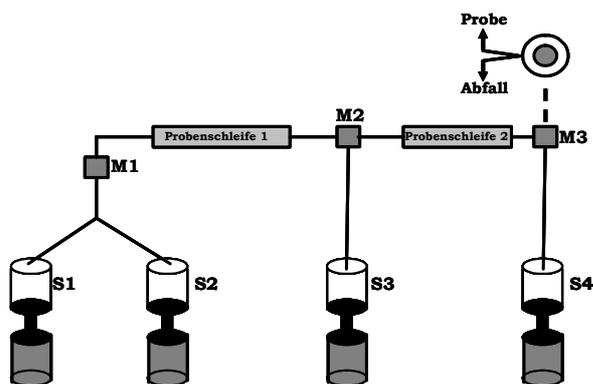


Abb. 3-9: Schematische Darstellung des Aufbaus einer quenched-flow-Apparatur.
S1 - S4 - Spritzen, M1 - M3 - Mixer.

Abb. 3-9 zeigt den schematischen Aufbau einer *quenched-flow*-Apparatur. Im Experiment wird im ersten Mischschritt (M1) die Rückfaltungsreaktion des entfalteten protonierten (bzw. deuterierten) Proteins initiiert. Nach einer bestimmten *delay*-Zeit wird in einem zweiten Mischschritt (M2) deuterierte (bzw. protonierte) Lösung eingeleitet. Alle Amidprotonen, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht in festen Wasserstoffbrücken involviert sind, tauschen gegen Deuterium (bzw. Wasserstoff) aus. Amidprotonen die in bereits gefalteten Regionen Wasserstoffbrücken ausbilden sind vor dem Austausch geschützt. Im dritten Mischschritt (M3) wird die H/D-Austauschreaktion durch Absenken des pH-Wertes oder Verminderung der Temperatur unterbrochen (*quench*). Nachfolgend faltet das Protein komplett zu N zurück. Durch Bestimmung des Gehalts an gebundenem Deuterium bzw. Wasserstoff an individuelle Aminosäurereste sind Informationen über die zu einem bestimmten Zeitpunkt bereits gefalteten bzw. ungefalteten Bereiche im Protein erhältlich.

3.5.2 NMR-Spektroskopie

3.5.2.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Die Kernmagnetische Resonanz beruht auf der Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment eines Atomkerns und einem externen magnetischen Feld. Nur Atomkerne die einen Eigendrehimpuls (Spin) ungleich Null aufweisen (z.B. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P), haben ein magnetisches Moment. Somit interagieren diese Kerne mit zwei oszillierenden Magnetfeldern; dem eigenen und dem externen, statischen Magnetfeld. Bei einem bestimmten Wert des externen Magnetfelds treten die Kerne in Resonanz und wechseln die Ausrichtung ihres Spins. Dies wird in der NMR-Spektroskopie in Form der Resonanzabsorption gemessen. Die Resonanzabsorption ist vom jeweiligen Atomkern und seiner chemischen Umgebung abhängig. Somit können mit Hilfe von NMR-Spektroskopie Informationen über die Struktur von Substanzen erhalten werden. Nach der ersten erfolgreichen Anwendung zur Strukturaufklärung von Proteinen durch Kurt Wüthrich und Mitarbeiter (Williamson *et al.*, 1985), hat sich diese Methode neben der Röntgenkristallographie als Technik zur Strukturaufklärung durchgesetzt. Zur Strukturaufklärung von Proteinen bedient man sich mehrdimensionaler NMR-Messungen, bei denen die Kreuzsignale von mehreren NMR-Spektren analysiert werden. Im zweidimensionalen HSQC-Spektrum (*heteronuclear single quantum coherence*) wird beispielsweise die skalare Kopplung zwischen ^1H - und ^{15}N -Kernen genutzt. In HSQC-Spektren erscheinen somit nur Signale von direkt aneinander gebundenen ^1H - und ^{15}N -Kernen, sodass diese Spektren meist übersichtlich sind.

Neben der Strukturaufklärung wird die NMR-Spektroskopie auch zur Untersuchung der Strukturodynamik genutzt. Da Proteine Bewegungen auf verschiedenen Zeitskalen zeigen, wurden verschiedene NMR-Messmethoden entwickelt, um die Dynamik in allen Zeitbereichen untersuchen zu können. Durch klassische Relaxationsmethoden, wie die Bestimmung von longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten (R_1 , R_2), sowie durch heteronukleare NOE-Effekte (*hNOE*, *heteronuclear Overhauser effect*) können Bewegungen im Pico- bis Nanosekundenbereich untersucht werden. Langsamere Dynamiken werden durch Linienformanalysen zugänglich gemacht. Dabei beeinflussen wechselnde chemische Umgebungen die transversale Relaxationsgeschwindigkeit, was sich auf die Intensität und Linienform des NMR-Signals auswirkt. Dieses Verfahren erfasst Prozesse im Milli- bis Mikrosekundenbereich. Durch Messung von residualen dipolaren Kopplungen (Meiler *et al.*, 2001) ist es möglich die Lücke zwischen Nanosekundenbereich und Millisekundenbereich zu schließen.

Eine Grenze für die Anwendung der NMR-Spektroskopie stellt die Größe des zu untersuchenden Proteins dar. Je höher das Molekulargewicht ist, desto mehr und breitere Resonanzsignale treten auf. Derzeit können aus bis zu 300 Aminosäureresten bestehende Proteine mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden.

3.5.2.2 Echtzeit-NMR-Spektroskopie

Auch zum Verständnis der Proteinfaltung liefert die NMR-Spektroskopie wertvolle Beiträge. Besonders bei der Beobachtung langsamer Proteinfaltungsreaktionen, wie zum Beispiel der Isomerisierung von Peptidyl-prolyl-Bindungen (3.3), erfährt die Echtzeit-NMR-Spektroskopie Anwendung (Dobson, 1991; Balbach *et al.*, 1995). Dabei wird nach Initiierung einer Reaktion mittels manueller Mischung eine Serie von meist eindimensionalen NMR-Spektren aufgezeichnet. Nach Auftragung der Integrale spezifischer NMR-Signale als Funktion der Zeit ist es möglich, Faltungskinetiken darzustellen. Die Totzeit der Experimente lässt sich durch Mischung innerhalb des NMR-Spektrometers deutlich verkürzen.

In einigen Fällen wurden Echtzeit-Reaktionen mit der Aufnahme von zweidimensionalen (Liu *et al.*, 1996; Steegborn *et al.*, 2000) oder sogar dreidimensionalen (Mizuguchi *et al.*, 2003) NMR-Spektren verfolgt. Die Aufzeichnung einer Serie von mehrdimensionalen NMR-Spektren ist auf Grund der langen Aufnahmezeit für diese Art von Spektren jedoch nur für sehr langsame Faltungsreaktionen sinnvoll. Durch verbesserte Pulssequenzen, wie beispielsweise der SOFAST (*band-selective optimized flip-angle short transient*) Pulssequenz, sind jedoch mittlerweile auch Aufnahmen von schnellen Reaktionen möglich (Schanda *et al.*, 2007).

3.5.2.3 NMR-detektierter Amidprotonenaustausch

Die ersten wichtigen Experimente zur Untersuchung der Proteinfaltung mittels NMR-Spektroskopie stellten H/D-Austauschexperimente dar (Wagner und Wüthrich, 1982; Wand *et al.*, 1986). Amidprotonen eines Proteins sind unterschiedlich gegen Protonenaustausch geschützt. So tauschen Protonen, die nicht in Wasserstoffbrücken involviert sind (labile Regionen) schnell aus, Wasserstoffbrücken bildende Protonen (stabile Regionen) tauschen jedoch langsam aus. Auf diese Weise lassen sich Aussagen zur strukturellen Dynamik innerhalb eines Proteins machen.

Amidprotonenaustausche können mittels NMR-Spektrometrie indirekt, beispielsweise durch die Kombination mit *quenched-flow*-Messungen (3.5.1.2), detektiert

3. Theoretische Grundlagen

werden. Jedoch sind auch direkte Messungen möglich. Dabei wird lyophilisiertes, protoniertes (bzw. deuteriertes) Protein in deuteriertem (bzw. protoniertem) Puffer gelöst und die H/D-Austauschreaktion über mehrere NMR-Spektren verfolgt. Nach Integration der abnehmenden (bzw. zunehmenden) Signalintensitäten und Auftragung dieser als Funktion der Zeit wird messbar, wie schnell einzelne Amidprotonen mit der Umgebung austauschen. Somit werden Informationen zur Dynamik bzw. Flexibilität des jeweiligen Aminosäurerestes im Protein erhalten.

Um schnelle Austauschreaktionen beobachten zu können, kann eine modifizierte MEXICO-Pulssequenz (*measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds*), die so genannte New MEXICO-Pulssequenz (Koide *et al.*, 1995) angewendet werden. Dabei wird zur Detektion des Amidprotonenaustauschs auf Deuteriumoxid verzichtet. Durch eine Sequenz aus rf-Pulsen (Radiofrequenz) und Gradienten wird zunächst die Magnetisierung aller Protonen zerstört (Dephasierung). Wasserprotonen besitzen aufgrund des *radiation damping*-Effekts eine verkürzte longitudinale Relaxationszeit, sodass sie ihre Magnetisierung innerhalb kürzester Zeit zurück erlangen. Zusätzlich wird die Magnetisierung aller Amidprotonen durch einen heteronuklearen ^{15}N -Filter entfernt. Danach sind keine Amidprotonensignale mehr im HSQC-NMR-Spektrum vorhanden. Der Austausch der Amidprotonen mit Wasserprotonen (Abb. 3-10) führt dann mit zunehmender Austauschzeit zu einem Anstieg der Signale im NMR-Spektrum. Da Amidprotonen in flexiblen Regionen schneller gegen Wasserprotonen austauschen als Amidprotonen in stabilen Regionen, können aus der Zunahme des NMR-Signals als Funktion der Austauschzeit Informationen zur Flexibilität einzelner Aminosäurereste im Protein erhalten werden.

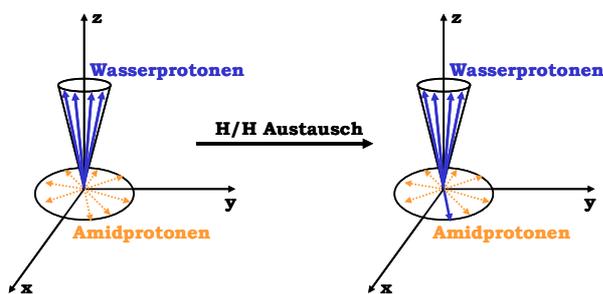


Abb. 3-10: Darstellung des H/H Austauschs eines Amidprotons mit einem Wasserproton.

Der Eintauch eines Amidprotons mit einem Wasserproton ist mit dem blauen Pfeil in der Amidprotonenebene (Abbildung rechts) dargestellt.

Es wird zwischen zwei Amidprotonenaustauschmechanismen unterschieden (Linderstrom-Lang, 1955; Hvidt und Nielsen, 1966). Jedes Amidproton kann in einer geschlossenen (C) oder einer offenen (O) Konformation vorliegen. Nur Protonen

3. Theoretische Grundlagen

in **O** können basenkatalysiert mit Protonen aus dem Lösungsmittel mit der intrinsischen Geschwindigkeitskonstante k_{ex} austauschen (**O_{ex}**) (Gleichung 3-17).



Dabei erfolgt die Öffnungsreaktion mit der Geschwindigkeitskonstante k_{op} , die Schließreaktion mit der Geschwindigkeitskonstante k_{cl} .

Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion (k_{HX}) setzt sich demnach wie folgt zusammen:

$$k_{\text{HX}} = \frac{k_{\text{op}} \cdot k_{\text{ex}}}{k_{\text{op}} + k_{\text{cl}} + k_{\text{ex}}} \quad (3-18)$$

Ist die Geschwindigkeitskonstante der Schließreaktion sehr viel größer als die Geschwindigkeitskonstante des Austauschs ($k_{\text{cl}} \gg k_{\text{ex}} + k_{\text{op}}$), ist die Austauschreaktion geschwindigkeitsbestimmend (EX2-Mechanismus). Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante reduziert sich dadurch zu $k_{\text{HX}} = (k_{\text{op}}/k_{\text{cl}}) \cdot k_{\text{ex}}$. Bei Kenntnis der intrinsischen Geschwindigkeitskonstante der Austauschreaktion (k_{ex}) für die jeweiligen Amidprotonen kann die Gleichgewichtskonstante ($K_{\text{eq}} = k_{\text{op}}/k_{\text{cl}}$) und somit auch die freie Enthalpie der Öffnungs-/Schließreaktion (ΔG_{HX}) bestimmt werden (Gleichung 3-4). Die intrinsische Geschwindigkeitskonstante der Austauschreaktion entspricht der Austauschreaktion von ungeschützten Amidgruppen unter Einbeziehung des N- und C-terminal positionierten Aminosäurerests und ist für jedes Amidproton definiert (Bai *et al.*, 1993; Connelly *et al.*, 1993). Aus der Gleichgewichtskonstanten der Reaktion (K_{eq}) kann im EX2-Mechanismus ebenfalls der Schutzfaktor (*protection factor*, $\text{PF} = 1/K_{\text{eq}}$) jedes Amidprotons bestimmt werden. Dieser ist ein Maß für die Lösungsmittelzugänglichkeit und für die Flexibilität des jeweiligen Amidprotons.

Ist hingegen die Schließreaktion geschwindigkeitsbestimmend ($k_{\text{ex}} > k_{\text{cl}} + k_{\text{op}}$), führt jede Öffnungsreaktion zu einem Protonenaustausch. Die Austauschreaktion folgt somit dem EX1-Mechanismus. Gleichung 3-18 wird nun zu $k_{\text{HX}} = k_{\text{op}}$, wodurch die Öffnungsgeschwindigkeit jedes individuellen Amidprotons direkt bestimmbar ist.

Da die Amidprotonenaustauschreaktion (k_{ex}) eine basenkatalysierte Reaktion ist, dient die pH-Abhängigkeit als Unterscheidungskriterium zwischen dem EX1- und EX2-Mechanismus. Im EX1-Mechanismus ist k_{ex} nicht geschwindigkeits-

3. Theoretische Grundlagen

bestimmend, somit zeigt k_{HX} keine Abhängigkeit vom pH-Wert. Im EX2 Mechanismus wird k_{HX} jedoch von k_{ex} beeinflusst und zeigt somit eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert der Reaktion (Abb. 3-11).

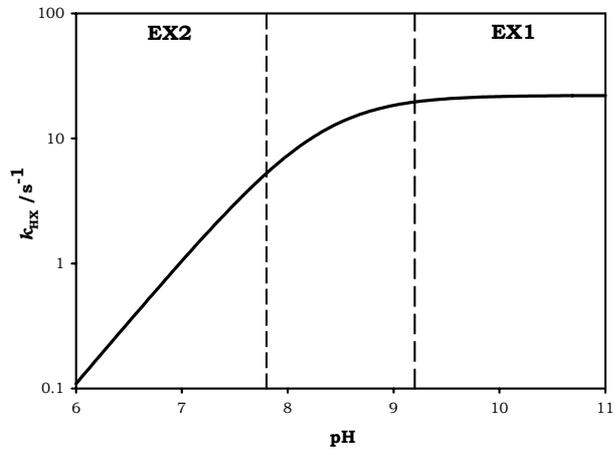


Abb. 3-11: Schematische Darstellung der Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante k_{HX} vom pH-Wert.

EX1 und EX2 bezeichnen die beiden Austauschmechanismen.

3.6 Die RNase A Superfamilie

Die RNase A Superfamilie ist eine Strukturfamilie, deren Mitglieder aus einer Vielzahl von Säugern, Vögeln, Reptilien und Amphibien isoliert wurden. Alle Mitglieder sind pyrimidinspezifische RNasen, welche in verschiedene biologische Prozesse, wie beispielsweise in die Verdauung (Barnard, 1969), die Angiogenese (Fett *et al.*, 1985) oder die angeborene Immunität (Young *et al.*, 1986) involviert sind. Obwohl die Aminosäurersequenz um mehr als 50% differiert, weisen alle Mitglieder eine sehr ähnliche Tertiärstruktur auf (Beintema *et al.*, 1997). Bekannte Vertreter der RNase A Superfamilie sind die im Rinderpankreas vorzufindende RNase A, welche der Strukturfamilie ihren Namen gibt, Onconase, ein potentiell Antikrebstherapeutikum, und Angiogenin, welches die Ausbildung neuer Gefäßstrukturen initiiert. Die Sequenzen dieser drei Vertreter sind vergleichend in Abb. 3-12 dargestellt.

Angiogenin	QDNSRYTHFL	TQH YDAKPQG	RDD - RYCESI
RNase A	-KETAAAKFE	RQHMDSS TSA	ASSSNYCNQM
ONC	QDWLT - - - FQ	KKHITN - TRD	VD - - - CDNI
Angiogenin	MRRRGLTSP -	CKDINTFIHG	NKRSIKAIICE
RNase A	MKSRNLT KD R	CKPVNTFVHE	SLADVQAVCS
ONC	MST - NLF - - H	CKDKNTFIYS	RPEPVKAICK
Angiogenin	NKNGNPHR - -	ENLRISKSSF	QVTTCKLHGG
RNase A	QKNVACKNGQ	TNCYQSYSTM	SITDCRETGS
ONC	G - I I A S K N - -	- - - VLTTSEF	YLSDCNVTSR
Angiogenin	SPWPPCQYRA	TAGFRNVV - V	ACE - NG - LPV
RNase A	SKYPNCAYKT	TQA - NKHIIV	ACEGNPYVPV
ONC	- - - P - CKYKL	KKSTNKFC - V	TCE - N - QAPV
Angiogenin	HL DQSIFRRP		
RNase A	HF D A S V - - - -		
ONC	HF V G V G S C - -		

Abb. 3-12: Primärstrukturvergleich von humanem Angiogenin, RNase A und ONC.

Grün unterlegte Aminosäurereste sind in allen drei Homologen identisch, rot unterlegte Reste sind in Angiogenin und RNase A identisch und gelb unterlegte Aminosäurereste sind in RNase A und ONC identisch.

3.6.1 RNase A

Der Hauptvertreter der RNase A Strukturfamilie, RNase A, besteht aus 124 Aminosäureresten welche die für RNasen typische V-förmige Struktur bilden (Abb. 3-13, Abb. 3-17).

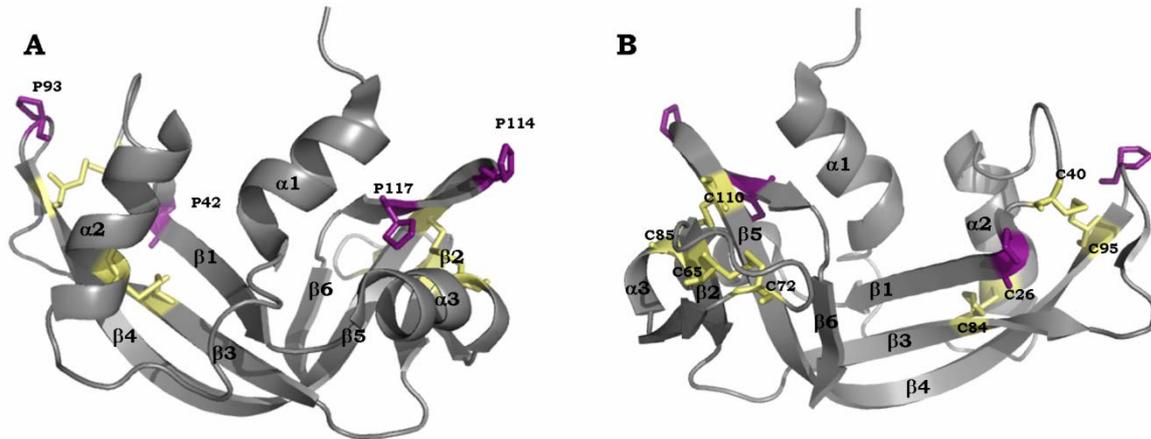


Abb. 3-13: Röntgenkristallstruktur von RNase A.

Die Prolinreste sind violett und die Cysteinreste gelb dargestellt. In A sind die Prolinreste beschriftet. B zeigt die Struktur nach einer 180° Drehung, die Cystinreste sind beschriftet (7RSA.pdb).

Durch ihre leichte Gewinnung in hohen Mengen und die Reversibilität der Entfaltung wurde RNase A hinsichtlich der Proteinstabilität und -faltung intensiv untersucht (Tsong *et al.*, 1972; Scheraga *et al.*, 1984; Neira und Rico, 1997). Da in RNase A keine Tryptophanreste vorhanden sind, wird zur Untersuchung von Faltungsprozessen die Änderung des Fluoreszenzsignals der Phenylalanin- (Position 8, 46, 120) und Tyrosinreste (Position 25, 73, 76, 92, 97, 115) genutzt. Von den vier vorkommenden Prolyresten liegen im nativen Zustand zwei in *cis*-Konformation (Position 93 und 114) und zwei in *trans*-Konformation (Position 42 und 117) vor. RNase A enthält vier Disulfidbrücken (Abb. 3-13).

Die thermodynamische Stabilität von RNase A beträgt $38 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Pace *et al.*, 1990). Obwohl die Faltung von RNase A im Gleichgewicht einen Zweizustandscharakter aufweist, wurden bei kinetischen Untersuchungen verschiedene Intermediate detektiert und teilweise charakterisiert. Die Rückfaltungsreaktion von RNase A wird in der Literatur mit drei bzw. fünf Phasen beschrieben. Diese Phasen sind auf die Heterogenität des entfalteten Zustands zurück zu führen (Garel und Baldwin, 1973). Im entfalteten Zustand liegen verschiedene Molekülspezies vor, die sich in ihrem Anteil an in nativer Konformation vorliegender Peptidyl-prolyl-Bindungen unterscheiden (Wedemeyer *et al.*, 2002). Mutationsstudien zeigten, dass die Isomerisierung der Peptidyl-prolyl-Bindungen Y92-P93, N113-P114 und V116-P117 essentiell an der Faltung beteiligt sind, während die Peptidyl-prolyl-Bindung K41-

3. Theoretische Grundlagen

Die Rückfaltung von U_{vf} , in welcher alle für die Faltung wichtigen Peptidyl-prolyl-Bindungen in nativer Konformation vorliegen (Y92-P93, N113-P114, V116-P117), verläuft ebenfalls über zwei Intermediate (Abb. 3-15) (Houry und Scheraga, 1996a; b). Das frühe Intermediat I_U besitzt bereits lokale Strukturen, obwohl keine Amidprotonen einen Schutz gegen Amidprotonenaustausch zeigen. Im späten Intermediat (I_ϕ) liegen bereits große Bereiche der β -Faltblattstränge und die zweite α -Helix gefaltet vor (Matheson und Scheraga, 1978; Houry und Scheraga, 1996b).



Abb. 3-15: Rückfaltungswege der entfalteten Spezies U_{vf} und U_S^{II} von RNase A.
I- Intermediat, N- nativer Zustand

Auch die Entfaltungsreaktion von RNase A wurde ausführlich untersucht und verschiedene Entfaltungsintermediate wurden postuliert. So wurde mit Hilfe von Echtzeit-NMR-Spektroskopie ein Entfaltungsintermediat detektiert, welches bereits frei rotierende Seitenketten aufweist (Kiefhaber *et al.*, 1995). Dieses Intermediat ist resistent gegen H/D-Austausch (Kiefhaber und Baldwin, 1995), sodass davon ausgegangen wird, dass während der Entfaltungsreaktion erst nach Bildung des Intermediats Lösungsmittel in das Innere des Moleküls eindringen kann. Daher wird dieses Intermediat als „*dry molten globule*“ bezeichnet.

Mit Hilfe von H/D-Austauschexperimenten wurde weiterhin die Existenz von zwei nativen Zuständen beschrieben (Abb. 3-16). Dabei besitzt N_I^* (alternative Form) im Gegensatz zu N (dominante Form) bereits einige Amidprotonen, die vollständig für einen Austausch zugänglich sind. Bei der Entfaltung von N werden verschiedene Intermediate durchlaufen (I_U^2 , I_U^3). Die Entfaltung von N_I^* verläuft hingegen direkt zu U_F^* (Juneja und Udgaonkar, 2002).

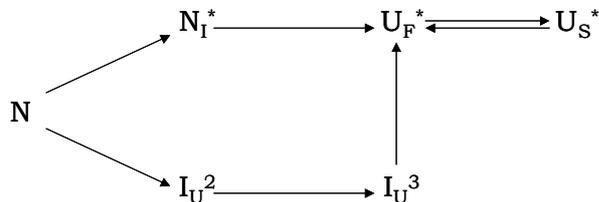


Abb. 3-16: Entfaltungsmodell von RNase A.
Die Abbildung wurde nach Juneja und Udgaonkar (2002) erstellt. N-nativer Zustand, U-entfalteter Zustand, I-Intermediat.

3.6.2 Onconase

Das mit 104 Aminosäureresten kleinste Mitglied der RNase A-Superfamilie, ONC (auch Ranpirnase oder P30-Protein), wurde ursprünglich aus den Oocyten und frühen Embryonen des Nördlichen Leopardenfroschs (*Rana pipiens*) isoliert. Trotz einer Sequenzidentität von nur 28% (Abb. 3-12) zum Hauptvertreter dieser Superfamilie, RNase A (Ardelt *et al.*, 1991), zeigen ONC und RNase A vergleichbare Tertiärstrukturen (Abb. 3-13, Abb. 3-17).

ONC enthält einen Tryptophanrest in Position drei, der im nativen Protein im Molekülinneren verborgen und im entfalteten Protein exponiert ist. Die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften dieses Tryptophanrestes während der Ent- bzw. Rückfaltungsreaktion dient zur Beobachtung der Faltung von ONC. Weiterhin sind in ONC drei Tyrosinreste (Position 38, 64, 77) und 6 Phenylalaninreste (Position 6, 28, 36, 63, 85, 98) über das Molekül verteilt. Die vier in ONC vorhandenen Prolinreste (Position 41, 43, 74, 95) liegen im nativen Zustand alle in *trans*-Konformation vor (Mosimann *et al.*, 1994).

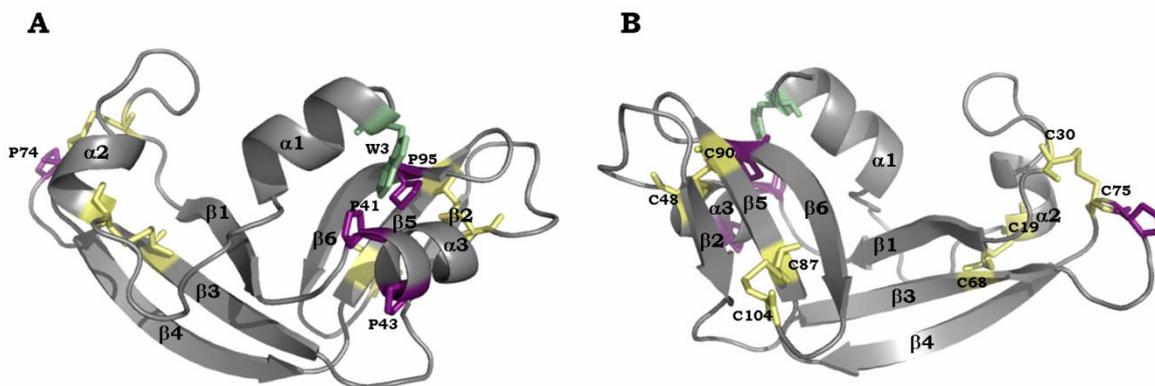


Abb. 3-17: Röntgenkristallstruktur von ONC.

Die Prolinreste sind violett, die Cysteinreste gelb und der Tryptophanrest ist grün dargestellt. In A sind zusätzlich die Prolinreste und der Tryptophanrest beschriftet. B zeigt die Struktur nach einer 180° Drehung, die Cysteinreste sind beschriftet (1ONC.pdb).

ONC enthält vier Disulfidbrücken, von denen drei in der RNase A-Superfamilie konserviert sind (Abb. 3-18). Die vierte Disulfidbrücke (C87-C104) die auch in verschiedenen anderen amphibischen RNasen vorhanden ist, fixiert den C-Terminus kovalent an den fünften β -Faltblattstrang und somit an den Proteinrumpf.

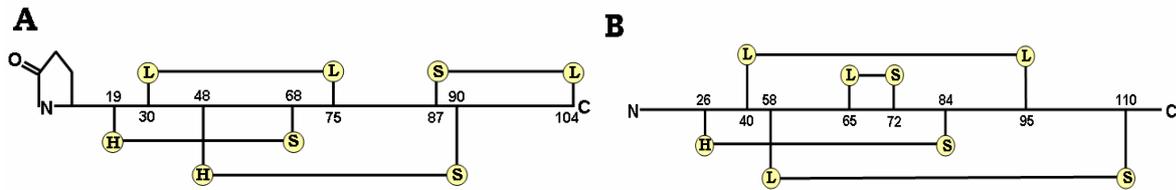


Abb. 3-18: Schematische Darstellung der vier Disulfidbrücken in ONC (A) und RNase A (B).

Die disulfidverbrückten Cysteinreste sind nach ihrer Lage im gefalteten Protein gekennzeichnet. H- α -Helix, S- β -Faltblattstrang, L- *loop*. Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an Leland *et al* (2000).

3.6.2.1 Aktivität und Zytotoxizität von Onconase

Das aktive Zentrum von ONC wird durch die β -Faltblätter eins und sechs, sowie die erste α -Helix gebildet (Abb. 3-17). Innerhalb dieser Region befinden sich die für die Aktivität notwendigen Aminosäurereste H10, K31, T35, H97, F98 und das für amphibische RNasen typische Pyroglutamat in Position eins. Dabei dient der Pyroglutamylrest zur Substratjustierung (Lee *et al.*, 2008).

ONC ist eine Endoribonuclease, die vorrangig doppelsträngige Ribonucleinsäuren (RNAs) mit Pyrimidinbasen am 5'-Ende der zu spaltenden Phosphodiesterbindung hydrolysiert. Dabei wird die Spaltung von Guanosinmonophosphat am 3'-Ende begünstigt (Lee *et al.*, 2008). Aus der Kristallstruktur des Komplexes von ONC mit gebundenem Substrat (AUGA) wurde deutlich, dass die Guanosinmonophosphat-Spezifität durch Coulomb-Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen wird. Durch Substitutionen der für die Bindung verantwortlichen Aminosäurereste kann das Enzym in eine Adenosinmonophosphat-spezifische RNase umgewandelt werden (Lee *et al.*, 2008). Das bevorzugte Substrat von ONC stellt Transfer-RNA (tRNA) dar (Sahasini und Sirdeshmukh, 2006).

Über die physiologische Relevanz von ONC in den Oozyten und frühen Embryonen ist nichts bekannt. Es wurde jedoch der Einfluss von ONC auf die Regulierung der Genexpression und somit die Embryonalentwicklung des Froschs in Zusammenhang mit RNA *interference* postuliert (Ardelt *et al.*, 2003). Das *silencing* des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gens durch RNA *interference* wurde beispielsweise in Gegenwart von ONC aufgehoben (Zhao *et al.*, 2008).

Da die aktiven Zentren von ONC und RNase A weitgehend vergleichbar sind, wird davon ausgegangen, dass der Katalysemechanismus von ONC ähnlich dem von RNase A verläuft. Die Reaktion besteht aus zwei nukleophilen Substitutionsreaktionen und durchläuft ein 2',3'-zyklisches Intermediat (Abb. 3-19).

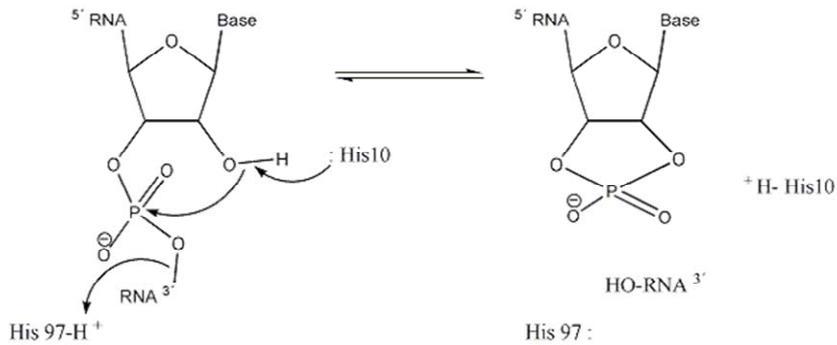


Abb. 3-19: Hypothetischer erster Katalyseschritt bei der Spaltung von Oligonukleotiden durch ONC.

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an Lee und Raines (2003).

Im Vergleich zu RNase A weist ONC jedoch eine um 10^3 - 10^5 verminderte Aktivität auf, was durch die geringe Substrataffinität (Lee und Raines, 2003) sowie eine geringe Molekülflexibilität (Merlino *et al.*, 2005) von ONC verursacht ist.

Trotz der verminderten Fähigkeit zur RNA-Spaltung weist ONC sowohl *in vivo* als auch *in vitro* antitumorale Aktivität auf. Da Krebszellen eine verstärkt negative Zelloberfläche aufweisen, interagiert die stark basische ONC ($pI > 9,5$) (Ardelt *et al.*, 1991) zunächst unspezifisch über ionische Wechselwirkungen mit der Zelloberfläche (Arnold, 2008). In anderen Studien wird davon ausgegangen, dass ONC an einen noch nicht identifizierten Zelloberflächenrezeptor bindet (Wu *et al.*, 1993). Über Clathrin-vermittelte Endozytose gelangt ONC dann in das Zytosol und kann dort RNA abbauen, was zur Inhibierung der Proteinbiosynthese führt. Mit ONC behandelte Tumorzellen verbleiben in der G1-Phase des Zellzyklus und induzieren Apoptose (Darzynkiewicz *et al.*, 1988).

Der IC_{50} -Wert für ONC liegt, in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie, zwischen 0,2 und 1 μM (Newton *et al.*, 1998; Klink und Raines, 2000; Leland *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2003; Schulenburg *et al.*, 2007). Wie an verschiedenen Varianten gezeigt wurde, korreliert das zytotoxische Potenzial mit der ribonukleolytischen Aktivität (Schulenburg *et al.*, 2007).

Die zytotoxische Aktivität von RNasen wird *in vivo* durch den RNase-Inhibitor (RI) verhindert. Die Interaktion zwischen RI und verschiedenen RNasen ist mit einer Dissoziationskonstante im femtomolaren Bereich (Kobe *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 2007) eine der stärksten bekannten Protein-Protein-Interaktion (Turcotte und Raines, 2008). Der RI aus Säugerzellen ist ein 50 kDa Leucin-reiches Protein, das im Zytosol unterschiedlicher Zelltypen zu finden ist. Die in einem 1:1 Komplex vorliegende Bindung wird hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen sowie zwei Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen (Rutkoski und Raines,

2008). Die Dissoziationskonstante von RI und ONC ist bei physiologischen Salzkonzentrationen $>1 \mu\text{M}$ (Boix *et al.*, 1996). Diese schwache Bindung ist durch die im Vergleich zu anderen RNasen kompakte Struktur von ONC sowie die verkürzten *loop*-Regionen zu erklären (Rutkoski und Raines, 2008). Von den 24 an der Bindung zwischen RI und RNase A beteiligten Aminosäureresten sind in ONC nur drei konserviert, drei Aminosäurereste sind gegen ähnliche, neun gegen nicht-ähnliche Reste substituiert. Die verbleibenden neun Aminosäurereste haben keine Äquivalente in ONC (Kobe *et al.*, 1994). Bisher konnte kein spezifischer Inhibitor für ONC aus Fröschen isoliert werden (Turcotte und Raines, 2008).

Da die ribonucleolytische Aktivität von ONC nicht durch RI verhindert wird, wurde ONC bereits in der Phase IIIb klinischer Studien als potentiell Therapeutikum gegen Lungenkrebs getestet (Schulenburg *et al.*, 2007). In dieser Phase wird ONC in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin intravenös injiziert. Weiterhin sind Untersuchungen zur klinischen Phase II mit ONC als Therapeutikum gegen bösartigen Brustkrebs, Prostatakrebs und metastasierenden Nierenkrebs abgeschlossen (Pavlakis und Vogelzang, 2006). Außerdem wurde festgestellt, dass ONC die HIV-1 Replikation in infizierten H9-Leukämiezellen inhibiert, indem sie die HIV-1 mRNA abbaut (Youle *et al.*, 1994).

3.6.2.2 Stabilität und Faltung von Onconase

Für ein Protein aus einem mesophilen Organismus ist ONC mit einer thermodynamischen Stabilität von mehr als $60 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ überdurchschnittlich stabil. Die hohe Stabilität von ONC wird im Vergleich zur homologen RNase A u.a. auf verkürzte *loop*-Strukturen, größere hydrophobe Cluster und eine Disulfidbrücke am C-Terminus von ONC zurück geführt (Notomista *et al.*, 2000). Der in ONC vorkommende N-terminale Pyroglutamyrest, welcher in RNase A nicht vorhanden ist, übt keinen starken Einfluss auf die Proteinstabilität aus (Arnold *et al.*, 2006). Jedoch trägt die geringe Molekülflexibilität von ONC zur hohen thermodynamischen Stabilität bei (Merlino *et al.*, 2005).

Neben der hohen thermodynamischen Stabilität zeichnet ONC auch eine hohe proteolytische Stabilität aus (Notomista *et al.*, 2001). Durch die kompakte Molekülstruktur sind potentielle Proteaseschnittstellen vermindert zugänglich. Auf Grund der hohen thermodynamischen Stabilität ist auch entfaltete ONC gegenüber proteolytischem Abbau weitgehend geschützt. Unter den extremen Bedingungen, die für die Entfaltung von ONC nötig sind, sind die meisten Proteasen bereits entfaltet.

Weiterhin kann ONC durch Glycosylierung am Aminosäurerest N69 stabilisiert werden. Aus *Rana pipiens* wurde jedoch nur unglycosylierte ONC isoliert. Durch rekombinante Expression in *Pichia pastoris* wurde zu 80% glycosylierte ONC gewonnen, welche im Vergleich zum unglycosylierten Enzym eine noch höhere thermodynamische und proteolytische Stabilität aufweist (Kim *et al.*, 2004).

Obwohl ONC durch ihre kompakte Struktur, hohe Stabilität, der *trans*-Konformation aller Peptidyl-prolyl-Bindungen im nativen Zustand und ihre Homologie zur gut untersuchten RNase A ein gutes Modellprotein für Faltungsstudien darstellt, ist über das Faltungsverhalten von ONC nur wenig bekannt. Sowohl thermisch als auch chemisch induzierte Gleichgewichtsübergänge zeigen einen Zweizustandscharakter. Studien hinsichtlich der Faltung zeigen bei manueller Mischung ebenfalls ein Zweizustandsverhalten (Arnold *et al.*, 2006). Untersuchungen der Rückfaltungsreaktion von ONC mittels *stopped-flow*-Absorbtionsmessung ergaben zweiphasige Kinetiken, wobei die langsame Rückfaltungsphase auf eine Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktion zurückgeführt wurde (Pradeep *et al.*, 2006).

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Bakterienstämme, Vektoren und Primer

Escherichia coli (E.coli) Stämme

XL1 Blue (Stratagene, Heidelberg) zur Plasmidpräparation

BL 21 (DE3) (Stratagene, Heidelberg) zur Proteinexpression

Vektoren

pET-26b(+)

E. coli Expressionsvektor

Kanamycin-Resistenz-Gen

Der das *ONC*-Gen enthaltene pET-26b(+) Vektor wurde freundlicherweise von D. Schmidt zur Verfügung gestellt.

pET-22b(+)

E. coli Expressionsvektor

Ampicillin-Resistenz-Gen

Der das *C87A/C104A-ONC*-Gen enthaltene pET-22b(+) Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. R. T. Raines (Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, USA) zur Verfügung gestellt.

Primer

Mit dem Primer *ONC104AHindIII* wurde eine *HindIII* Schnittstelle am 3'-Ende des Gens für *C87A/C104A-ONC* eingefügt. Der Primer wurde mit Hilfe des Programms *gene runner* erstellt und von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Der T7-Promotor-Primer wurde von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

T7-Promotor
ONC104AHindIII

5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA-3'
5'-CGC AAG CTT GTC GAC TAG GC-3'

Die eingeführte *HindIII* Schnittstelle ist durch Unterstreichung kenntlich gemacht.

4.1.2 Nährmedien

TB-Medium (Terrific Broth):	12 g/l Trypton, 24 g l ⁻¹ Hefeextrakt, 4 ml l ⁻¹ Glycerol, 23,1 g l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 125,4 g l ⁻¹ K ₂ HPO ₄ , 4% (w/v) Glucose
M9-Minimalsalzmedium:	8,5 g l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ , 3 g l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 1 g l ⁻¹ ¹⁵ NH ₄ Cl, 0,5 g l ⁻¹ NaCl, 1 ml l ⁻¹ 1 M MgSO ₄ , 100 µl l ⁻¹ CaCl ₂ , 100 µl 0.5% l ⁻¹ (w/v) Thiamindiphosphat, 20 ml l ⁻¹ 20% (w/v) Glucose
SOC/SOB-Medium (Super Optimal Broth):	20 g l ⁻¹ Trypton, 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt, 0,5 g l ⁻¹ NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 0,8% (w/v) Glucose
LB-Medium (Luria-Bertani):	10 g l ⁻¹ Trypton, 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt, 10 g l ⁻¹ NaCl
LB-Agarplatten:	10 g l ⁻¹ Trypton, 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt, 10 g l ⁻¹ NaCl, 20 g l ⁻¹ Agar

Die Medien wurden nach der Herstellung autoklaviert.

4.1.3 Proteine

LMW-Marker (<i>low-molecular-weight</i> -Proteinmarker)	Amersham Bioscience, Freiburg
Phosphorylase b	97 kDa
Rinderserumalbumin (BSA)	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Trypsininhibitor	20,1 kDa
α-Lactalbumin	14,4 kDa
Alkalische Phosphatase	USB, Cleveland, USA
Cyclophilin 18	Dr. Schiene-Fischer, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle
<i>Hind</i> III	New England BioLabs, Frankfurt
Lysozym	Serva, Heidelberg
<i>Nde</i> I	New England BioLabs, Frankfurt
Rinderserumalbumin	Pierce, Rockford, USA
T4-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe

Thermus SlyD

Dr. Löw, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biophysik

4.1.4 Chemikalien

Zur Herstellung von Lösungen wurden nur reine, im Handel erhältliche Chemikalien genutzt. Puffer wurden auf der Grundlage von deionisiertem Wasser hergestellt (Purelab Plus Reinstwasseranlage). Deuterierte Lösungen wurden durch 3- bis 5maliges Lösen in D₂O und anschließende Lyophilisation hergestellt.

Acrylamid	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Agar	Difco, Detroit, USA
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
¹⁵ N-Ammoniumchlorid (¹⁵ NH ₄ Cl)	Eurisotop, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
8-Anilidonaphthalen-1-sulfonat (ANS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Applichem, Darmstadt
Coomassie R-250	Merck, Darmstadt
Deuteriumoxid (D ₂ O, 99,9%)	Eurisotop, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
D-(+)-Glucose	Applichem, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Applichem, Darmstadt
Glutathion, reduziert (GSH)	Applichem, Darmstadt
Glycerin	Merk, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid (GdnHCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Hefe-RNA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Serva, Heidelberg
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Serva, Heidelberg
Lanthanchlorid Heptahydrat (LaCl ₃ × 7 H ₂ O)	Riedel de Haën, Seelze
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Serva, Heidelberg
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Serva, Heidelberg

2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Perchlorsäure (PCA)	Serva, Heidelberg
Polyethylenglycol (PEG) 4000/8000	Serva, Heidelberg
Natriumazid (NaN ₃)	Applichem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Thiamindiphosphat (TPP)	Enzymologie, Halle
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Detroit, USA

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Klonierung des *C87A/C104A-ONC*-Gens in den Vektor pET26b(+)

Zur Klonierung wurde das *C87A/C104A-ONC*-Gen im Vektor pET22b(+) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den unter 4.1.1 angegebenen Primern nach folgendem Ansatz bei 68°C amplifiziert:

5 µl Pfu-Polymerase-Puffer
10 µl *C87A/C104A-ONC*-Gen in pET22b(+)
6 µl T7 Promotor (25 pmol)
12,5 µl *ONC104A*HindIII (25 pmol)
1 µl 10 mM dNTP-Mix
14,5 µl dd H₂O
1 µl Pfu Polymerase

Sowohl der Vektor pET26b(+) als auch das amplifizierte *C87A/C104A-ONC*-Gen wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Hind*III für 12 h bei 37°C verdaut:

25 µl DNA
3 µl NEB2-Puffer (New England BioLabs, Frankfurt)
0,8 µl *Nde*I
0,8 µl *Hind*III
5,4 µl ddH₂O

Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen durch 20 min Inkubation bei 65°C. Die Dephosphorylierung der 5'-Enden der Vektor-DNA erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase bei 37°C für eine Stunde. Die Reinigung der DNA erfolgte an einem Agarosegel (Sambrook, 1989). Die jeweiligen Banden wurden aus dem Agarosegel geschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) gereinigt.

Die Ligation von Vektor-DNA und *C87A/C104A-ONC-Gen* erfolgte durch Inkubation beider DNA Fragmente für 4 h bei 24°C in Gegenwart von T4 Ligase. Dabei wurden Vektor und *C87A/C104A-ONC-Gen* in einem Verhältnis von 1:4 eingesetzt. Die Richtigkeit der Klonierung wurde durch Sequenzierung von Eurofins Medigenomix GmbH (Martinsried) überprüft.

4.2.2 Transformation

Zur Transformation wurden 100 µl chemokompetente *E. coli* Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA (50 µg ml⁻¹) versetzt und 20 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 s bei 42°C und nachfolgend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium (4.1.2) wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C kontinuierlich geschüttelt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB-Agarplatten (4.1.2), die 25 µg ml⁻¹ Kanamycin enthielten, ausplattiert. Die ausgestrichenen Kulturen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.3 Glycerinkulturen

Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden in 5 ml LB-Medium (4.1.2) mit 50 µg ml⁻¹ Kanamycin überführt und bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln für mindestens 12 h inkubiert. Es wurden 900 µl der Schüttelkultur mit 100 µl 87% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

4.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Über Nacht gewachsenen Kolonien wurden in 5 ml LB-Medium (4.1.2) mit 50 µg ml⁻¹ Kanamycin überführt und bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln 8 - 10 h inkubiert.

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers isoliert. Die Konzentration an DNA wurde spektroskopisch bei 260 und 320 nm ($E_{260}-E_{320} = 1$ entspricht 50 µg ml⁻¹ dsDNA) mit dem UV/VIS-Spectrophotometer Ultrospec 300 (Amersham, Freiburg) bestimmt. Zur Bestimmung der Reinheit wurde die Extinktion bei 260, 280 und 320 nm gemessen. Der Quotient $((E_{260}-E_{320})/(E_{280}-E_{320}))$ sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.3 Proteinchemische Methoden

4.3.1 Genexpression

Das Protein wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Vorkultur (2 × 100 ml TB-Medium (4.1.2), 50 µg ml⁻¹ Kanamycin) wurde mit frisch transformierten und ausplattierten (4.2.2) *E. coli* BL21(DE3) angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Hauptkultur (2 × 1 l TB-Medium, 50 µg ml⁻¹ Kanamycin) wurde mit 20 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 1,8 und 2,0 angezogen. Es wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiterer Kultivierung bei 37°C über 4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 6.000 × g, 4°C) geerntet. Die Herstellung von ¹⁵N-markiertem Protein erfolgte analog, jedoch wurden die Zellen in M9-Minimalsalzmedium in Gegenwart von ¹⁵NH₄Cl angezogen. Nach Inkubation erfolgte eine weitere Kultivierung über 6 – 8 h. Alle weiteren Schritte erfolgten identisch zur Herstellung von unmarkiertem Protein.

4.3.2 Zellaufschluss, Präparation und Solubilisierung von *inclusion bodies*

Das Protein wurde in Form von *inclusion bodies* (*ibs*) erhalten. Zellaufschluss, Präparation und Solubilisierung der *ibs* erfolgte in Anlehnung an Rudolph und Lilie (1996).

Es wurden 1 g Zellen in 5 ml Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,0) mit dem Ultraturrax (Janke & Kunkel, Staufen) resuspendiert und mit 1,5 mg Lysozym für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss in drei Passagen bei 700 bar an einem Gaulin APV Homogenisator (Gaulin, Lübeck). Zum Abbau der DNA wurde die Suspension mit 5 U/ml Benzonase und 3 mM MgCl₂ versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde 50% (v/v) Tritonlösung zugesetzt (1,5 M NaCl, 60 mM EDTA, 6% (v/v) Triton X-100) und wiederum 30 min bei 4°C inkubiert. Die *ibs* wurden durch Zentrifugation (20 min, 20.000 × g, 4°C) isoliert. Verunreinigungen wurden durch wiederholtes Lösen in Waschpuffer (100 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 7,0) und anschließende Zentrifugation entfernt.

Zur Solubilisierung wurden 1 g *ibs* in 10 ml Solubilisierungspuffer (6 M GdnHCl, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 250 mM DTT, pH 8,0) gelöst, mit Stickstoff begast und zur vollständigen Reduktion der Disulfidbrücken 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Absenkung des pH-Wertes auf pH 4-5 mit Essigsäure und anschließender Zentrifugation (20 min, 20.000 × g, 4°C) wurde gegen das 100-fache Volumen an

20 mM Essigsäure für 12 h bei 4°C dialysiert (Dialyseschlauch: Spectra/Por, 3,5 kDa Ausschlussgrenze, Serva, Heidelberg). Nach der Dialyse auftretende Präzipitate wurden durch Zentrifugation (20 min, 20.000 × *g*, 4°C) entfernt.

4.3.3 Oxidativ-präparative Renaturierung

Der Renaturierungspuffer (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG, pH 8,0) wurde zunächst mit Stickstoff begast, nachfolgend wurde die Proteinlösung unter Rühren durch langsames Zutropfen zugesetzt. Die Endkonzentration an Protein betrug 50 µg/ml. Die Renaturierung erfolgte über 36 h bei Raumtemperatur.

4.3.4 Konzentrierung

Der Renaturierungsansatz wurden mit Hilfe einer Filtron-Anlage (Verder, Hahn) unter Verwendung eines 3 K-Filters (Verder, Vleuten, Niederlande) oder für kleinere Volumina mittels Amicon-Zellen (Milipore, Schwalbach) unter Verwendung einer 3 K-Omega-Membran (Pall Filtron, Dreieich) konzentriert. Der Ansatz wurde während der Konzentrierung mit 25% (v/v) einer 0,1 M Tris/HCl Lösung, pH 8,0 gewaschen. Während der Konzentrierung auftretende Aggregate wurden durch Zentrifugation (25 min, 20.000 × *g*, 4°C) und durch Filtration (0,2 µm Cellulose-Acetat-Filter, Satorius, Göttingen) abgetrennt.

4.3.5 Proteinreinigung

Die Reinigung erfolgte mittels Kationenaustauschchromatographie bei Raumtemperatur an einem ÄKTA-System (GE Healthcare, München) mit einer 75 ml EMD SO₃-Säule (Fractogel, Merck, Darmstadt). Der pH-Wert der Proteinlösung wurde mit Essigsäure auf 4-5 eingestellt. Die Proteinlösung wurde mit Laufmittel A (50 mM Tris/HCl, pH 8,0) aufgetragen und im steigenden linearen Salzgradienten (Laufmittel B: 50 mM Tris/HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,5), bei einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ eluiert. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Die Reinheit wurde durch Rechromatographie und mittels SDS-PAGE und nachfolgender Silberfärbung (4.3.10) überprüft.

4.3.6 Zyklisierung des N-terminalen Glutaminrestes zum Pyroglutamatrest

Zur Zyklisierung des N-terminalen Glutaminylrestes wurde die gereinigte Proteinlösung 3 d bei Raumtemperatur gegen 200 mM NaH₂PO₄, pH 8,0 dialysiert

(Dialyseschlauch: Spectra/Por, 3,5 kDa Ausschlussgrenze, Serva, Heidelberg). Die erfolgte Zyklisierung wurde massenspektrometrisch überprüft (4.3.7).

4.3.7 Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Proteinmolekülmasse wurde das gereinigte Protein zunächst mittels ZipTip® Pipettenspitzen (C₁₈-Säule, Millipore, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers entsalzt. Die Molekülmasse wurde durch ESI- (*electrospray-ionization*) oder MALDI-TOF (*matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight*) Massenspektrometrie von Frau Dr. Angelika Schierhorn und Mitarbeitern (Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg) bestimmt.

4.3.8 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde durch UV/VIS-Spektroskopie bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion bei 280 nm ermittelt und ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{280} = 0,87 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für ONC und C87A/C104A-ONC (Leland *et al.*, 2000) verwendet. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach Gleichung 4-1.

$$c = \frac{E_{280}}{\epsilon_{280} \cdot d} \quad (4-1)$$

c = Proteinkonzentration (mg ml⁻¹)

d = Küvettendicke (cm)

ϵ_{280} = Extinktionskoeffizient (ml mg⁻¹ cm⁻¹)

4.3.9 Gefriertrocknung

Alle zu lyophilisierenden Lösungen wurden 3 Mal gegen das 100-fache Volumen H₂O bzw. D₂O dialysiert und bei -80°C eingefroren. Die Gefriertrocknung erfolgte in einer Beta 1-16 Lyophilisator (Christ, Osterode) bei einer Arbeitstemperatur von 20°C.

4.3.10 SDS-PAGE nach Laemmli

Die Elektrophorese wurde unter Verwendung einer *Mighty-Small II Elektrophoresis Unit* (Hofer, San Francisco, USA) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels betrug 10% (w/v), die des Trenngels 17,5% (w/v). Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA. Die Proteinbanden wurden durch Coomassie- (Wong *et al.*, 2000) bzw. Silberfärbung (Nesterenko *et al.*, 1994) visualisiert.

4.3.11 Aktivitätstest

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte in Anlehnung an Anfinsen *et al.* (1954) und Blank und Dekker (1981) mit Hilfe von Hefe-RNA (Sigma-Aldrich, Steinheim) als Substrat. Zunächst wurde die RNA durch Ethanol-fällung von Ribonucleotiden bzw. Oligoribonucleotiden befreit und in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 aufgenommen. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte spektroskopisch bei 260 nm an einem UV/VIS-Spectrophotometer Ultrospec 300 (Amersham, Freiburg). Dabei entspricht eine Extinktion von 1 ca. 40 µg/ml RNA (Sambrook, 1989).

Es wurden 0,7 µg ml⁻¹ Onconase und 2,8 mg ml⁻¹ RNA eingesetzt. Alle Verdünnungen erfolgten mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 250 µl. Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl Stopp-Lösung (22 mM LaCl₃ × 7 H₂O, 1,2 M Perchlorsäure) beendet. Die abgestoppten Lösungen wurden zur Fällung von nicht hydrolysiertes RNA 20 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Ansätze 20 min bei 20.000 × g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:20 mit DEPC-behandeltem H₂O verdünnt und die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Konzentration an löslichen Ribonucleotiden wurde mit dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{260} = 10600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet (Curtis *et al.*, 1966).

Bei der Angabe der spezifischen Aktivität (*unit* mg⁻¹) bezeichnet eine *unit* die Menge an Enzym, die innerhalb 1 h 1 µmol lösliche Ribonucleotide freisetzt.

4.3.12 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem Jasco® Spectropolarimeter J-810 (Jasco, Groß-Umstadt) aufgenommen. Im nahen UV-Bereich (250-340 nm für natives Protein, 270-340 nm für entfaltetes Protein) wurden in einer 1 cm Quarzglasküvette, im fernen UV Bereich (190-260 nm für natives Protein, 210-260 nm für entfaltetes Protein) in einer 0,1 mm Quarzglasküvette gemessen. Die Proteinkonzentration wurde auf ca. 1 mg ml⁻¹ eingestellt und nachträglich am UV/VIS-Spectrophotometer Ultrospec 300 (Amersham, Freiburg) bei 280 nm genau bestimmt.

Das Messintervall bei der Aufnahme der CD-Spektren betrug 0,2 nm, die Spaltbreite wurde auf 1 nm festgelegt. Das Messsignal wurde über 2 s gemittelt. Es wurden jeweils 10 Einzelspektren akkumuliert. Alle Messungen erfolgten bei 20°C.

Die molare Elliptizität ($[\Theta]_{\text{MRW}}$) wurde nach Gleichung 4-2 berechnet.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_A} \quad (4-2)$$

$[\Theta]_{MRW}$	molare Elliptizität pro Aminosäurerest (deg cm ² dmol ⁻¹)
Θ	Elliptizität (mdeg)
M	molare Masse des Proteins (g mol ⁻¹)
c	Proteinkonzentration (mg ml ⁻¹)
d	Küvettdicke (cm)
N_A	Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

4.3.13 Fluoreszenzmessungen

4.3.13.1 Aufnahme von GdnHCl-induzierten Übergangskurven

Die GdnHCl-induzierten Übergangskurven wurden sowohl aus der Wellenlängenverschiebung des Emissionsmaximums von Fluoreszenzspektren (305–380 nm) als auch aus der Intensitätszunahme bei 358 nm an einem Fluoro-Max-2[®] Spektrometer (Jobin Yvon, Bensheim) in einer 1-cm-halbreduzierten Fluoreszenzquarzglasküvette (Hellma, Müllheim) bestimmt.

Die 1 ml-Ansätze (0–7,5 M GdnHCl, 20 µg/ml Protein, 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 bzw. 50 mM Natriumphosphat, 100% D₂O, pD 8,6) wurden mindestens 12 h bei 25°C equilibriert. Es wurden Proben ausgehend von nativem und entfaltetem Protein hergestellt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Die Spaltbreite bei Anregung betrug 1 nm, die der Emission 10 nm. Alle Messungen wurden bei 20°C durchgeführt. Die Integrationszeit bei jeder Wellenlänge betrug 0,2 s. Es wurden jeweils 5 Spektren akkumuliert bzw. die Fluoreszenzintensität bei 358 nm für 60 s (120 Datenpunkte) bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Gleichung 3-11.

4.3.13.2 Manuelle Messungen von Faltungsreaktionen

Die Geschwindigkeitskonstanten der Ent- und Rückfaltungsreaktion von ONC bzw. C87A/C104A-ONC wurden durch manuelle Verdünnung der Proteinlösung in Messpuffer am Fluoro-Max-2 Spektrometer bzw. Fluoro-Max-3 Spektrometer (Jobin Yvon, Bensheim) in einer 1 cm-Fluoreszenzquarzglasküvette bestimmt. Alle Messungen wurden bei 20°C in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 durchgeführt. Die Spaltbreite der Anregung und Emission betrug 5 nm. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Es wurde die Emissionsänderung bei 310, 320 und 358 nm als Funktion der Zeit aufgezeichnet.

Die so ermittelten Progresskurven wurden mit einer einfach-exponentiellen Funktion (Gleichung 3-13) angepasst. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten

wurden als Funktion der GdnHCl-Konzentration aufgetragen und nach Gleichung 3-15 angepasst.

4.3.13.3 *stopped-flow*-Messungen von Faltungsreaktionen

Die Messungen erfolgten an einem SX 20 *stopped-flow*-Spektrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) bei 20°C. Für Temperaturabhängigkeitsmessungen wurde die Temperatur zwischen 10 und 45°C variiert. Die Spaltbreiten der Monochromatoren betragen je 10 nm. Die Anregung erfolgte bei 280 nm, es wurde ein 320 nm Ausschlussfilter verwendet. Für jeden experimentellen Ansatz wurden 3 bis 5 Einzelmessungen gemittelt.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden wurden die Progresskurven entsprechend der auftretenden Phasen einfach- (Gleichung 3-13), doppelt- (Gleichung 4-3) bzw. dreifach-exponentiell (Gleichung 4-4) angepasst.

$$S = A_1 \cdot \exp(-k_{obs1} \cdot t) + A_2 \cdot \exp(-k_{obs2} \cdot t) + B \quad (4-3)$$

$$S = A_1 \cdot \exp(-k_{obs1} \cdot t) + A_2 \cdot \exp(-k_{obs2} \cdot t) + A_3 \cdot \exp(-k_{obs3} \cdot t) + B \quad (4-4)$$

S entspricht dem gemessenen Signal, B dem *offset*. A_{1-3} stellen die Amplituden, k_{obs1} , k_{obs2} und k_{obs3} die Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Phasen dar.

4.3.13.3.1 Einzelsprung-Messungen

Die Rückfaltungsreaktion wurde durch eine 1:10 Verdünnung von entfaltetem Protein (22-55 μ M Protein in 6 M (ONC) bzw. 4 M (C87A/C104A-ONC) GdnHCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,5) in Rückfaltungspuffer (0-4 M GdnHCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,5) induziert. Die Entfaltungsreaktion wurde durch 11-fache Verdünnung von nativem Protein (22-55 μ M Protein in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5) in Entfaltungspuffer (100 mM Natriumacetat, 2-7 M GdnHCl, pH 5,5 oder 100 mM Glycin, 5 M GdnSCN, pH 2,0) induziert.

Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der Rückfaltungsphasen wurde die Rückfaltungsreaktion von ONC bei verschiedenen Temperaturen verfolgt. Die Daten wurden mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung angepasst (Gleichung 4-5).

$$k_{obs} = A \cdot e^{-Ea/RT} \quad (4-5)$$

A entspricht dem präexponentiellen Faktor, Ea der Aktivierungsenergie, T der Temperatur und R der idealen Gaskonstante.

4.3.13.3.2 Doppelsprung-Messungen

Um die Entstehung von Faltungszuständen als Funktion der Rückfaltungszeit zu bestimmen wurden Doppelsprungexperimente ausgehend von entfaltetem Protein durchgeführt (N-Test) (Schmid, 1983). Im ersten Mischschritt wurde die Rückfaltungsreaktion von entfaltetem Protein (132 μM ONC in 6 M GdnHCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,5) durch 11-fache Verdünnung in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 initiiert. Im zweiten Mischschritt wurde das Protein durch 6-fache Verdünnung in 100 mM Natriumacetat, 6,05 M GdnHCl, pH 5,5 wieder entfaltet. Die *delay*-Zeit zwischen dem ersten und zweiten Mischschritt wurde von 0,025-7 s variiert. Die aufgezeichneten Entfaltungskinetiken wurden einfach (Gleichung 3-13) bzw. doppelt exponentiell (Gleichung 4-3) angepasst. Die ermittelten Amplituden wurden als Funktion der *delay*-Zeit aufgetragen. Die initiale Zunahme und die darauf folgende Abnahme der Amplitude wurden jeweils mit einer einfach-exponentiellen Funktion (Gleichung 3-13) angepasst und dient dabei als Maß für die Entstehung bzw. den Zerfall des während der Rückfaltungszeit entsprechenden Faltungszustands.

Zusätzlich wurden N-Tests mit ONC und C87A/C104A-ONC unter extrem entfaltenden Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde im ersten Mischschritt die Rückfaltungsreaktion von entfaltetem Protein (132 μM Protein in 6 M GdnHCl (ONC) bzw. 4 M GdnHCl (C87A/C104A-ONC), 100 mM Natriumacetat, pH 5,5) durch 11-fache Verdünnung in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 initiiert. Nach variierenden *delay*-Zeiten (0,4-80 s) erfolgte der zweite Mischschritt in extrem entfaltende Bedingungen (100 mM Glycin, 5,5 M GdnSCN, pH 2,0). Die Entfaltungskinetik wurde aufgezeichnet und mit einer einfach-exponentiellen Funktion (Gleichung 3-13) angepasst. Die dabei ermittelten Amplituden wurden als Funktion der *delay*-Zeit aufgetragen und mit einer einfach-exponentiellen Funktion (Gleichung 3-5) angepasst. Die Zunahme der Amplitude mit der *delay*-Zeit dient als Maß für die Entstehung von nativem Protein.

Um die Entfaltungsreaktion des durch Einzelsprungmessungen (4.3.13.2.1) visualisierten schnellen Rückfaltungszustands zu untersuchen, wurde im ersten Mischschritt entfaltetes Protein (132 μM ONC in 6 M GdnHCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,5) durch 11-fache Verdünnung rückgefaltet. Im zweiten Mischschritt wurde das Protein nach einer *delay*-Zeit von 0,8 s durch 6-fache Verdünnung in 100 mM Natriumacetat, 2 - 7 M GdnHCl, pH 5,5 wieder entfaltet. Die Entfaltungskinetik wurde aufgezeichnet und als Funktion der GdnHCl-Konzentration aufgetragen.

4.3.13.4 ANS-Bindung

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von ANS an ONC wurde ANS in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5, gelöst und die Lösung filtriert. Die Konzentration an ANS wurde mit einem Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 350 nm spektroskopisch bestimmt.

Messungen im Gleichgewicht wurden an einem Fluoro-Max-2 Spektrometer bzw. Fluoro-Max-3 Spektrometer (Jobin Yvon, Bensheim) in einer 1 cm Fluoreszenzquarzglasküvette bei 20°C durchgeführt. Dabei wurden 2 μM ONC (nativ bzw. entfaltet in 5.5 M GdnHCl) mit 0-220 μM ANS für 10 h inkubiert. Die Fluoreszenzintensität bei 479 nm wurde für 60 s (120 Datenpunkte) gemessen und gemittelt. Die Anregung erfolgte bei 350 nm, die Spaltbreiten betragen je 5 nm. Als Kontrolle wurde die Fluoreszenz von 0-220 μM ANS ohne Protein unter den gleichen Bedingungen gemessen. Weiterhin wurden Fluoreszenzspektren von 220 μM ANS in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von 5 μM ONC bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen im Bereich von 400 bis 600 nm aufgezeichnet. Als Kontrollmessung wurden Fluoreszenzspektren (408 - 600 nm) von 75 μM ANS in Gegenwart von 25 μM BSA bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen aufgenommen.

Kinetische Untersuchungen erfolgten an einem SX 20 *stopped-flow*-Spektrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) bei 20°C. Die Rückfaltung von 275 μM ONC in 100 mM Natriumacetat, 5,5 M GdnHCl, pH 5,5, wurde durch 11-fache Verdünnung in 100 mM Natriumacetat, 1,1 mM ANS, pH 5,5, mittels *stopped-flow*-Mischung initiiert. Die Rückfaltungskinetik wurde bei 479 nm bzw. 515 nm aufgezeichnet. Die Anregung erfolgte bei 350 nm, die Spaltbreite betrug 10 nm. Drei bis fünf Einzelkinetiken wurden gemittelt. Als Kontrolle wurden Messungen ohne ONC bzw. ohne ANS durchgeführt. Zusätzlich wurde die Fluoreszenzintensität von 25 μM ONC, 1 mM ANS in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 bei 5,5 M GdnHCl (Anfangsbedingungen) bzw. 0,5 M GdnHCl (Endbedingungen) bei 497 nm bzw. 515 nm aufgezeichnet.

4.3.13.5 Einfluss von PPIasen auf die Rückfaltungsreaktion

Die Rückfaltung von ONC wurde in Gegenwart und Abwesenheit der PPIasen Cyclophilin 18 aus der Schweineniere bzw. *Thermus* SlyD aus *Thermus thermophilus* in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 untersucht. Dabei wurde entfaltete ONC (22 μM bzw. 55 μM in 6 M GdnHCl) durch 11-fache Verdünnung in 0-5 μM der jeweiligen PPIase in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5, mittels *stopped-flow*-Mischung zurück gefaltet. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Es wurde ein Ausschlussfilter ab

320 nm genutzt. Die Daten von drei bis fünf Einzelmessungen wurden gemittelt. Die Rückfaltungskinetiken wurden nach Gleichung 4-4 angepasst.

4.3.13.6 Reaktivierungsmessung

Während der Rückfaltungsreaktion von ONC wurde mit Hilfe des Substrats 6-Carboxyfluorescein-dArU(dA)₂-6-carboxytetramethylrhodamin die Reaktivierung von ONC untersucht. Die Rückfaltung entfalteter ONC (420 µM in 20 mM Mes/NaOH Puffer, 20 mM NaCl, und 5.5 M GdnHCl, pH 6.0) wurde durch 26-fache Verdünnung in 20 mM Mes/NaOH Puffer, 20 mM NaCl, pH 6,0, in welchem sich 100 nM Substrat befanden, mittels *stopped-flow*-Mischung initiiert. Das gespaltene Substrat gibt ein Fluoreszenzsignal, das mit einem Ausschlussfilter von 515 nm detektiert wurde. Die Anregung erfolgte bei 495 nm. Die Daten wurden durch eine Funktion bestehend aus einem exponentiellen und einem linearen Term (Gleichung 4-6) angepasst. Die Messungen erfolgten bei 10°C und wurden freundlicherweise von Dr. Ulrich Arnold, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, durchgeführt.

$$S = A_1 \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t) + m \cdot t + n \quad (4-6)$$

Dabei entspricht S dem gemessenen Signal, A₁ der Amplitude, k_{obs} der Geschwindigkeitskonstante der Reaktivierungsreaktion, m dem linearen Anstieg des voll aktiven Proteins und n dem *offset*.

4.3.14 Bestimmung der intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten

Alle ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltungsreaktionen von ONC (4.3.13.2, 4.3.13.3) wurden nach einem sequenziellen Faltungsmodell (Abb. 3-6A) angepasst. Die analytische Lösung eines sequenziellen Dreizustandfaltungsmodells ist in Gleichung 4-7 angegeben (Bachmann und Kiefhaber, 2005).

$$f(k) = k^2 - k \cdot (k_{UI} + k_{IU} + k_{IN} + k_{NI}) + (k_{UI} \cdot k_{IN} + k_{UI} \cdot k_{NI} + k_{IU} \cdot k_{NI}) = 0 \quad (4-7)$$

Die Lösung dieser Gleichung ergibt die beiden Geschwindigkeitskonstanten k₁ und k₂, mit deren Hilfe die zeitabhängige Entstehung und der Zerfall der einzelnen Faltungszustände während der Rückfaltung angegeben werden kann. Die zeitabhängigen Verläufe, ausgehend vom entfalteten Zustand (U₀ = 1, I₀ = 0 und N₀ = 0) sind in Gleichung 4-8 bis 4-10 angegeben.

$$U(t) = U_0 \cdot \left(\frac{k_{UI} \cdot (k_1 - k_{IN} - k_{NI})}{k_1 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_1 t} + \frac{k_{UI} \cdot (k_{NI} + k_{IN} - k_2)}{k_2 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_2 t} + \frac{k_{NI} \cdot k_{IU}}{k_1 \cdot k_2} \right) \quad (4-8)$$

$$I(t) = U_0 \cdot \left(\frac{k_{UI} \cdot (k_{IN} - k_1)}{k_1 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_1 t} + \frac{k_{UI} \cdot (k_2 - k_{NI})}{k_2 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_2 t} + \frac{k_{UI} \cdot k_{NI}}{k_1 \cdot k_2} \right) \quad (4-9)$$

$$N(t) = U_0 \cdot \left(\frac{k_{UI} \cdot k_{IN}}{k_1 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_1 t} + \frac{-k_{UI} \cdot k_{IN}}{k_2 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_2 t} + \frac{k_{UI} \cdot k_{IN}}{k_1 \cdot k_2} \right) \quad (4-10)$$

Für $I_0 = 1$, $U_0 = 0$ und $N_0 = 0$ ergeben sich folgende Gleichungen:

$$U(t) = I_0 \cdot \left(\frac{k_{IU} \cdot (k_{NI} - k_2)}{k_1 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_1 t} + \frac{k_{IU} \cdot (k_2 - k_{NI})}{k_2 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_2 t} + \frac{k_{NI} \cdot k_{IU}}{k_1 \cdot k_2} \right) \quad (4-11)$$

$$I(t) = I_0 \cdot \left(\frac{(k_{UI} - k_2) \cdot (k_{NI} - k_1)}{k_1 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_1 t} + \frac{(k_2 - k_{NI}) \cdot (k_{UI} - k_2)}{k_2 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_2 t} + \frac{k_{UI} \cdot k_{NI}}{k_1 \cdot k_2} \right) \quad (4-12)$$

$$N(t) = I_0 \cdot \left(\frac{k_{IN} \cdot (k_{UI} - k_1)}{k_1 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_1 t} + \frac{k_{IN} \cdot (k_2 - k_{UI})}{k_2 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot e^{-k_2 t} + \frac{k_{UI} \cdot k_{IN}}{k_1 \cdot k_2} \right) \quad (4-13)$$

Die Gleichungen ausgehend vom nativen Protein ($N_0 = 1$; $I_0 = 0$; $U_0 = 0$) entsprechen mit Änderung der entsprechenden intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten den Gleichungen ausgehend von entfaltetem Protein (Gleichungen 4-8 bis 4-10).

Die aus der Anpassung nach einem sequenziellen Modell resultierenden intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten wurden genutzt, um die Zunahme der Amplitude verschiedener Faltungszustände als Funktion der *delay*-Zeit (4.3.13.3.2) zu simulieren.

Die Anpassung der kinetischen Daten nach Gleichung 4-7 sowie die Berechnung der Zunahme der Amplituden als Funktion der Zeit wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Christian Löw (Karolinska Institut, Schweden) durchgeführt.

4.3.15 NMR-Messungen

Alle NMR-Messungen, die zur Zuordnung von ONC und zur Untersuchung der Entfaltungsreaktion von ONC dienten, wurden freundlicherweise von Frau Dr. Mrestani-Klaus (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) an einem 400 MHz-NMR-Spektrometer (Bruker Advanced 400, Rheinstetten) durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Programm FELIX-ND (PC Version, Accerys, San Diego, USA) prozessiert und ausgewertet. Alle übrigen Experimente wurden freundlicherweise von Herrn Ulrich Weininger (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt

und erfolgten an einem 600 MHz-NMR Spektrometer (Bruker Advanced 600, Rheinstetten). Die Daten wurden mittels NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) prozessiert und mit NMRView (Johnson, 2004) ausgewertet.

4.3.15.1. Zuordnung von NMR-Signalen

Zur Zuordnung der NMR-Signale nativer ONC wurden 700 μ l einer 1,7 mM ^{15}N -markierten Proteinlösung in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, die 10% D_2O und 0,02% NaN_3 enthielt, verwendet. Es wurden ein 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-, ein 3D- $^1\text{H}^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY- und ein 3D- $^1\text{H}^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-NMR-Spektrum aufgenommen und zur Auswertung genutzt. Die Zuordnung basiert auf der Zuordnung von M-1/Q1/M23L-ONC (Gorbatyuk *et al.*, 1999).

4.3.15.2. Echtzeit NMR-Messungen

4.3.15.2.1. Echtzeit-Rückfaltung

Die Untersuchung der Rückfaltungsreaktion mittels Echtzeit-NMR-Spektroskopie von ONC erfolgte bei 10°C. Die Reaktion wurde durch 10-fache Verdünnung von entfalteter ^{15}N -markierter ONC (3 mM ONC in 50 mM Natriumacetat, 6 M GdnHCl, pH 5,5) in 50 mM Natriumacetat, pH 5,5 direkt im NMR-Spektrometer mit Hilfe einer Spritze initiiert. Die Totzeit der Reaktion betrug 10 s. Während der Reaktion wurden 32 1D- ^1H -NMR Spektren aufgenommen. Die Zunahme der Signalfläche ausgewählter, nativer Signale als Funktion der Zeit wurde zur Auswertung nach Gleichung 3-13 genutzt.

4.3.15.2.2. Echtzeit-Entfaltung

Die Entfaltungsreaktion wurde bei 20°C durchgeführt und durch Lösen von lyophilisierter ^{15}N -markierter ONC in 700 μ l 50 mM Natriumacetat, 5,5 M GdnHCl, pH 5,5, initiiert. Die Konzentration an ONC betrug 1,7 mM. Die Totzeit der Messung betrug 12 min. Es wurden 40 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-NMR-Spektren aufgezeichnet. Die Zunahme bzw. Abnahme der Signalflächen mit der Zeit wurden zur Auswertung nach Gleichung 3-13 genutzt.

4.3.15.3. Untersuchung auf Reststrukturen in entfalteter ONC

Um Reststrukturen in entfalteter ONC zu detektieren, wurde ^{15}N -markierte ONC für 12 h in deuteriertem Puffer entfaltet (50 mM Natriumacetat, 6 M GdnDCl, pD 5,9) und anschließend in deuteriertem Puffer rückgefaltet (50 mM Natriumacetat,

pD 5,9). Die Konzentration an ONC betrug nach der Rückfaltung 0,5 mM. Es wurde ein 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-NMR-Spektrum aufgenommen.

4.3.15.4. Strukturaufklärung von C87A/C104A-ONC

Zur Bestimmung der Tertiärstruktur wurde ^{15}N -markierte C87A/C104A-ONC (2 mM in 50 mM Natriumphosphat pH 7,0, 10% D_2O , 0,02% NaN_3), verwendet. Zur Berechnung der Struktur wurden ein 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-, ein 3D- $^1\text{H}^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-, ein 3D- $^1\text{H}^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC- und ein 2D- $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY-NMR-Spektrum aufgenommen. Mit den erhaltenen 1874 NOEs und 132 Rückgrad-Diederwinkeln wurde die Struktur mit Hilfe der Programme ARIA (Linge *et al.*, 2003) und CNS (Brunger *et al.*, 1998) errechnet.

4.3.16 Amidprotonenaustauschexperimente

4.3.16.1. H/D-Austausch im nativen Protein

Für H/D-Austauschexperimente im nativen Zustand wurde ^{15}N -markiertes, lyophilisiertes Protein in deuteriertem Puffer (50 mM Natriumacetat, pD 5,9 bzw. 50 mM Natriumphosphat pD 7,4 bzw. 8,6) zu 0,5 mM gelöst. Es wurden 55 2D- $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren über drei Tage bei 20°C bzw. 25°C aufgezeichnet. Die Abnahme der Signale im NMR-Spektrum wurde als Funktion der Zeit aufgetragen und mit einer einfach-exponentiellen Funktion (Gleichung 3-13) angepasst. Die so ermittelte Geschwindigkeitskonstante des Austauschs wurde zur Berechnung des Schutzfaktors (3.5.2.3) verwendet.

4.3.16.2. Quenched-flow-Messungen

Alle *quenched-flow*-Messungen wurden bei 20°C an einer *rapid-mixing*-Einheit (Bio Logic, Claix, Frankreich) durchgeführt. Im ersten Mischschritt wurde die Rückfaltung von entfalteter, protonierter ^{15}N -markierter ONC (2 mM in 100 mM Natriumacetat, 6 M GdnHCl, pH 5,5) durch 8-fache Verdünnung in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5, initiiert. Nach definierten Rückfaltungszeiten (0,06-5 s) wurde die Proteinlösung im zweiten Mischschritt 10-fach in deuteriertem Puffer verdünnt (200 mM Glycin, 0,667 M GdnDCl, pD 11, 100% D_2O), um den H/D-Austausch zu initiieren. Nach 8,3 ms wurde der H/D-Austausch durch Senkung des pH Wertes gestoppt (*quench*), indem die Lösung im dritten Mischschritt in 10 M Essigsäure (in D_2O), 0,667 M GdnDCl, zweifach verdünnt wurde. Nach diesem Mischschritt lag in der Mischzelle ein pD-Wert von 2,4 vor. Es wurden pro *delay*-Zeit 10 Schüsse durchgeführt, wobei der jeweils erste Schuss verworfen wurde. Die Lösung wurde mittels Vivaspin-Konzentratoren (Sigma-Aldrich, Steinheim) auf 500 μl einer ca. 0,3 mM Proteinlösung konzentriert und dabei in deuterierten Puffer (50 mM Natriumacetat,

pD 5,9, 100% D₂O) überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie unter 4.3.8 beschrieben. Der Deuterierungsgrad jeder Probe wurde mit Hilfe eines 2D-¹H¹⁵N-HSQC-NMR-Spektrums bestimmt.

Als Referenz diente eine Probe, die wie oben beschrieben behandelt wurde, jedoch wurden für die Durchführung nur protonierte Pufferlösungen verwendet.

Der Schutz eines jeweiligen Aminosäurerestes wurde durch Integration der Signalfläche aus dem 2D-¹H¹⁵N-HSQC-NMR-Spektrum im Vergleich zur Referenz berechnet. Die Werte der einzelnen Proben wurden um die jeweilige Konzentration korrigiert und als Funktion der *delay*-Zeit aufgetragen.

Nur Aminosäurereste, die im nativen Zustand keinen H/D-Austausch über drei Tage zeigten (4.3.16.1), wurden zur Auswertung genutzt.

4.3.16.3. H/H-Austausch im nativen Protein (New MEXICO)

Schnelle Austauschreaktionen wurden mit Hilfe der New MEXICO-Methode (3.5.2.3) verfolgt. Die Experimente wurden in 50 mM Natriumphosphat, 10% D₂O, pH 7,0 bzw. pH 8,2, mit 1 mM ¹⁵N-markiertem Protein bei 25°C an einem Bruker Avance II 600 NMR-Spektrometer durchgeführt. Die Fläche der Kreuzsignale aus den 2D-¹H¹⁵N-HSQC-NMR-Spektren wurde integriert und als Funktion der Austauschzeit aufgetragen. Die Zunahme des Signals mit der Zeit wurde mit einer einfach-exponentiellen Funktion (Gleichung 3-13) angepasst. Aus der so ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Austauschreaktion wurde wie unter 3.5.2.3 beschrieben der Schutzfaktor jeder Aminosäure berechnet.

4.3.17 Kristallisation

Für die Kristallisationsansätze wurde lyophilisierte C87A/C104A-ONC in ddH₂O gelöst (10, 20 bzw. 30 mg/ml) und in einem 1:1-Verhältnis mit der Reservoirlösung nach der Dampfdiffusionsmethode mit hängendem Tropfen angesetzt.

Zunächst wurden 24-*well*-Platten (*EasyXtal*, Qiagen, Hilden) mit 500 µl Reservoirlösung in Anlehnung an Merlino *et al.* (2005) in 100 mM Natriumacetat, pH 4,5, 0,2 M LiSO₄, 25% PEG 8000 bei 20°C angesetzt. Die Tropfengröße betrug 4 µl. Die Platten wurden regelmäßig mit Hilfe eines Leica Mikroskops (Leica, Bonn) auf Kristallbildung untersucht.

Parallel erfolgten Ansätze in 96-*well*-Platten (*Crystal Quick 96 well*, Greiner, Frickenhausen) mit Hilfe eines Pipettierroboters (Zinsser Analytic, Cartesian, USA) bei 4°C. Es wurden 110 µl Basis Kristallisationspuffer von Sigma (Buchs, Schweiz), Hampton (Aliso Vieje, USA) oder Jena Bioscience (Jena) als Reservoirlösung verwendet. Die Tropfengröße betrug 0,6 µl. Die Platten wurden regelmäßig mit Hilfe des

Oasis Imager (Veeco, Mannheim) auf Kristalle untersucht. Es wurden bereits nach 3 Tagen vermehrt Kristalle in verschiedenen Pufferlösungen sichtbar. Zur röntgenkristallographischen Untersuchung wurde ein Kristall, der in 0,2 M Ammoniumsulfat, 30% PEG 4000 (Basispuffer 80677 Sigma) wuchs, verwendet.

Der Kristall wurde in einem flüssigen Stickstoffstrahl bei -180°C an einem Röntgen-generator mit Kupferdrehanode (MicroMax 007, RigakuMSC, Tokio, Japan) und R-Axis IV++ Detektor (RikaguMSC, Tokio, Japan) vermessen. Als Gefrierschutzmittel diente der Kristallisationspuffer mit Zusatz von 5% Glycerol. Die Datensätze wurden als eine Serie von Rotationsaufnahmen mit einem Drehwinkel von $0,5^{\circ}$ aufgenommen. Für jede Einzelaufnahme wurde der Kristall 1 bis 2 min belichtet. Die Kristallstruktur wurde mit dem Programm PHASER (McCoy *et al.*, 2005) über die Methode des molekularen Ersatzes ermittelt, wobei die Kristallstruktur von ONC als Grundlage diente (PDB: 1ONC) (Mosimann *et al.*, 1994). Die Struktur von C87A/C104A-ONC wurde mit Hilfe des Programms COOT (Emsley und Cowtan, 2004) abgesichert und mit Hilfe von PHENIX (Adams *et al.*, 2002) verfeinert. Die Stereochemie der endgültigen Struktur wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft. Die Auswertung der Datensätze sowie die Strukturauflösung erfolgten freundlicherweise durch Herrn Dr. Piotr Neumann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).

5 Ergebnisse

5.1 Kinetische Phasen in der Faltung von Onconase

5.1.1 Indizien für einen komplexen Faltungsprozess

Da ONC ein sehr kleines, kompaktes und monomeres Protein ist, welches keine Cofaktoren benötigt und im nativen Zustand nur Peptidyl-prolyl-Bindungen in *trans*-Konformation aufweist, konnte zunächst von einem einfachen Faltungsverhalten dieses Proteins ausgegangen werden.

Als Grundlage für die Studien zur Faltung von ONC diene ein Chevron-Plot, welcher über manuelle Mischungsexperimente mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelt wurde (Schulenburg, 2005, Arnold *et al.*, 2006). Die Daten weisen einen Zweizustandscharakter auf und können über Gleichung 3-15 angepasst werden. Auch GdnHCl- und Temperatur-induzierte Übergangskurven von ONC zeigen einen Zweizustandscharakter (Arnold *et al.*, 2006). Jedoch weicht die Summe der Beträge der Anstiege des Rück- und Entfaltungsastes aus dem Chevron-Plot deutlich von dem Anstieg der aus Gleichgewichtsmessungen bestimmten Übergangskurve ab (Schulenburg, 2005). Weiterhin knickt der Rückfaltungsast bei Messungen in Gegenwart niedriger GdnHCl-Konzentrationen (0-2M GdnHCl) ab. Da dieses als *rollover* bezeichnete Phänomen auf den Einfluss zusätzlicher Faltungsereignisse hinweist (Horng *et al.*, 2005), wurde die Faltung von ONC mit Hilfe von schnellen Mischtechniken genauer untersucht.

5.1.2 Analyse der Faltungskinetik mit *stopped-flow*-

Fluoreszenzspektroskopie

Um die Faltung von ONC auf das Vorhandensein von zusätzlichen, schnellen Faltungsereignissen zu untersuchen, wurden die Rück- und Entfaltungsreaktion bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen mittels *stopped-flow*-Mischung initiiert und fluoreszenzspektroskopisch verfolgt (4.3.13.3). Während der Rückfaltungsreaktion wurden in Abhängigkeit von der eingesetzten [D] bis zu drei Faltungsphasen detektiert (Abb. 5-1A), deren Geschwindigkeitskonstanten sich bei 0 M GdnHCl um jeweils mindestens einen Faktor von zehn voneinander unterscheiden. Die Geschwindigkeitskonstanten der so genannten schnellen ($k_{\text{fast}}^{\text{F}}$), mittelschnellen ($k_{\text{medium}}^{\text{F}}$) und langsamen ($k_{\text{slow}}^{\text{F}}$) Rückfaltungsphase betragen bei 0 M GdnHCl

5. Ergebnisse

$k_{\text{fast}}^{\text{F}} = 13,6 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{medium}}^{\text{F}} = 0,49 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{slow}}^{\text{F}} = 0,034 \pm 0,007 \text{ s}^{-1}$. Das Vorhandensein von drei Faltungsphasen deutet auf die Existenz verschiedener Faltungszustände während der Faltung von ONC hin.

Im Gegensatz dazu wurden bei der Untersuchung der Entfaltungsreaktion mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie keine weiteren Faltungsphasen sichtbar. Alle Entfaltungskinetiken konnten mit einer einfach-exponentiellen Funktion ausreichend beschrieben werden (Abb. 5-1B). Die so bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion ($k_{\text{slow}}^{\text{U}}$) entsprechen den über manuelle Mischung bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion von ONC (Schulenburg, 2005) bei entsprechender GdnHCl-Konzentration. Auch eine Anpassung der *stopped-flow*-Daten mit einer festgesetzten Geschwindigkeitskonstante aus manuellen Mischungsexperimenten (Schulenburg, 2005), beschreibt die Kurven hinreichend. Somit sind während der Entfaltungsreaktion von ONC keine weiteren Faltungszustände mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie im Einzelsprung detektierbar.

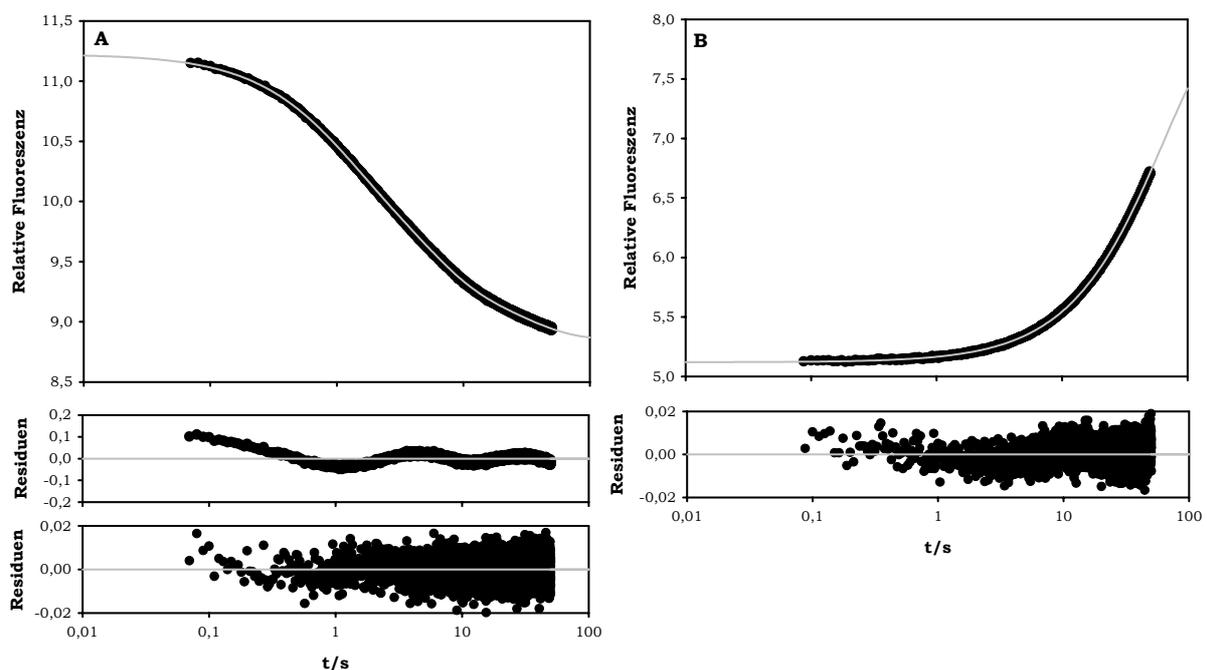


Abb. 5-1: Rück- (A) und Entfaltungskinetik (B) von ONC

Die Reaktionen wurden mittels *stopped-flow*-Mischung initiiert. A: Anpassung der Rückfaltungsreaktion (100 mM Natriumacetat, 1,3 M GdnHCl, pH 5,5) mit einer dreifach-exponentielle Funktion. Die Residuen einer doppelt- und dreifach-exponentiellen Anpassung sind in der mittleren bzw. unteren Grafik dargestellt. B: Anpassung der Entfaltungskinetik (100 mM Natriumacetat, 5,9 M GdnHCl, pH 5,5) mit einer einfach-exponentiellen Funktion. Die entsprechenden Residuen sind dargestellt.

5. Ergebnisse

In dem in Abb. 5-2 gezeigten Chevron-Plot sind die über manuelle (Schulenburg, 2005, Arnold, 2006) und *stopped-flow*-Mischung bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltungsreaktionen zusammengefasst.

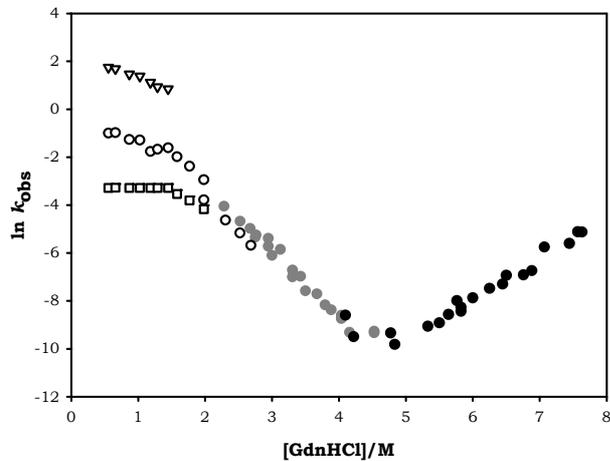


Abb. 5-2: Geschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltungsreaktionen von ONC als Funktion der GdnHCl-Konzentration.

Die Symbole ∇ , \circ und \square zeigen die bei *stopped-flow*-Mischung beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k^F_{fast} , k^F_{medium} und k^F_{slow} . Die Symbole \bullet und \bullet zeigen die Geschwindigkeitskonstanten der über manuelle Mischung detektierbaren Rück- und Entfaltungsreaktion.

Sowohl k^F_{slow} als auch k^F_{medium} münden in die mittels manueller Mischung bestimmte Rückfaltungsphase. Da k^F_{slow} im Gegensatz zu k^F_{medium} und k^F_{fast} eine deutlich geringere Abhängigkeit von $[D]$ zeigt, ist k^F_{slow} in Gegenwart höherer $[D]$ größer als k^F_{medium} und somit nicht mehr detektierbar. Daher beschreiben k^F_{medium} und die über manuelle Mischung detektierte Rückfaltungsphase den gleichen Faltungsprozess.

Die Amplituden von Faltungsphasen erteilen Informationen hinsichtlich der Populierung der während der Faltung auftretenden Zustände. In Abb. 5-3 sind die Amplituden der drei während der Rückfaltungsreaktion von ONC auftretenden Rückfaltungsphasen als Funktion von $[D]$ dargestellt.

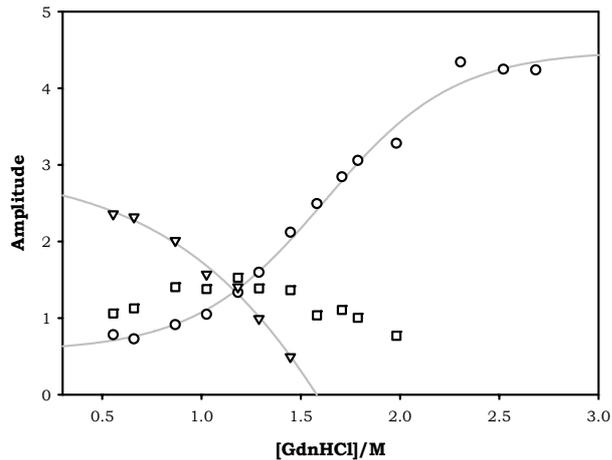


Abb. 5-3: Amplituden der drei Rückfaltungsphasen von ONC als Funktion der GdnHCl-Konzentration.

Es sind die Amplituden der schnellen (▽), mittelschnellen (○) und langsamen (□) Rückfaltungsphase dargestellt. Die grauen Linien dienen zur Veranschaulichung.

Die relative Amplitude der mittelschnellen Rückfaltungsreaktion nimmt mit steigender [D] zu, während die Amplitude der schnellen Rückfaltungsreaktion mit steigender [D] abnimmt, bis sie ab ca. 1,5 M GdnHCl nicht mehr bestimmbar ist. Somit wird der mit $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ gebildete Zustand ab 1,5 M GdnHCl nicht mehr ausreichend stark populiert um detektierbar zu sein. Die Amplitude der langsamen Rückfaltungsreaktion ist weitgehend unabhängig von der [D] und beträgt zwischen 20 und 30% der Gesamtamplitude.

5.2 Zuordnung der kinetischen Faltungsphasen zu Faltungseignissen

5.2.1 ANS-Bindungsstudien

ANS ist ein hydrophober Farbstoff, welcher nach Bindung an hydrophobe Bereiche von Proteinen seine Fluoreszenzeigenschaften ändert, indem sich das Maximum des Fluoreszenzemissionsspektrums von 515 auf 479 nm verschiebt und die Fluoreszenzintensität stark zunimmt. Um zu unterscheiden, ob die mittels Fluoreszenzspektroskopie detektierten Faltungsphasen lokale oder globale Ereignisse beschreiben, wurde die Rückfaltungsreaktion von ONC in Gegenwart von ANS verfolgt.

Um Informationen über an der Oberfläche exponierte hydrophobe Bereiche in N_{ONC} und U_{ONC} zu erhalten, wurde zunächst das Bindungsverhalten von ANS an N_{ONC} und U_{ONC} wie unter 4.3.13.4 beschrieben untersucht. In Abb. 5-4 sind die Fluoreszenzspektren von N_{ONC} und U_{ONC} mit bzw. ohne ANS dargestellt.

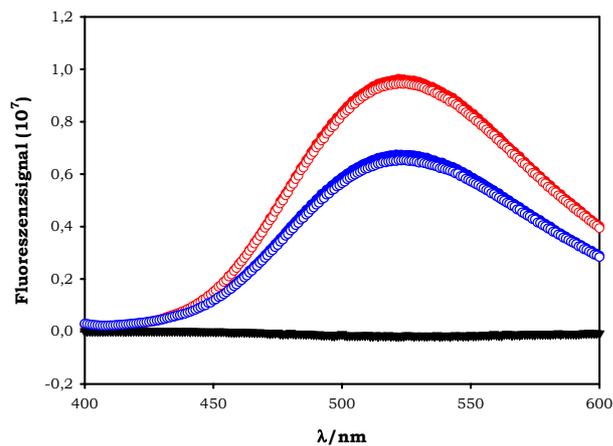


Abb. 5-4: Bindungsverhalten von ANS an ONC.

Die Fluoreszenzspektren wurden in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 aufgenommen. Es sind das Spektrum von ANS in 5,5 M GdnHCl (●), das Spektrum von ANS und ONC in 5,5 M GdnHCl (U_{ONC} , ○), das Spektrum von ANS in 0,5 M GdnHCl (●), das Spektrum von ANS und ONC in 0,5 M GdnHCl (N_{ONC} , ○) sowie das Spektrum von ONC (▼) gezeigt.

Da die Fluoreszenzspektren von ANS sowohl in Gegenwart von N_{ONC} als auch von U_{ONC} mit den Spektren von freiem ANS vergleichbar sind, wird deutlich, dass ANS im Gleichgewicht weder an N_{ONC} noch an U_{ONC} bindet. Durch Titrationsexperimente wurde sichergestellt, dass auch in Gegenwart hoher ANS-Konzentrationen keine Bindung stattfindet (Anhang 1).

Dennoch wurde die Rückfaltungsreaktion von ONC in Gegenwart von ANS fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. In Abb. 5-5 ist die Rückfaltungsreaktion von ONC in Gegenwart und in Abwesenheit von ANS bei 479 nm, sowie die Verdünnung von ANS unter den gleichen Bedingungen abgebildet. Weiterhin sind die Fluoreszenzintensitäten des Gemischs aus ONC und ANS unter Anfangs- (5,5 M GdnHCl) bzw. Endbedingungen (0,5 M GdnHCl) der Rückfaltungsreaktion im Gleichgewicht dargestellt.

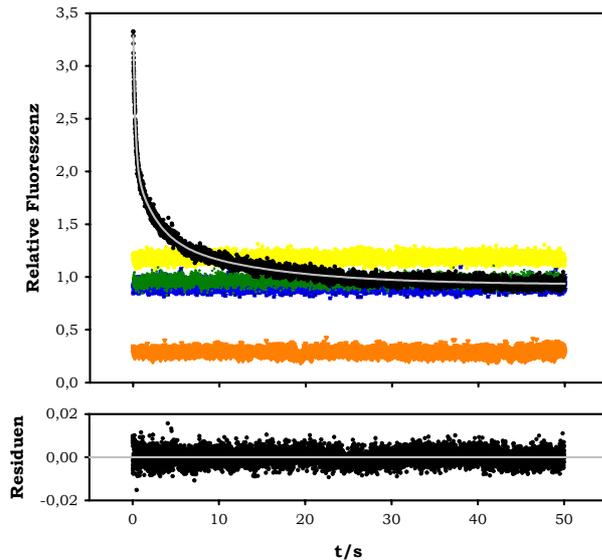


Abb. 5-5: ANS-Bindungsstudien.

Die Rückfaltungskinetik von ONC in Gegenwart von ANS (●) wurde mit einer dreifach-exponentiellen Funktion angepasst. Die untere Abbildung zeigt die entsprechenden Residuen. Kontrollen: ONC ohne ANS (▼), ANS ohne ONC (▼), ONC und ANS nach Gleichgewichtseinstellung bei 5,5 M GdnHCl (Anfangsbedingungen, ▼) und 0,5 M GdnHCl (Endbedingungen, ▼).

Sowohl ONC als auch ANS weisen während der Rückfaltungsreaktion keine Änderung des Fluoreszenzsignals bei 479 nm auf (Abb. 5-5). Jedoch sinkt während der Rückfaltungsreaktion von ONC in Gegenwart von ANS das Fluoreszenzsignal auf das Niveau von ONC und ANS unter Endbedingungen ab. Diese Kinetik kann mit einer dreifach-exponentiellen Funktion ($k_{\text{fast (ANS)}}^{\text{F}} = 4,23 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{medium (ANS)}}^{\text{F}} = 0,425 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{slow (ANS)}}^{\text{F}} = 0,079 \pm 0,008 \text{ s}^{-1}$) angepasst werden. Die Geschwindigkeitskonstanten der drei Phasen stimmen mit den Geschwindigkeitskonstanten der drei Rückfaltungsphasen von ONC bei entsprechender GdnHCl-Konzentration überein ($k_{\text{ast}}^{\text{F}} = 4,34 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{medium}}^{\text{F}} = 0,458 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{slow}}^{\text{F}} = 0,079 \pm 0,010 \text{ s}^{-1}$ bei 0,5 M GdnHCl (5.1.1)). Demzufolge beeinflusst die Bindung von ANS nicht die Rückfaltungsreaktion von ONC. Weiterhin kann somit auch gezeigt werden, dass die mittels Fluoreszenzspektroskopie detektierten Rückfaltungsphasen von ONC globale Ereignisse beschreiben.

Die Abnahme des Fluoreszenzsignals ist in der Ablösung von ANS von ONC begründet. Die Abnahme des Signals mit drei Phasen zeigt, dass die drei Faltungszustände sich in ihrer Hydrophobizität unterscheiden.

Weiterhin wird deutlich, dass bei der Rückfaltungsreaktion von ONC in Gegenwart von ANS das Anfangssignal gegenüber dem Fluoreszenzsignal des Gemisches von ONC und ANS unter Anfangsbedingungen stark erhöht ist. Somit bindet ANS während der Totzeit der *stopped-flow*-Messung an ONC. Dies kann auf das Vorhandensein eines während der Totzeit der *stopped-flow*-Apparatur auftretenden

hydrophoben Faltungsintermediats oder auf die Bindung von ANS an U_{ONC} unter nativen Bedingungen zurück zu führen sein.

ANS bindet sowohl an natives, als auch an entfaltetes Rinderserumalbumin (BSA) (Peters, 1996). Durch Messungen des Bindungsverhaltens von ANS an BSA bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen (Anhang 2) wurde deutlich, dass ANS in Gegenwart erhöhter GdnHCl-Konzentrationen nicht binden kann. Das erhöhte Anfangsfluoreszenzsignal wird somit nicht von einem während der Totzeit gebildeten, stark hydrophoben Intermediat hervorgerufen, sondern ist auf die Bindung von ANS an U_{ONC} unter nativen Bedingungen zurück zu führen.

5.2.2 Einfluss von PPIasen auf die Rückfaltungsreaktion

Im nativen Zustand enthält U_{ONC} ausschließlich Peptidyl-prolyl-Bindungen in *trans*-Konformation (3.6). Dennoch liegen im entfalteten Zustand von Proteinen zwischen 10 und 30% der Peptidyl-prolyl-Bindungen in *cis*-Konformation vor (3.3), welche isomerisieren müssen um die *trans*-Konformation anzunehmen. Die Amplitude von $k_{\text{slow}}^{\text{F}}$ beträgt zwischen 20 und 30% der Gesamtamplitude (5.1.1) und könnte somit durch eine Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung von im entfalteten Zustand in *cis*-Konformation vorliegenden Peptidyl-prolyl-Bindungen verursacht sein. Weiterhin ist $k_{\text{slow}}^{\text{F}}$ vergleichbar zur Geschwindigkeit einer Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktionen ($k_{\text{slow}}^{\text{F}} = 0,034 \pm 0,007 \text{ s}^{-1}$ bei 0 M GdnHCl).

Da bei Durchlaufen einer Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktion PPIasen die Rückfaltungsreaktion beschleunigen sollten, wurde die Rückfaltungsreaktion von U_{ONC} in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der PPIasen Cyclophilin 18 bzw. *Thermus* SlyD untersucht. Cyclophilin 18 katalysiert die Rückfaltungsreaktion $U_{\text{S}^{\text{I}}}$ von RNase A (Fischer und Bang, 1985) und *Thermus* SlyD die Rückfaltungsreaktion von RNase T1 (Dr. Christian Löw, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, persönliche Mitteilung). In Abb. 5-6 ist exemplarisch die Rückfaltungsreaktion von U_{ONC} in Gegenwart und Abwesenheit von Cyclophilin 18 dargestellt.

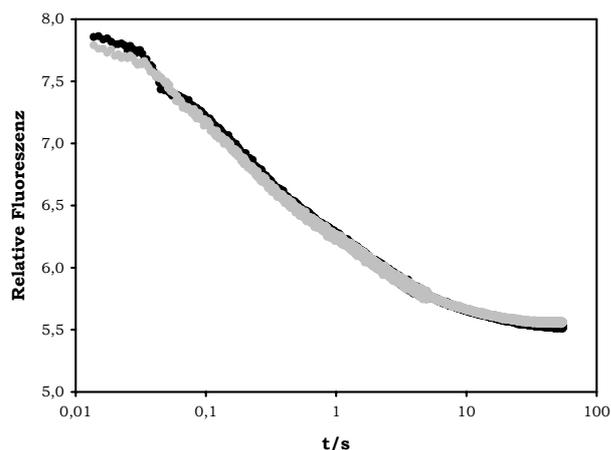


Abb. 5-6: Rückfaltungsreaktion von ONC in Gegenwart und Abwesenheit der PPIase Cyclophilin 18.

Rückfaltungsreaktion von 2 μM ONC in Abwesenheit (schwarz), bzw. in Gegenwart von 2 μM Cyclophilin 18 (grau).

Obwohl beide PPIasen unter den genutzten Bedingungen katalytische Aktivität aufweisen (Daten nicht gezeigt), ist unabhängig von der eingesetzten Konzentration an PPIase kein Einfluss auf die Rückfaltungsreaktion von ONC zu beobachten.

Aus diesen Experimenten folgt, dass entweder keine der drei Rückfaltungsphasen von ONC durch die Isomerisierung einer Peptidyl-prolyl-Bindung verursacht wird, oder ONC für beide genutzten PPIasen kein Substrat darstellt.

5.2.3 Untersuchung der Rückfaltung mittels

Echtzeit-NMR-Spektroskopie

Um weitere Informationen über die Rückfaltung von ONC zu erhalten, wurde diese auf Aminosäureebene mittels Echtzeit-NMR-Spektroskopie untersucht. Unter den in 4.3.15.2.1 beschriebenen Bedingungen (0,6 M GdnHCl) ist $k_{\text{slow}}^{\text{F}} = (0,026 \pm 0,012) \text{ s}^{-1}$ und somit langsam genug, um mittels Echtzeit-NMR-Spektroskopie untersucht werden zu können. Die Rückfaltungsreaktion von ONC wurde durch die Aufnahme von 1D-NMR-Spektren verfolgt.

Zur Auswertung wurden nur NMR-Signale verwendet, welche ausschließlich von N_{ONC} resultieren (Amidprotonensignale mit einer chemischen Verschiebung über 8,5 ppm bzw. Seitenkettensignale unter 1 ppm). In Abb. 5-7 ist der Bereich zwischen 0,5 und -2 ppm verschiedener 1D-NMR-Spektren als Funktion der Rückfaltungszeit dargestellt.

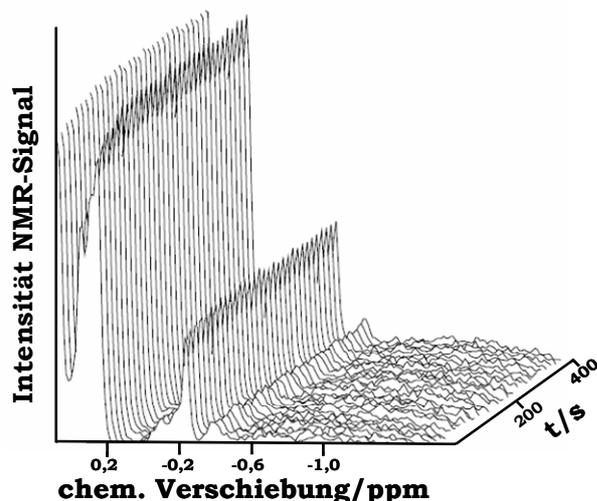


Abb. 5-7: Ausschnitt aus 1D-NMR-Spektren der Rückfaltungsreaktion von ONC als Funktion der Rückfaltungszeit.

Die von N_{ONC} verursachten Signalfächen wurden integriert und als Funktion der Rückfaltungszeit aufgetragen (Abb. 5-8). Alle Signale in den ausgewählten Bereichen zeigen vergleichbare Kurvenverläufe. Abb. 5-8 repräsentiert die Zunahme an nativem Signal bei 0,22 ppm (Abb. 5-7).

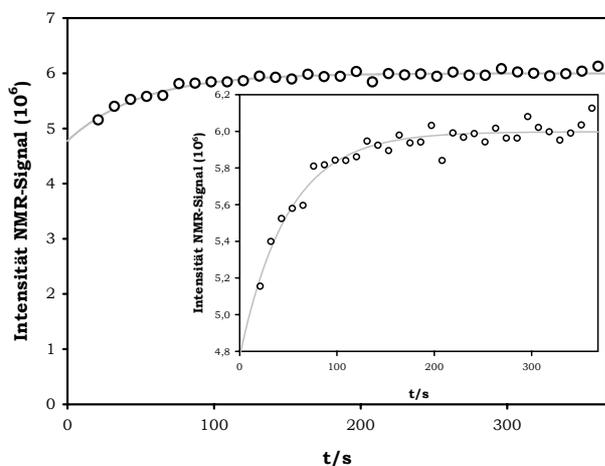


Abb. 5-8: Mittels Echtzeit-NMR-Spektroskopie bestimmte Rückfaltungsgeschwindigkeit.

Die Zunahme des nativen NMR-Signals bei 0,22 ppm ist dargestellt. Die Einfügung zeigt die gleichen Daten mit vergrößerter Ordinate. Die graue Linie entspricht der Anpassung der Daten mit einer einfach-exponentiellen Funktion. Die so ermittelte Geschwindigkeitskonstante beträgt $(0,021 \pm 0,010) \text{ s}^{-1}$.

Die Zunahme an Signal wurde mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion ($(0,021 \pm 0,010) \text{ s}^{-1}$) entspricht der mit Fluoreszenzspektroskopie gemessenen langsamen Rückfaltungsphase unter vergleichbaren Bedingungen ($k_{\text{slow}}^{\text{F}} = 0,026 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$).

Da während der Totzeit der Reaktion bereits $78,3 \pm 2,8\%$ an nativem Signal entstehen (Abb. 5-8), ist anzunehmen dass während der Totzeit bereits $78,3 \pm 2,8\%$ der Moleküle zu N_{ONC} zurückfalten. Die verbleibenden 21,7% der Moleküle müssen demnach zunächst $k^{\text{F}_{\text{slow}}}$ durchlaufen, bevor sie N_{ONC} erreichen. Während der durch $k^{\text{F}_{\text{slow}}}$ beschriebenen Rückfaltungsphase könnten Moleküle mit einer oder mehreren Peptidyl-prolyl-Bindungen in nicht-nativer Konformation zunächst isomerisieren und dann in den nativen Zustand weiterfalten. Da das erste, nach 10 s aufgenommene, Spektrum bereits natives Protein zeigt (Anhang 3), ist anzunehmen, dass die Isomerisierungsreaktion im entfalteten Zustand stattfindet.

5.2.4 Temperaturabhängigkeit der Rückfaltungsreaktion

Die drei Rückfaltungsreaktionen von ONC wurden bei verschiedenen Temperaturen (4.3.13.3.1) verfolgt. Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten sind in Abb. 5-9 als Arrhenius-Auftragung dargestellt.

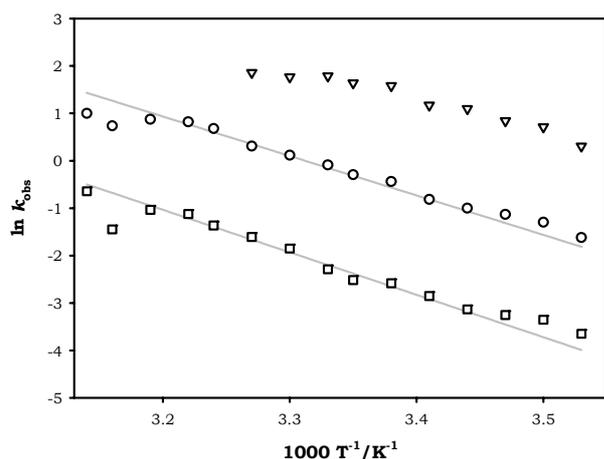


Abb. 5-9: Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltungsreaktionen von ONC.

Es sind $k^{\text{F}_{\text{slow}}}$ (\square), $k^{\text{F}_{\text{medium}}}$ (\circ) und $k^{\text{F}_{\text{fast}}}$ (∇) als Funktion der Temperatur dargestellt. Die grauen Linien stellen die Anpassung von $k^{\text{F}_{\text{medium}}}$ und $k^{\text{F}_{\text{slow}}}$ an die Arrhenius-Gleichung (Gleichung 4-9) dar.

Sowohl $k^{\text{F}_{\text{slow}}}$ als auch $k^{\text{F}_{\text{medium}}}$ und $k^{\text{F}_{\text{fast}}}$ zeigen eine deutliche Temperaturabhängigkeit. Nach der Arrhenius-Gleichung (Gleichung 4-5) ergibt sich für $k^{\text{F}_{\text{medium}}}$ eine Aktivierungsenergie von $(69,35 \pm 0,1) \text{ kJ mol}^{-1}$ und für $k^{\text{F}_{\text{slow}}}$ eine Aktivierungsenergie von $(74,5 \pm 0,2) \text{ kJ mol}^{-1}$. $k^{\text{F}_{\text{fast}}}$ konnte nicht ausreichend durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben werden. Da die Aktivierungsenergie von $k^{\text{F}_{\text{slow}}}$ im Bereich der Aktivierungsenergie einer Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktion liegt (Bhat *et al.*, 2003), kann davon ausgegangen werden, dass die durch $k^{\text{F}_{\text{slow}}}$ bezeichnete Reaktion eine Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktion darstellt.

5.2.5 Bildung von nativem Protein während der Rückfaltung

Mit Hilfe des N-Tests (4.3.13.3.2) können Aussagen dazu gemacht werden, welche der drei Rückfaltungsphasen von ONC zu nativem Protein führt. Da $k_{\text{slow}}^{\text{U}}$ (5.1.2) mit $(1,34 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ in 5,5 M GdnHCl zu langsam ist um die Reaktion vollständig mittels *stopped-flow*-Technik verfolgen zu können, wurden Entfaltungsexperimente unter extrem destabilisierenden Bedingungen durchgeführt.

Die Entfaltungskinetik von ONC ist in 100 mM Glycin, 5,5 M GdnSCN, pH 2, vollständig detektierbar. Sie konnte mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst werden. Die Geschwindigkeitskonstante beträgt $k_{\text{slow}}^{\text{U}} = (1,73 \pm 0,01) \text{ s}^{-1}$.

Basierend auf dieser Messung wurden Doppelsprungexperimente, ausgehend von U_{ONC} durchgeführt. Im ersten Mischschritt wurde U_{ONC} in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 rückgefaltet. Im zweiten Mischschritt wurde die Entfaltungsreaktion in 100 mM Glycin, 5,5 M GdnSCN, pH 2 initiiert. Die Entfaltungskinetiken konnten mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst werden. Die so ermittelte Geschwindigkeitskonstante der Entfaltungsreaktion ($k = (1,79 \pm 0,12) \text{ s}^{-1}$) stimmt mit $k_{\text{slow}}^{\text{U}}$ unter vergleichbaren Bedingungen (s.o.) überein. Somit stellt die über Doppelsprungexperimente detektierte Reaktion die Entfaltungsreaktion von nativem Protein dar.

Da der erste Mischschritt in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 erfolgt, entspricht die Zunahme der Amplitude von $k_{\text{slow}}^{\text{U}}$ als Funktion der eingesetzten *delay*-Zeit der Bildung von N_{ONC} in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 (Abb. 5-10).

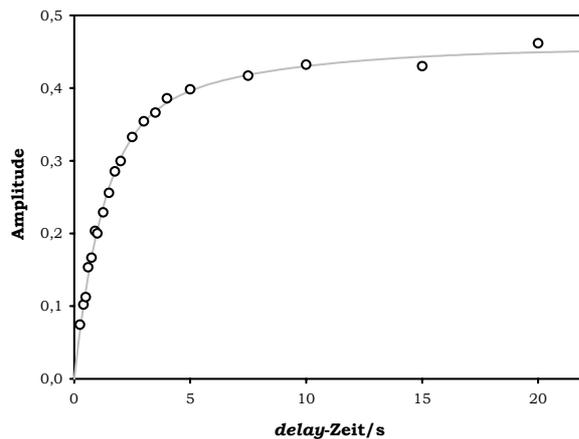


Abb. 5-10: Amplituden der über den N-Test ermittelten Entfaltungsphase unter extrem destabilisierenden Bedingungen als Funktion der *delay-Zeit*.

Die Amplitude der von $k_{\text{slow}}^{\text{U}}$ beschriebenen Reaktion (○) ist als Funktion der *delay-Zeit* zwischen dem ersten und zweiten Mischschritt dargestellt. Die Linie entspricht einer einfach-exponentiellen Anpassung der Daten mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $(0,54 \pm 0,08) \text{ s}^{-1}$ und repräsentiert die Bildung von N_{ONC} .

Die Zunahme der Amplitude als Funktion der *delay-Zeit* wurde mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst. N_{ONC} wird somit mit einer Geschwindigkeitskonstante von $(0,54 \pm 0,08) \text{ s}^{-1}$ gebildet. Diese Geschwindigkeitskonstante stimmt mit $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ unter vergleichbaren Bedingungen ($k_{\text{medium}}^{\text{F}} = (0,48 \pm 0,01) \text{ s}^{-1}$) überein. Somit ist gezeigt, dass die mittelschnelle Rückfaltungsphase, welche durch $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ beschrieben wird, zur Bildung von N_{ONC} führt.

5.2.6 Reaktivierungsmessung

Um herauszufinden welche der drei Rückfaltungsphasen von ONC zu aktivem Protein führen, wurden Reaktivierungsmessungen wie unter 4.3.13.6 beschrieben durchgeführt. ONC weist in Gegenwart von 5,5 M GdnHCl keine messbare Aktivität auf (Daten nicht gezeigt). Die Rückfaltungsreaktion von ONC wurde in Gegenwart eines Substrates verfolgt, das nach seiner Spaltung ein Fluoreszenzsignal gibt. Unter den gewählten Messbedingungen zeigt ONC kein Fluoreszenzsignal, weshalb die Zunahme des Fluoreszenzsignals ausschließlich auf die Bildung des fluorogenen Produkts zurück zu führen ist (Abb. 5-11).

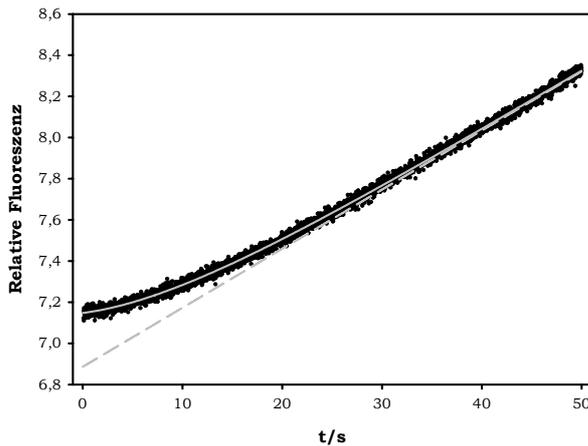


Abb. 5-11:Reaktivierungsreaktion von ONC.

Die Reaktivierung von ONC ($420 \mu\text{M}$) wurde mit Hilfe von 100 nM des fluorogenen Substrats 6-Carboxy-fluorescein-dArU(dA)₂-carboxytetra-methylrhodamin bei 10°C verfolgt. Die Daten wurden durch die Summe einer einfach-exponentiellen und einer linearen Funktion angepasst (graue Linie). Die gestrichelte graue Linie stellt eine Verlängerung des linearen Anteils dar.

Die Reaktivierungskurve wurde durch die Summe einer einfach-exponentiellen und einer linearen Funktion (Gleichung 4-6) angepasst. Der lineare Anteil der Kurve entspricht der Aktivität der reaktivierten ONC, während der exponentielle Anteil die Reaktivierungsreaktion beschreibt. Aus dem einfach-exponentiellen Teil der Funktion ergibt sich eine Geschwindigkeitskonstante für die Reaktivierung von $(0,093 \pm 0,009) \text{ s}^{-1}$, die gut mit der Geschwindigkeit der mittelschnellen Rückfaltungsphase bei 10°C ($k_{\text{medium}}^{\text{F}} = (0,109 \pm 0,010) \text{ s}^{-1}$) übereinstimmt. Daraus kann abgeleitet werden, dass $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ zu aktivem Protein führt.

5.2.7 Untersuchung von $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ mit Hilfe von Doppelsprungexperimenten

5.2.7.1. Entstehung und Zerfall des mit $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ gebildeten Zustands

Um Informationen zur Entstehung und zum Zerfall des mit $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ gebildeten Zustands zu erhalten, wurden wie unter 4.3.13.3.2 beschrieben Doppelsprungexperimente mit variierenden *delay*-Zeiten durchgeführt. Dafür wurde U_{ONC} für verschiedene *delay*-Zeiten rückgefaltet und anschließend in $6,05 \text{ M GdnHCl}$ entfaltet. Ausgewählte Entfaltungskinetiken sind in Abb. 5-12 dargestellt.

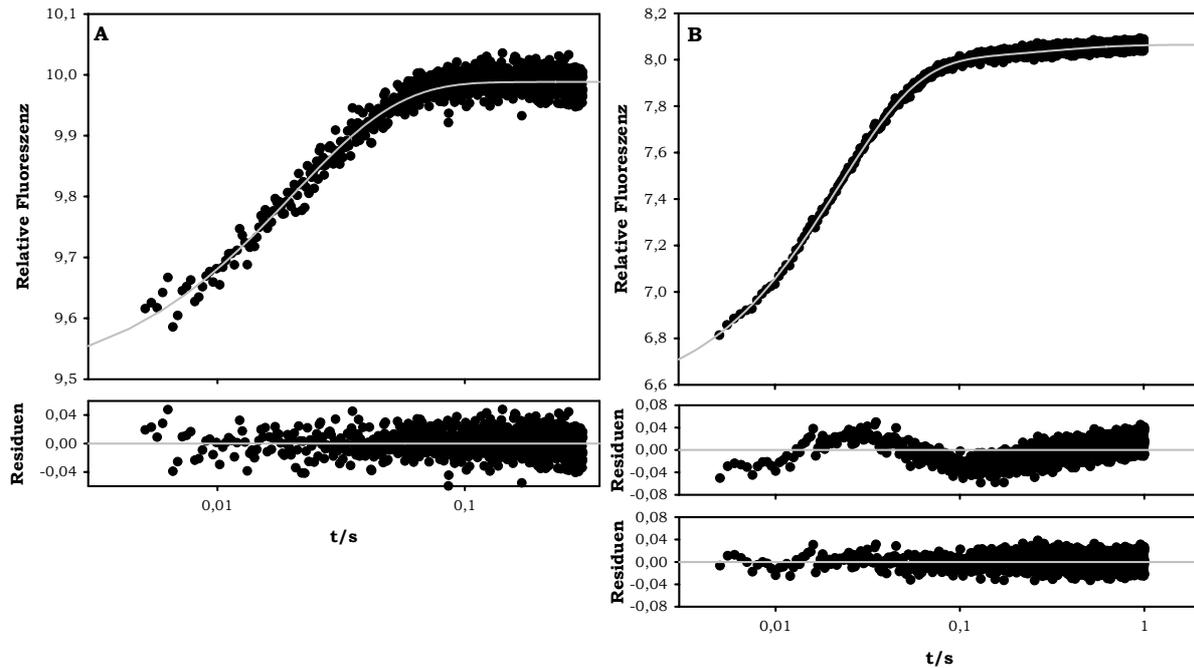


Abb. 5-12: Über Doppelsprungexperimente ermittelte Entfaltungsreaktionen nach verschiedenen *delay*-Zeiten in nativen Bedingungen.

A: Entfaltungsreaktion in 100 mM Natriumacetat, 6,05 M GdnHCl, pH 5,5 nach einer *delay*-Zeit von 0,025 s in 100 mM Natriumacetat, 0,55 M GdnHCl, pH 5,5. Die Kinetik wurde mit einer einfach-exponentiellen Funktion ($k_1 = 66,60 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$) angepasst. Die Residuen der Anpassung sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt.

B: Entfaltungsreaktion in 100 mM Natriumacetat, 6,05 M GdnHCl, pH 5,5 nach einer *delay*-Zeit von 1 s in 100 mM Natriumacetat, 0,55 M GdnHCl, pH 5,5. Die Kinetik wurde nach einer doppelt-exponentiellen Funktion angepasst ($k_1 = (69,31 \pm 0,5) \text{ s}^{-1}$, $k_2 = (0,011 \pm 0,002) \text{ s}^{-1}$). Die Residuen einer einfach- bzw. doppelt-exponentiellen Anpassung sind in der mittleren bzw. unteren Grafik dargestellt.

Bis zu einer *delay*-Zeit von 0,8 s konnten die Daten über eine einfach-exponentielle Funktion angepasst werden (Abb. 5-12A). Die so ermittelte Geschwindigkeitskonstante beträgt unabhängig von der eingesetzten *delay*-Zeit $k_1 = (66,60 \pm 0,4) \text{ s}^{-1}$. Die Daten ab einer *delay*-Zeit $>0,8 \text{ s}$ konnten durch eine doppelt-exponentielle Funktion ($k_1 = (69,31 \pm 0,5) \text{ s}^{-1}$, $k_2 = (0,011 \pm 0,002) \text{ s}^{-1}$) ausreichend beschrieben werden (Abb. 5-12B).

Dabei entspricht k_2 k_{slow}^U unter den gewählten Bedingungen und stellt die Entfaltungsreaktion von N_{ONC} dar (Abb. 5-2). k_1 stellt hingegen die Entfaltungsreaktion des mit k_{fast}^F gebildeten Zustands dar und wird deshalb k_{fast}^U genannt. Die Amplitude von k_{fast}^U ist in Abb. 5-13 als Funktion der *delay*-Zeit dargestellt.

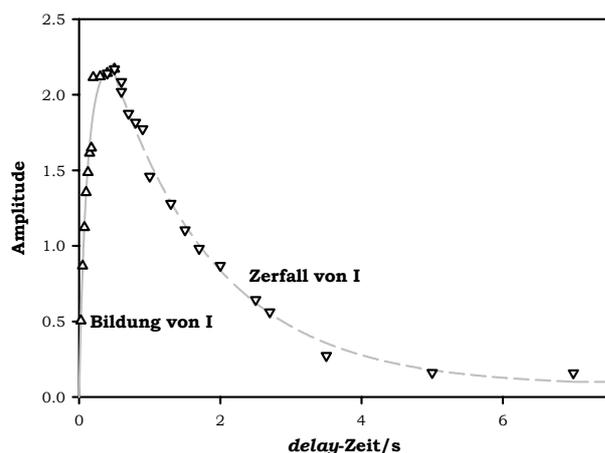


Abb. 5-13: Über Doppelsprungexperimente bestimmte Amplituden der mit $k_{\text{fast}}^{\text{U}}$ ablaufenden Entfaltungphase als Funktion der *delay-Zeit*.

Die Amplitude von $k_{\text{fast}}^{\text{U}}$ (∇) ist als Funktion der *delay-Zeit* dargestellt. Die Doppelsprungexperimente wurden wie unter 4.3.13.2 beschrieben mit variierender *delay-Zeit* in 100 mM Natriumacetat, 0,55 M GdnHCl, pH 5,5, durchgeführt. Die durchgezogene graue Linie entspricht einer einfach-exponentiellen Anpassung der Daten bis zu einer *delay-Zeit* von 0,8 s ($k = (9,04 \pm 0,12) \text{ s}^{-1}$). Die gestrichelte graue Linie entspricht einer einfach-exponentiellen Anpassung der Daten ab einer *delay-Zeit* von 0,8 s ($k = (0,66 \pm 0,09) \text{ s}^{-1}$).

Die initiale Zunahme der Amplitude mit der *delay-Zeit* beschreibt die Entstehung des mit $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ gebildeten Zustands. Die Daten konnten mit einer einfach-exponentiellen Funktion mit einer Geschwindigkeitskonstante von $(9,04 \pm 0,12) \text{ s}^{-1}$ angepasst werden. Diese ist vergleichbar mit der Geschwindigkeitskonstante der schnellen Rückfaltungsreaktion aus Einzelsprungmessungen in Gegenwart von 0,55 M GdnHCl ($k_{\text{fast}}^{\text{F}} = 5,74 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$). Da die Amplitude ohne *lag*-Phase ansteigt, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Zustand direkt mit U_{ONC} verbunden ist.

Mit zunehmender *delay-Zeit* sinkt die relative Amplitude ab, was den Zerfall des mit $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ gebildeten Zustands verdeutlicht. Der Zerfall wurde mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst, deren Geschwindigkeitskonstante $(0,66 \pm 0,09) \text{ s}^{-1}$ beträgt. Dieser Wert korreliert mit $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ ($(0,48 \pm 0,01) \text{ s}^{-1}$), und beschreibt damit eine direkte Verbindung zu N_{ONC} . Da der mit $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ gebildete Faltungszustand direkt mit N_{ONC} und U_{ONC} verknüpft ist, stellt er ein *on-pathway* Intermediat (I_{ONC}) dar. I_{ONC} wird bei einer Rückfaltungszeit von 0,8 s (Abb. 5-13) am stärksten populiert.

5.2.7.2 Untersuchungen zur Entfaltung von I_{ONC}

Um die Entfaltungsreaktion von I_{ONC} möglichst unabhängig von der Entfaltungsreaktion von N_{ONC} betrachten zu können, wurden wie unter 4.3.13.3.2 beschrieben Doppelsprungexperimente bei variierenden finalen GdnHCl-Konzentrationen durchgeführt. Da I_{ONC} bei ca. 0,8 s am stärksten populiert wird (Abb. 5-13), wurde die Rückfaltungsreaktion nach 0,8 s unterbrochen und das Protein im zweiten Mischschritt in variierenden GdnHCl-Konzentrationen wiederum entfaltet. Die Entfaltungskinetik wurde aufgezeichnet. In Abb. 5-14 ist die Entfaltungskinetik bei 2,35 M GdnHCl (A bis C) und bei 4,4 M (D) exemplarisch dargestellt.

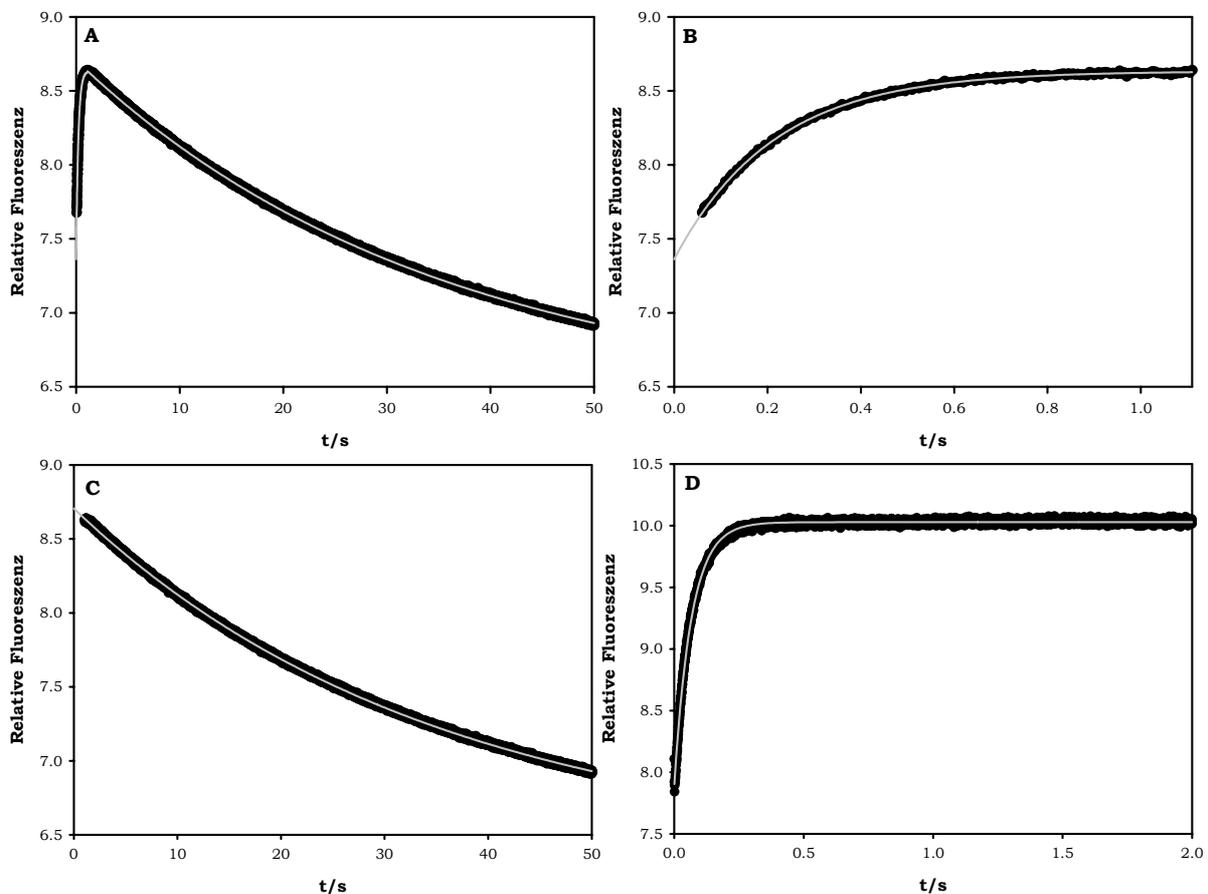


Abb. 5-14: Entfaltungskinetiken von ONC nach Doppelsprungexperimenten.

A: Entfaltungskinetik in 100 mM Natriumacetat, 2,35 M GdnHCl, pH 5,5, nach 0,8 s Rückfaltungszeit in 100 mM Natriumacetat, 0,55 M GdnHCl, pH 5,5. Die graue Linie repräsentiert die Einzelanpassung aus den Teilkurven in B und C. B: Der erste Teil der Kinetik aus A wurde mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion beträgt $(5,13 \pm 0,03) \text{ s}^{-1}$. C: Der zweite Teil der Kinetik aus A wurde mit einer einfach-exponentiell Funktion angepasst. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion beträgt $(0,029 \pm 0,001) \text{ s}^{-1}$. D: Entfaltungskinetik in 100 mM Natriumacetat, 4,44 M GdnHCl, pH 5,5, nach 0,8 s Rückfaltungszeit in 100 mM Natriumacetat, 0,55 M GdnHCl, pH 5,5. Die Anpassung der Daten erfolgte mit einer einfach-exponentiellen Funktion. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion beträgt $(15,14 \pm 0,02) \text{ s}^{-1}$.

In Gegenwart niedriger GdnHCl-Konzentrationen nimmt das Fluoreszenzsignal zunächst zu und nach ca. 1 s wieder ab (Abb. 5-14). Passt man beide Teile der Reaktion separat mit einer einfach-exponentiellen Funktion an, so erhält man für die initiale Fluoreszenzzunahme (Abb. 5-14B) eine Geschwindigkeitskonstante von $(5,13 \pm 0,03) \text{ s}^{-1}$. Diese Teilreaktion entspricht der Entfaltung von I_{ONC} ($k_{\text{fast}}^{\text{U}}$) unter den gewählten Bedingungen (2,35 M GdnHCl). Aus der Anpassung der Fluoreszenzabnahme (Abb. 5-14C) ergibt sich eine Geschwindigkeitskonstante von $(0,029 \pm 0,001) \text{ s}^{-1}$. Diese entspricht sowohl der über manuelle Mischung ermittelten Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltungsphase, als auch $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ bei 2,35 M GdnHCl. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals wird von Molekülen verursacht, die bei 2.35 M GdnHCl aus I_{ONC} zu N_{ONC} weiter falten.

In Gegenwart höherer GdnHCl-Konzentrationen ist nur noch eine Phase detektierbar (Abb. 5-14D), die $k_{\text{fast}}^{\text{U}}$ entspricht. In Abb. 5-15 ist $k_{\text{fast}}^{\text{U}}$ als Funktion der GdnHCl-Konzentration im Vergleich zu allen anderen detektierten Faltungsphasen dargestellt.

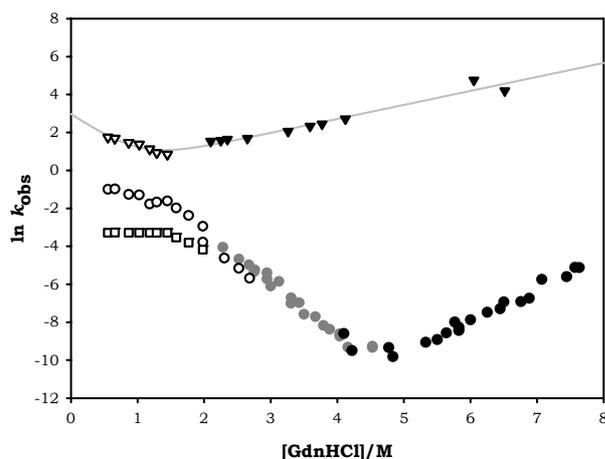


Abb. 5-15: Geschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltungsreaktionen ONC als Funktion der GdnHCl-Konzentration.

Die Symbole ∇ , \circ und \square zeigen die bei *stopped-flow*-Mischung beobachteten Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$, $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ und $k_{\text{slow}}^{\text{F}}$. Die Symbole \bullet und \blacklozenge zeigen die Geschwindigkeitskonstanten der über manuelle Mischung detektierbaren Rück- und Entfaltungsreaktion. Über Doppelsprungexperimente wurde $k_{\text{fast}}^{\text{U}}$ (\blacktriangledown) ermittelt. Die graue Linie repräsentiert eine Anpassung von ∇ und \blacktriangledown nach Gleichung 3-15.

Aus dem Chevron-Plot von I_{ONC} (Abb. 5-15, Symbole ∇ und \blacktriangledown) ergibt sich ein $[D]_{50\%}$ -Wert von 1,8 M GdnHCl. Passt man den Chevron-Plot nach einem Zweizustandsmodell über Gleichung 3-15 an, ergibt sich aus den Parametern ein Stabilitätsbeitrag von $7,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ für I_{ONC} (Gleichung 3-4).

5.2.8 Echtzeit-NMR-Untersuchung der Entfaltung

Da die Entfaltungsreaktion von ONC bei 5,5 M GdnHCl sehr langsam abläuft ($k_{\text{slow}}^{\text{U}} = 1,34 \pm 0,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), konnte die Reaktion mit Hilfe von 2D-Echtzeit-NMR-Spektroskopie auf Aminosäureebene untersucht werden.

Unabhängig von der Zu- (Entstehung von Signalen von U_{ONC}) bzw. Abnahme (Abnahme der Signale von N_{ONC}) der Signalintensität mit der Zeit zeigen alle Signale der 2D-NMR-Spektren vergleichbare Kinetiken (Abb. 5-16).

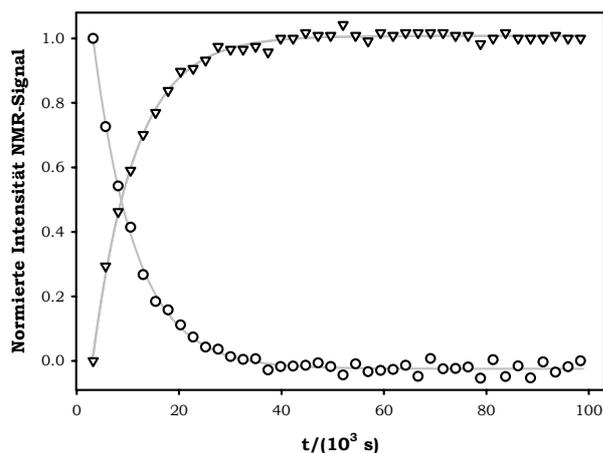


Abb. 5-16: Mittels Echtzeit-NMR-Spektroskopie aus 2D-NMR-Spektren bestimmte Entfaltungsreaktion verschiedener Aminosäurereste.

Es sind die Abnahme des nativen Signals von S61 (o) sowie die Zunahme eines Signals eines entfaltenden Aminosäurerestes (∇) dargestellt. Die Daten wurden über eine einfach-exponentielle Funktion angepasst (graue Linie). Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen betragen $(1,24 \pm 0,09) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Alle Kinetiken wurden mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst. Die so ermittelte Geschwindigkeitskonstante ($(1,24 \pm 0,09) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) entspricht der über Fluoreszenzspektroskopie detektierten $k_{\text{slow}}^{\text{U}}$. Da das erste aufgenommene NMR-Spektrum identisch zu dem von N_{ONC} ist (Anhang 4), kann davon ausgegangen werden, dass während der Totzeit der Reaktion keine detektierbaren strukturellen Änderungen auftreten. Somit wird deutlich, dass keine Intermediate vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Entfaltungsreaktion populiert werden.

5.3 Faltungsmechanismus von Onconase

Aus den Geschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltungsreaktionen von ONC (Abb. 5-15) wurden mit Hilfe einer globalen Anpassung nach einem sequenziellen Dreizustandsmodell die intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Faltungsreaktionen bestimmt (Tabelle 1). Die Peptidyl-prolyl-Isomerisierungsreaktion in U_{ONC} wurde nicht mit in die globale Anpassung einbezogen.

In Abb. 5-17 ist die Anpassung des Chevron-Plots von ONC nach einem sequenziellen Modell dargestellt.

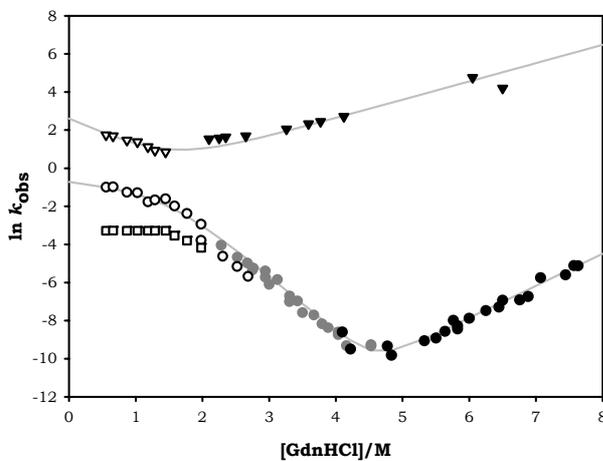


Abb. 5-17: Anpassung des Chevron-Plots nach einem sequenziellen Dreizustandsfaltungsmodell.

Die mittels *stopped-flow*-Mischung detektierbaren Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ (∇), $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ (O) und $k_{\text{slow}}^{\text{F}}$ (\square) und die die Geschwindigkeitskonstanten der mittels manueller Mischung detektierbarer der Rück- und Entfaltungsreaktionen (\bullet und \bullet) sind als Funktion der GdnHCl-Konzentration dargestellt. Über Doppelsprungexperimente wurde $k_{\text{fast}}^{\text{U}}$ (\blacktriangledown) ermittelt. Die grauen Linien entsprechen der globalen Anpassung aller Geschwindigkeitskonstanten nach Gleichung 4-11.

Die aus der Anpassung resultierenden intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten (Tabelle 1) dienen zur Simulation der Abhängigkeit der durch Doppelsprungexperimente ermittelten Amplituden von $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ und $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ als Funktion der *delay*-Zeit (Abb. 5-10, Abb. 5-13).

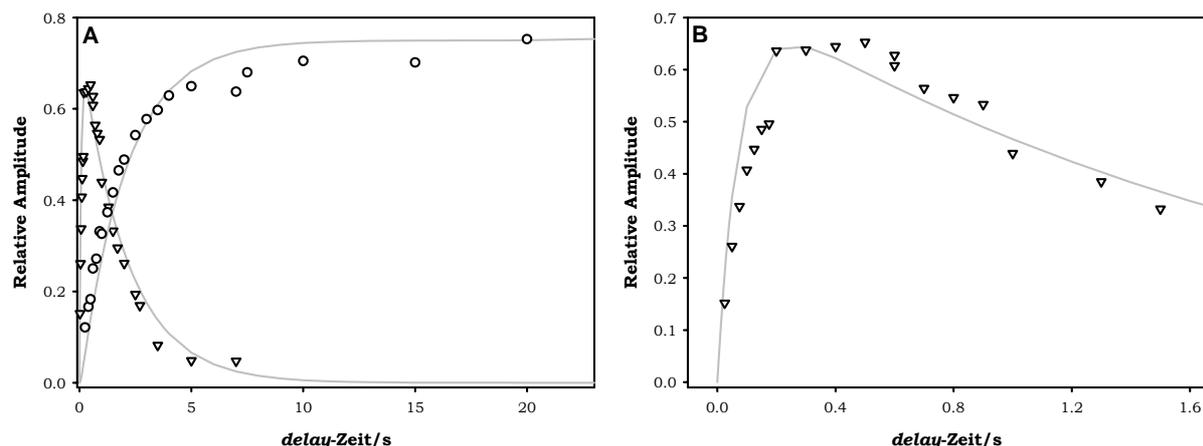


Abb. 5-18: Über Doppelsprungexperimente bestimmte Populierbarkeit von I_{ONC} und N_{ONC} als Funktion der *delay-Zeit*.

A: Relative Amplituden der Bildung und des Zerfalls von I_{ONC} (∇) bzw. der Bildung von N_{ONC} (\circ) (Abb. 5-13, Abb. 5-10). Die Daten wurden auf die Entfaltung von N_{ONC} sowie die Rückfaltung von U_{ONC} normiert. Die Linien entsprechen einer Simulation der Daten, basierend auf den aus Gleichung 4-11 erhaltenen intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten (Tabelle 1).

B: In A dargestellte Daten mit vergrößerter Abszisse.

Die experimentell ermittelten Amplitudenverläufe von $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ und $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ werden gut durch die, mit den intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten für ein sequenzielles Faltungsmodell, simulierten Kurvenverläufe beschrieben (Abb. 5-18). Folglich wird der Faltungsweg von ONC ausreichend durch ein sequenzielles Faltungsmodell beschrieben, auch wenn ein komplexeres Faltungsverhalten (beispielsweise nach einem triangulären Modell (Abb. 3-6B)) nicht ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 1: Intrinsische Geschwindigkeitskonstanten aus der Anpassung des Chevron-Plots von ONC (Abb. 5-17) nach einem sequenziellen Dreizustandsfaltungsmodell (Gleichung 4-7).

Faltungsschritt	k^0 (s^{-1}) ^a
$U_{\text{ONC}} \rightarrow I_{\text{ONC}}$	13,3
$I_{\text{ONC}} \rightarrow U_{\text{ONC}}$	0,30
$I_{\text{ONC}} \rightarrow N_{\text{ONC}}$	0,50
$N_{\text{ONC}} \rightarrow I_{\text{ONC}}$	$1,62 \cdot 10^{-8}$

^a Geschwindigkeitskonstante bei 0 M GdnHCl

Aus den intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten $k_{U_{\text{ONC}} \rightarrow I_{\text{ONC}}}^0$ und $k_{I_{\text{ONC}} \rightarrow U_{\text{ONC}}}^0$ der globalen Anpassung (Tabelle 1) kann über Gleichung 3-4 $\Delta G_{I_{\text{ONC}}}^0 = 9,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ bestimmt werden. $\Delta G_{N_{\text{ONC}}}^0$ kann aus den intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten $k_{I_{\text{ONC}} \rightarrow N_{\text{ONC}}}^0$ und $k_{N_{\text{ONC}} \rightarrow I_{\text{ONC}}}^0$ (Tabelle 1) über Gleichung 3-4 errechnet werden und beträgt $51,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

5.4 Identifizierung der an der Bildung von I_{ONC} beteiligten Aminosäurereste

Durch *quenched-flow*-H/D-Austauschexperimente in Kombination mit mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie können an der Bildung von Intermediaten beteiligte Aminosäurereste indirekt ermittelt werden (3.5.1, 3.5.2). Da die Deuterierung von Proteinen deren Stabilität beeinflussen kann (Makhatadze, 1995), wurde für die *quenched-flow*-H/D-Austauschexperimente von protoniertem Protein ausgegangen. Im ersten Mischschritt wurde entfaltete, protonierte ONC in protoniertem Puffer zurückgefaltet. Nach definierten Rückfaltungszeiten wurde ONC bei hohem pH-Wert in deuteriertem Puffer verdünnt, um eine H/D-Austauschreaktion zu initiieren. Amidprotonen, die während der definierten Rückfaltungszeit bereits in stabile Wasserstoffbrücken einbezogen sind, tauschen nicht gegen Deuterium aus und geben im 2D-HSQC-NMR-Spektrum ein Signal. Amidprotonen in ungefalteten Regionen tauschen hingegen gegen das Deuterium des Lösungsmittels aus und geben kein Signal im 2D-HSQC-NMR-Spektrum. Die Austauschreaktion wurde durch Verringerung des pH-Wertes abgestoppt (*quench*). Nach Konzentrierung der Proteinlösung und Wechsel des Puffers, wurde der Deuterierungsgrad eines jeden Amidprotons NMR-spektroskopisch ermittelt.

5.4.1 Vergleichs- und Kontrollmessungen

Als Vergleichsprobe diente ONC, die wie oben beschrieben rückgefaltet und verdünnt wurde, jedoch erfolgten alle Mischschritte ausschließlich mit protonierten Lösungen.

Um das Vorhandensein von Reststrukturen in U_{ONC} zu detektieren, wurde ONC in deuteriertem Puffer entfaltet und in deuteriertem Puffer zurückgefaltet. Da im aufgezeichneten 2D-HSQC-NMR-Spektrum keine Signale sichtbar waren (Daten nicht gezeigt), kann das Vorhandensein von Reststrukturen in U_{ONC} ausgeschlossen werden.

Als weitere Kontrollmessung wurde das H/D-Austauschverhalten in N_{ONC} über drei Tage untersucht (4.3.16.1). Amidprotonen von Aminosäureresten in labilen Regionen tauschen schneller gegen Deuterium aus als Reste in stabilen Regionen. Die Abnahme der NMR-Signale wurde als Funktion der Zeit aufgetragen und so das H/D-Austauschverhalten aller Aminosäurereste sichtbar. In Abb. 5-19 sind H/D-Austauschkinetiken unterschiedlich geschützter Amidprotonen dargestellt.

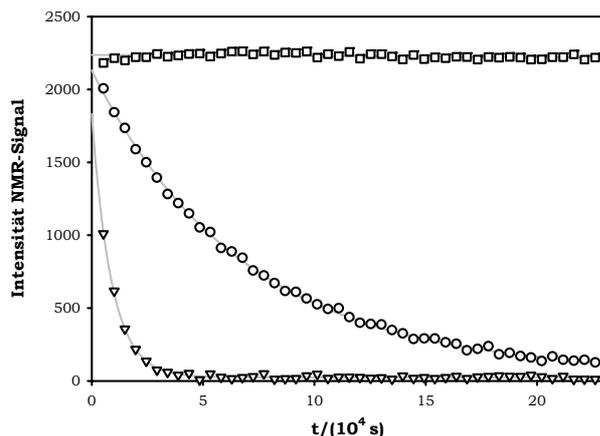


Abb. 5-19: H/D Austauschkinetik ausgewählter Amidprotonen in N_{ONC} bei pH 5,5.
F28 (∇), L51 (o) und Y38 (\square)

In N_{ONC} zeigen 42 Amidprotonen keinen Austausch innerhalb von 24 h. Diese 42 Aminosäurereste wurden zur Auswertung der *quenched-flow*-H/D-Austauschexperimente genutzt. Sie befinden sich im C-terminalen Bereich der ersten α -Helix, in der dritten α -Helix sowie im dritten bis sechsten β -Faltblattstrang (Abb. 5-20).

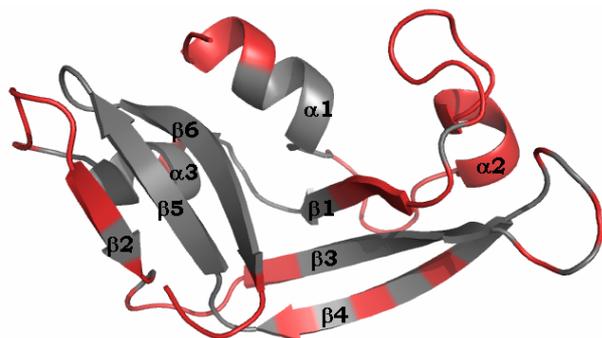


Abb. 5-20: H/D-Austausch in N_{ONC} bei pH 5,5.

Aminosäurereste, dessen Amidprotonen innerhalb von 24 h austauschen, sind rot dargestellt. Grau dargestellte Aminosäurereste zeigen keinen H/D- Austausch innerhalb von 24 h und wurden zur Auswertung der *quenched-flow*-H/D-Experimente genutzt.

5.4.2 Quenched-flow-H/D-Austauschexperimente

Die *quenched-flow*-H/D-Austauschexperimente wurden wie beschrieben ausgehend von protonierter ONC durchgeführt. Der Schutz eines jeden Amidprotons wurde durch Integration der entsprechenden NMR-Signalfäche und nachfolgende Korrektur dieses Wertes um die jeweilige Probenkonzentration bestimmt. Dieser Wert wurde dann ins Verhältnis zur Signalintensität der Vergleichsprobe (5.4.1) gesetzt (Anhang 5).

Für alle 42 untersuchten Aminosäurereste ist eine Zunahme des Anteils an Amidprotonen, die nicht gegen Deuterium austauschen (relative Protonenbesetzung), mit der Rückfaltungszeit erkennbar. Die Zunahme der relativen Protonenbesetzung als

5. Ergebnisse

Funktion der Rückfaltungszeit ist in Abb. 5-21 an ausgewählten Aminosäureresten repräsentativ dargestellt.

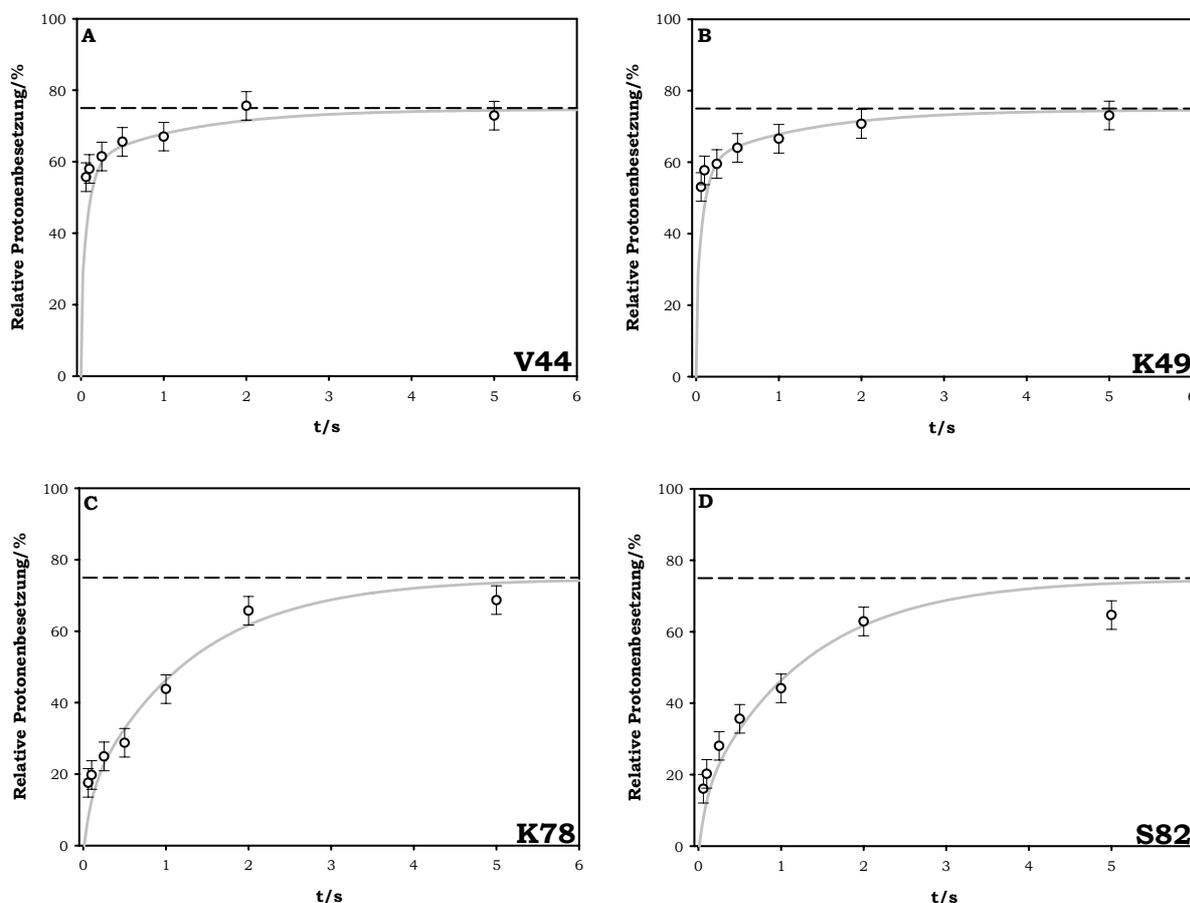


Abb. 5-21: Relative Protonenbesetzung ausgewählter Aminosäurereste von ONC als Funktion der Rückfaltungszeit.

Der Anteil an Amidprotonen die nicht gegen Deuterium austauschen (○) ist als Funktion der Rückfaltungszeit dargestellt. Die graue Linie in A und B repräsentiert eine doppelt-exponentielle Funktion mit festgesetzter $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ und $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ aus der globalen Anpassung der kinetischen Daten nach einem sequenziellen Faltungsmodell (5.3, $k_{\text{fast}}^{\text{F}} = 4,72 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{medium}}^{\text{F}} = 0,38 \text{ s}^{-1}$). Die graue Linie in C und D repräsentiert eine einfach-exponentielle Funktion mit festgesetzter $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ ($k_{\text{medium}}^{\text{F}} = 0,38 \text{ s}^{-1}$). Die gestrichelte Linie markiert das Maximum des innerhalb von $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ und $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ erreichbaren Schutzes.

Während der Rückfaltungszeit von 5 s erreicht keiner der 42 untersuchten Reste einen Schutz von 100%, da während dieser Zeit die langsame Rückfaltungsreaktion (ca. 25% der Amplitude) noch nicht abgelaufen ist.

Generell wurde deutlich, dass die Zunahme des Schutzes der einzelnen Aminosäurereste in zwei Gruppen unterteilt werden kann. Einige Reste zeigen bereits bei sehr kurzen Rückfaltungszeiten (60 bis 250 ms) einen hohen Schutz (Abb. 5-21A und B). Diese Kinetiken werden durch eine doppelt-exponentielle Funktion mit festgesetzter $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ und $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ aus der globalen Anpassung nach einem sequenziellen Faltungsmodell (5.3) ($k_{\text{fast}}^{\text{F}} = 4,72 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{medium}}^{\text{F}} = 0,38 \text{ s}^{-1}$) sehr gut beschrieben. Da durch $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ die Bildung von I_{ONC} beschrieben wird (5.2.7), erhalten alle Aminosäure-

reste, die diese Kinetik zeigen, während der Bildung von I_{ONC} Schutz und sind somit in I_{ONC} bereits strukturiert.

Andere Reste zeigen eine Zunahme des Schutzes mit zunehmender Rückfaltungszeit, die sehr gut mit einer einfach-exponentiellen Funktion mit einer festgesetzten $k^{\text{F}}_{\text{medium}}$ ($k^{\text{F}}_{\text{medium}} = 0,38 \text{ s}^{-1}$) beschrieben werden können (Abb. 5-21C und D). Somit werden diese Reste nur in N_{ONC} geschützt und sind deshalb ausschließlich an der Bildung von N_{ONC} beteiligt.

In Abb. 5-22 sind die Aminosäurereste dargestellt, die an der Bildung von I_{ONC} bzw. N_{ONC} beteiligt sind.

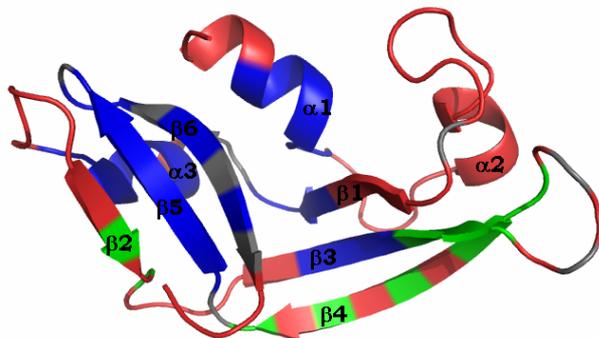


Abb. 5-22: An der Bildung von I_{ONC} bzw. N_{ONC} beteiligte Aminosäurereste.

Alle rot dargestellten Aminosäurereste zeigen innerhalb von 24 h einen H/D-Austausch in N_{ONC} (Abb. 5-20) und wurden nicht weiter analysiert.

Blau dargestellte Reste zeigen frühen Schutz während der Rückfaltung von ONC (Abb. 5-21A und B) und sind somit an der Bildung von I_{ONC} beteiligt. Grün dargestellte Reste erhalten mit $k^{\text{F}}_{\text{medium}}$ Schutz (Abb. 5-21C und D) und sind somit nur an der Bildung von N_{ONC} beteiligt. Reste in Grau konnten nicht zugeordnet bzw. auf Grund von Signalüberschneidungen nicht ausgewertet werden.

Aus Abb. 5-22 wird deutlich, dass der C-terminale Bereich der ersten α -Helix, die gesamte dritte α -Helix sowie der fünfte und sechste β -Faltblattstrang und einzelne Aminosäurereste im ersten und dritten β -Faltblattstrang an der Bildung von I_{ONC} beteiligt sind.

In N_{ONC} erhalten Aminosäurereste des zweiten, dritten und vierten β -Faltblattstrangs Schutz. Interessanterweise wird im zweiten und vierten β -Faltblattstrang nur jeder zweite Aminosäurerest geschützt, was auf das charakteristische Wasserstoffbrückenmuster in den dem Lösungsmittel zugewandten β -Faltblattsträngen zurückgeführt werden kann.

5.5 Untersuchungen zum Einfluss der C-terminalen Disulfidbrücke auf die Faltung von Onconase

Im Vergleich zum homologen Enzym RNase A enthält ONC eine alternative C-terminale Disulfidbrücke (C87-C104) (3.6). Der Einfluss dieser Disulfidbrücke auf die Stabilität und Faltung von ONC wurde mit Hilfe der Variante C78A/C104A-ONC untersucht (Schulenburg, 2005; Arnold *et al.*, 2006). Dabei wurde deutlich, dass nach Deletion der C-terminalen Disulfidbrücke die thermodynamische Stabilität um ca. $32 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ vermindert ist. Dies liegt in einer im Vergleich zu ONC langsameren Rückfaltungs- und zusätzlich schnelleren Entfaltungsreaktion begründet (Schulenburg, 2005; Arnold *et al.*, 2006). Weiterhin ist bei der Variante C87A/C104A-ONC auch in Gegenwart niedriger GdnHCl-Konzentrationen kein *rollover* im Chevron-Plot sichtbar (Schulenburg, 2005). Auf Grund dieser charakteristischen Unterschiede ist die Faltungsreaktion dieser Enzymvariante im Vergleich zum Faltungsmechanismus von ONC von Interesse.

Das C87A/C104A-ONC-Gen wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Ronald T. Raines in einem pET22b(+) Vektor zur Verfügung gestellt. Um bessere Proteinausbeuten bei der Expression zu erlangen, wurde die Variante C87A/C104A-ONC wie unter 4.2.1 beschrieben in den Vektor pET26b(+) kloniert. Die Expression und Reinigung erfolgte analog zu der von ONC.

5.5.1 Untersuchung der Faltungsreaktionen von C87A/C104A-ONC auf schnelle Faltungsereignisse

Um die Präsenz schneller Faltungsereignisse in der Faltungsreaktion von C87A/C104A-ONC zu detektieren, wurde die Rück- und Entfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie (4.3.13.2) analysiert (Abb. 5-23).

5. Ergebnisse

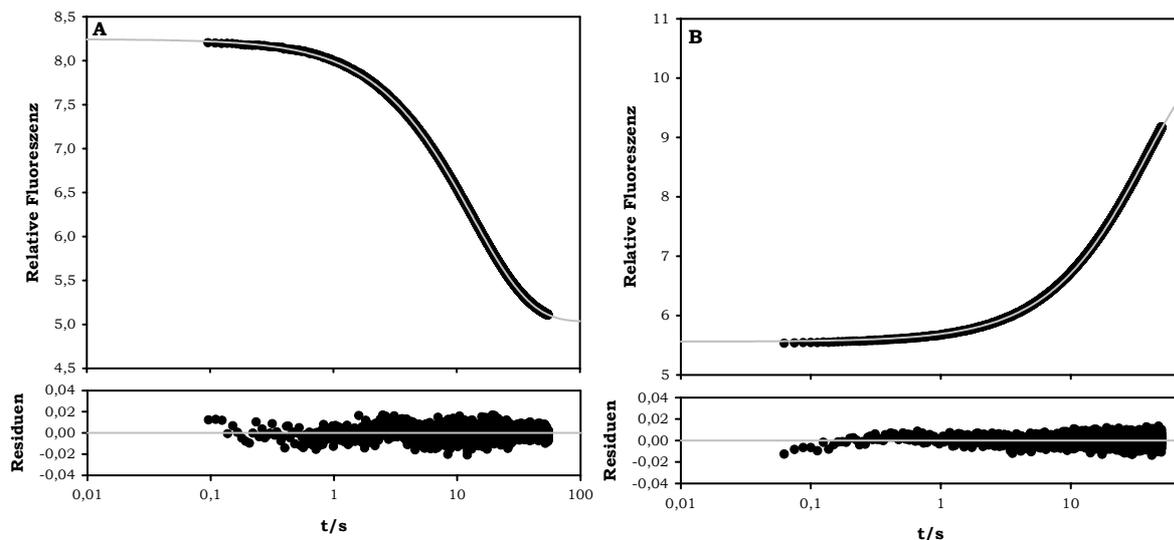


Abb. 5-23: Rück- (A) und Entfaltungskinetik (B) von C87A/C104A-ONC.

Die Reaktionen wurden mittels *stopped-flow*-Mischung initiiert. A: Anpassung der Rückfaltungsreaktion (100 mM Natriumacetat, 0,7 M GdnHCl, pH 5,5) mit einer einfach-exponentielle Funktion. Die Residuen sind in der unteren Grafik dargestellt. B: Anpassung der Entfaltungskinetik (100 mM Natriumacetat, 7,6 M GdnHCl, pH 5,5) mit einer einfach-exponentiellen Funktion. Die entsprechenden Residuen sind dargestellt.

Sowohl bei der Rück- als auch bei der Entfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC wurden keine schnellen Faltungsphasen beobachtet. Daraus kann man schließen, dass während der Faltung von C87A/C104A-ONC entweder kein Intermediat durchlaufen oder ein eventuell vorkommendes Intermediat nicht ausreichend populierte wird, um es detektieren zu können.

In Abb. 5-24 sind die mittels manueller und *stopped-flow*-Mischung ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Ent- und Rückfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC als Funktion der GdnHCl-Konzentration dargestellt.

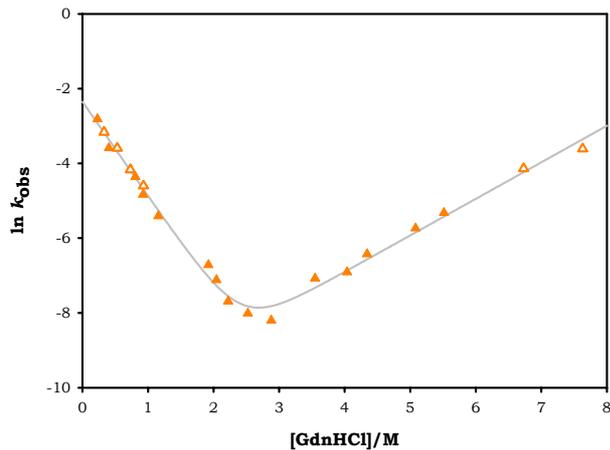


Abb. 5-24: Geschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltungsreaktionen von C87A/C104A-ONC als Funktion der GdnHCl-Konzentration.

Es sind die Geschwindigkeitskonstanten aus Messungen mit manueller (\blacktriangle) bzw. mit *stopped-flow*-Mischung (\triangle) gezeigt. Die Daten wurden nach Gleichung 3-15 angepasst.

Die mittels *stopped-flow*-Mischung ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind sehr gut mit den Geschwindigkeitskonstanten aus manuellen Messungen vergleichbar. Die Daten werden gut durch die Anpassung nach einem Zweizustandsmodell (Gleichung 3-15) beschrieben. Aus den so ermittelten Parametern ergibt sich nach Gleichung 3-4 eine thermodynamische Stabilität von $(23,38 \pm 0,12)$ kJ·mol⁻¹ für C87A/C104A-ONC. Diese stimmt mit der thermodynamischen Stabilität aus GdnHCl-induzierten Übergangskurven überein $\Delta G^\circ = 28,8 \pm 2,0$ kJ mol⁻¹ (Schulenburg, 2005; Arnold *et al.*, 2006).

In Abb. 5-25 sind die Chevron-Plots von ONC und C87A/C104A-ONC vergleichend dargestellt.

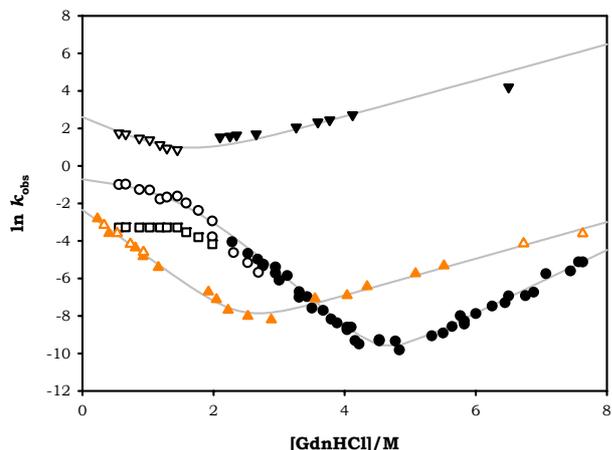


Abb. 5-25: Vergleich der Chevron-Plots von ONC und C87A/C104A-ONC.

Symbole in Orange geben Geschwindigkeitskonstanten der Faltung von C87A/C104A-ONC an. Schwarz Symbole gelten für Geschwindigkeitskonstanten von ONC. Die offenen Symbole zeigen die Geschwindigkeitskonstanten aus Messungen mit *stopped-flow*-Mischung, die geschlossenen Symbole präsentieren die Daten aus Messungen mit manueller Mischung. Die Linien repräsentieren einen Fit der Daten nach Gleichung 3-15 (C87A/C104A-ONC) bzw. Gleichung 4-11 (ONC).

Die Anstiege der Rückfaltungsreaktionen von ONC und C87A/C104A-ONC sind vergleichbar, die Anstiege der Entfaltungsreaktion sind hingegen verschieden.

Um die Rückfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC auf die Existenz von Intermediaten zu überprüfen, wurde mit Hilfe von Doppelsprungexperimenten (N-Test) die Bildung nativer C87A/C104A-ONC ($N_{\text{C87A/C104A-ONC}}$) verfolgt.

Die Entfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC ist langsam ($(4,88 \pm 0,1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ in 5,5 M GdnHCl) und daher nicht vollständig mittels *stopped-flow*-Technik detektierbar. Daher wurde die Entfaltungsreaktion durch Verdünnung in stark entfaltende Puffer beschleunigt. Die Entfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC konnte in 100 mM Glycin, 5,5 M GdnSCN, pH 2 vollständig mittels *stopped-flow*-Technik verfolgt und mit einer einfach-exponentiellen Funktion beschrieben werden ($k = 11,73 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$, Daten nicht gezeigt).

Nachfolgend wurden Doppelsprungexperimente durchgeführt, in dessen zweiten Mischschritt C87A/C104A-ONC in 100 mM Glycin, 5,5 M GdnSCN, pH 2, entfaltet wurde. Die Entfaltungskinetiken konnten mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst werden ($k = (12,31 \pm 0,21) \text{ s}^{-1}$). Da der erste Mischschritt in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5 erfolgt, entspricht die Zunahme der Amplitude der Entfaltungsreaktion als Funktion der *delay*-Zeit der Bildung von $N_{\text{C87A/C104A-ONC}}$ unter herkömmlichen Bedingungen (100 mM Natriumacetat, 0,6 M GdnHCl, pH 5,5). In Abb. 5-26 ist die Bildung von $N_{\text{C87A/C104A-ONC}}$ als Funktion der *delay*-Zeit dargestellt.

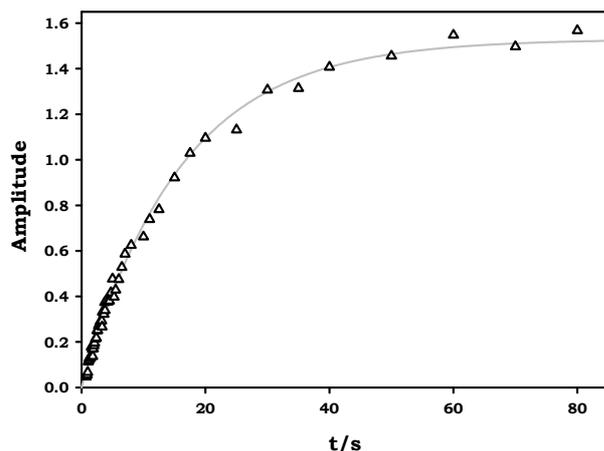


Abb. 5-26: Amplituden der über Doppelsprungexperimente bestimmten Entfaltungsphase von C87A/C104A-ONC als Funktion der *delay*-Zeit.

Die Amplituden der Entfaltungsphase von C87A/C104A-ONC (Δ) sind als Funktion der *delay*-Zeit dargestellt. Die graue Linie entspricht einer einfach-exponentiellen Anpassung der Daten ($k = (6,3 \pm 0,1) 10^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Die Bildung von $N_{\text{C87A/C104A-ONC}}$ wird durch eine einfach-exponentielle Funktion gut beschrieben, deren Geschwindigkeitskonstante ($k = (6,3 \pm 0,1) 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) mit der Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC im Einzelsprungexperiment unter vergleichbaren Bedingungen ($k = (4,2 \pm 0,1) 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) gut übereinstimmt.

Nimmt der Anteil an $N_{\text{C87A/C104A-ONC}}$ ohne *lag*-Phase zu, so wird $N_{\text{C87A/C104A-ONC}}$ direkt, ohne Durchlaufen eines Intermediats gebildet. Da $N_{\text{C87A/C104A-ONC}}$ ohne detektierbare *lag*-Phase gebildet wird, kann angenommen werden, dass während der Rückfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC kein Intermediat durchlaufen wird.

5.5.2 Einfluss der Mutationen auf die Tertiärstruktur

Um die Auswirkung der eingeführten Mutationen auf die Tertiärstruktur im Detail betrachten und somit eventuelle Ursachen für das veränderte Faltungsverhalten der Variante bestimmen zu können, wurde die Tertiärstruktur der Variante C87A/C104A-ONC sowohl röntgenkristallographisch als auch mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Die CD-Spektren (4.3.12) von ONC und C87A/C104A-ONC zeigen sowohl in N als auch in U Unterschiede im nahen UV-Bereich von 250 bis 270 nm auf (Anhang 6). Die Spektren im fernen UV-Bereich zeigen hingegen keine signifikanten Unterschiede (Anhang 6).

5.5.2.1 Bestimmung der Tertiärstruktur von C87A/C104A-ONC mittels Röntgenkristallographie

Die Kristallisationsstudien wurden wie unter 4.3.20 beschrieben durchgeführt. In verschiedenen Ansätzen wuchsen bereits nach Stunden Kristalle in unterschiedlichen Formen und Größen. Zur röntgenkristallographischen Untersuchung wurde ein Kristall verwendet, welcher sich in 0,2 M Ammoniumsulfat mit 30% PEG 4000 innerhalb von 3 Tagen bildete (Abb. 5-27). Das Protein kristallisierte unter diesen Bedingungen in der primitiv-orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$. Der ca. $28 \times 10 \mu\text{m}$ große Kristall streute am Hausgenerator des Instituts für Biochemie und Biotechnologie bis zu einer Auflösung von 1.58 \AA . Es befinden sich zwei Moleküle in einer Raumeinheit (Anhang 7).

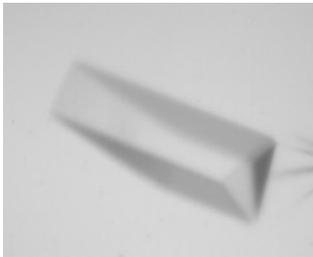


Abb. 5-27: Proteinkristall der Variante C87A/C104A-ONC.

Der Kristall wuchs innerhalb von 3 Tagen in 0,2 M Ammoniumsulfat mit 30% PEG 4000 und streute bis zu einer Auflösung von $1,58 \text{ \AA}$.

Die Tertiärstruktur von C87A/C104A-ONC wurde durch die Methode des molekularen Ersatzes basierend auf der Struktur von ONC (Mosimann, 1994) ermittelt. Große Bereiche beider Strukturen sind konform (Abb. 5-28). Beide Strukturen zeigen signifikante Abweichungen im C-terminalen Bereich, da bei der Variante C87A/C104A-ONC die C-terminale Disulfidbrücke, welche den C-Terminus kovalent an das Protein heftet, deletiert ist.

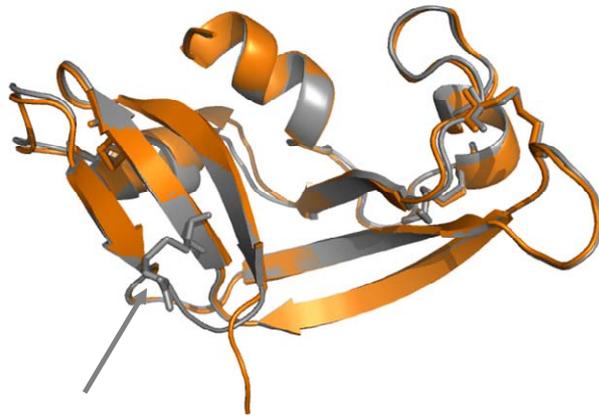


Abb. 5-28: Vergleich der Kristallstrukturen von ONC und C87A/C104A-ONC.
Die Struktur von ONC ist grau, die von C87A/C104A-ONC orange dargestellt. Die Disulfidbrücke C87-C104 ist mit einem grauen Pfeil markiert.

In C87A/C104A-ONC ist im Vergleich zu ONC außerdem die Orientierung der Aminosäureseitenkette des Restes H97 verändert (Abb. 5-29). Dieser Aminosäurerest ist an der Bildung des aktiven Zentrums von ONC beteiligt (3.6.1).

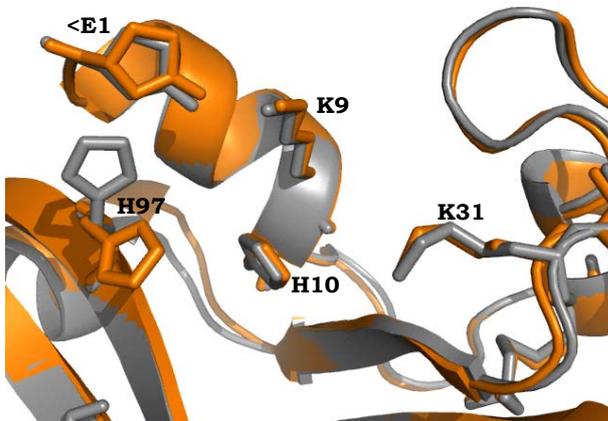


Abb. 5-29: Ausschnitt aus den Kristallstrukturen von ONC und C87A/C104A-ONC.
Die Struktur von ONC ist grau, die von C87A/C104A-ONC orange dargestellt. Die das aktive Zentrum bildenden Aminosäureseitenketten sind gezeigt.

5.5.2.2 Bestimmung der Tertiärstruktur von C87A/C104A-ONC mittels NMR-Spektroskopie

Um Kristallisationsartefakte bei der Strukturbestimmung von C87A/C104A-ONC ausschließen zu können, wurde die Struktur ebenfalls mittels NMR-Spektroskopie in Lösung aufgeklärt (Anhang 8). In Abb. 5-30 sind die 10 energetisch günstigsten NMR-Strukturen vergleichend zur oben beschriebenen Kristallstruktur und der Kristallstruktur von ONC dargestellt.

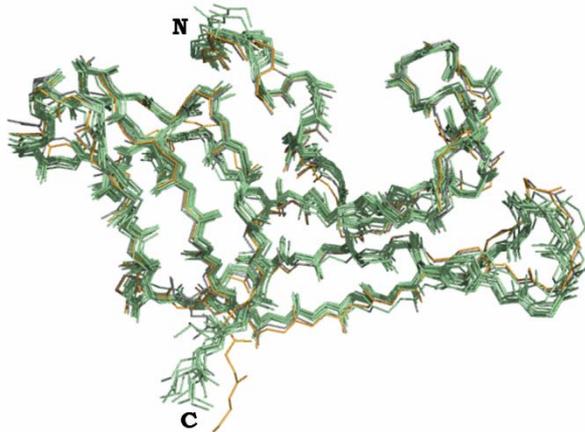


Abb. 5-30: Vergleichende Bänderdarstellung der 10 energetisch günstigsten NMR-Strukturen und der Kristallstruktur von C87A/C104A-ONC mit der Kristallstruktur von ONC.

Die NMR-Strukturen sind grün, die Kristallstruktur von C87A/C104A-ONC orange und die Kristallstruktur von ONC grau dargestellt.

Beide Strukturen von C87A/C104A-ONC sind nahezu identisch. Kleine Unterschiede im C-terminalen Bereich sind auf die hohe Dynamik dieser Region infolge der Deletion der Disulfidbrücke zurück zu führen.

In allen der 10 energetisch günstigsten NMR-Strukturen weist der Aminosäurerest H97 eine andere Orientierung als in ONC auf, und ist der Orientierung dieses Restes in der Kristallstruktur sehr ähnlich (Anhang 9). Somit kann ein Kristallisationsartefakt als Ursache für die veränderte Orientierung dieser Seitenkette ausgeschlossen werden.

5.5.3 Auswirkung der eingeführten Mutationen auf die Proteindynamik

Die Proteinflexibilität von C87A/C104A-ONC und ONC wurde durch das Austauschverhalten der Amidprotonen der einzelnen Aminosäurereste experimentell mittels 2D-NMR-Spektroskopie untersucht. Langsame Austauschreaktionen wurden über H/D-Austauschexperimente (4.3.16.1, Anhang 10), schnelle Austausche über die New MEXICO Methode (4.3.16.3, Anhang 11) verfolgt. Bei beiden Methoden wurden die Intensitätsänderungen der individuellen NMR-Signale als Funktion der Zeit aufgetragen und mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst (Abb. 5-31).

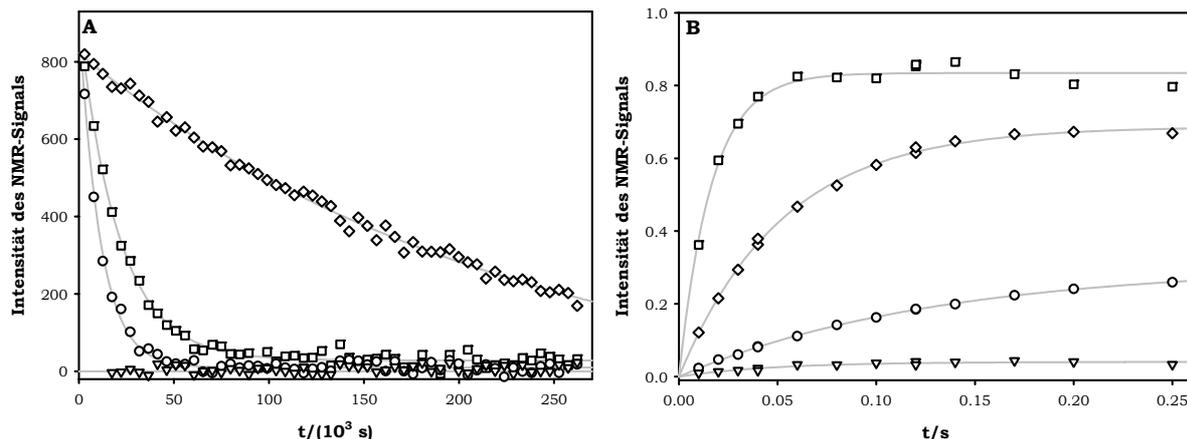


Abb. 5-31: Mittels H/D- bzw. H/H-Austausch (New MEXICO) gemessene Austauschkinetiken ausgewählter Amidprotonen.

A: H/D-Austauschreaktion von I47 (\diamond), K9 (\square), L27 (\circ) und N34 (∇). B: Über New MEXICO bestimmte H/H-Austauschreaktion von K81 (\square), <E1 (\diamond), T5 (\circ) und V17 (∇). Die Linien repräsentieren eine einfach-exponentielle Anpassung der Daten.

Da die H/D-Austauschreaktionen bei pH 7,0 (Daten nicht gezeigt) um einen Faktor von 6 bis 28 langsamer sind als bei pH 8,2, ist anzunehmen dass die Austauschreaktion bei pH 8,2 im EX2-Mechanismus stattfindet (3.5.2.3). Somit kann aus den beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der H/D-Austauschreaktion ΔG^0 der einzelnen Aminosäurereste bestimmt werden. Allerdings ist die Austauschreaktion in ONC bei pH 8,2 noch zu langsam, um komplett verfolgt werden zu können. Darum kann ΔG^0 nur für die schnell austauschenden Aminosäurereste bestimmt werden. Für die langsam austauschenden Reste kann ΔG^0 nur abgeschätzt werden (ca. 43 ± 8 kJ·mol⁻¹). Aus den Geschwindigkeitskonstanten der langsam austauschenden Aminosäurereste von C87A/C104A-ONC wurde ein ΔG^0 von (37 ± 2) kJ·mol⁻¹ berechnet. Die über die H/D-Austauschexperimente bestimmten ΔG^0 -Werte von ONC und C87A/C104A-ONC stimmen mit den aus GndHCl-induzierten Übergangskurven bei pH 8,2 in 100% D₂O ermittelten Werten (ONC: $\Delta G^0 = 48,3 \pm 3,2$ kJ·mol⁻¹; C87A/C104A-ONC: $\Delta G^0 = 35,1 \pm 2,6$ kJ·mol⁻¹) überein (Anhang 12).

Weiterhin können im EX2-Mechanismus aus den Geschwindigkeitskonstanten der Austauschreaktion die Schutzfaktoren (PF) des jeweiligen Amidprotons errechnet werden (3.5.2.3). Diese sind als Funktion des entsprechenden Aminosäurerestes in Abb. 5-32 aufgetragen.

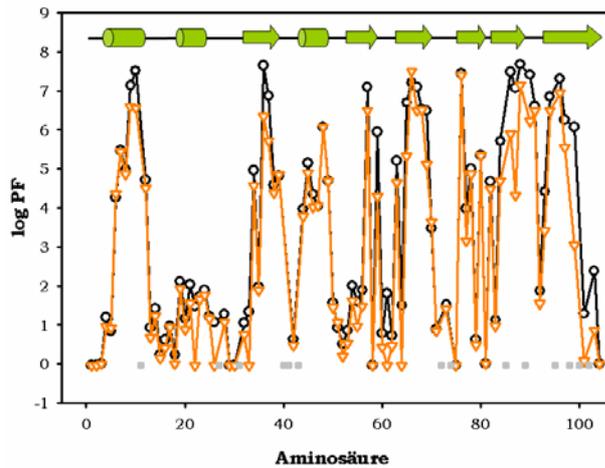


Abb. 5-32: Logarithmische Auftragung der Schutzfaktoren als Funktion der Aminosäuresequenz.

Die Schutzfaktoren der einzelnen Aminosäurereste von ONC sind schwarz, die von C87A/C104A-ONC orange dargestellt. ■ nicht zugeordnete bzw. nicht auswertbare Amidprotonen. Im oberen Teil der Abbildung sind die Sekundärstrukturelemente als Funktion der Aminosäuresequenz dargestellt.  - α -Helix,  - β -Faltblatt

Aus Abb. 5-32 wird deutlich, dass die Verteilung von starren und flexiblen Aminosäureresten in C87A/C104A-ONC und ONC vergleichbar ist. In beiden Molekülen ist der N-terminale Bereich (Aminosäurereste 1-5), die Region um die zweite α -Helix (Aminosäurereste 13-33), die *loop*-Region zwischen der dritten α -Helix und dem zweiten β -Faltblattstrang (Aminosäurereste 50-56), sowie der C-Terminus (Aminosäurereste 101-104) sehr flexibel. Alle weiteren Bereiche zeigen eine geringere Flexibilität.

Der Quotient der Schutzfaktoren von ONC und C87A/C104A-ONC gibt Auskunft über Amidprotonen, die in C87A/C104A-ONC eine höhere Flexibilität als in ONC aufweisen (Abb. 5-33).

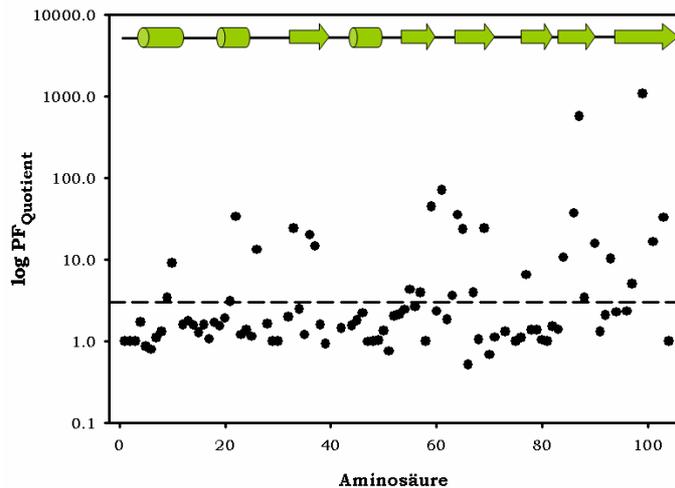


Abb. 5-33: Quotient der Schutzfaktoren von ONC und C87A/C104A-ONC als Funktion der Aminosäuresequenz.

Die Aminosäurereste, die in C87A/C104A-ONC einen um einen Faktor > 3 kleineren PF aufweisen (oberhalb gestrichelter Linie), sind in Abb. 5-34A blau dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung sind die Sekundärstrukturelemente als Funktion der Aminosäuresequenz dargestellt. \square - α -Helix, \rightarrow - β -Faltblatt

Die Aminosäurereste, die in C87A/C104A-ONC eine signifikant höhere Flexibilität (Faktor > 3) als in ONC aufweisen, sind in Abb. 5-34A dargestellt. Besonders Aminosäurereste im C-terminalen Teil, in der ersten α -Helix sowie im fünften und sechsten β -Faltblattstrang sind in C87A/C104A-ONC deutlich flexibler als in ONC.

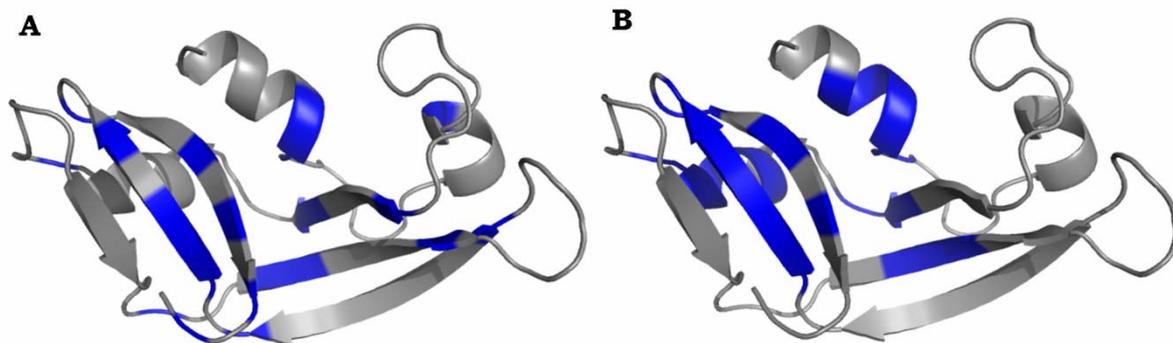


Abb. 5-34: Darstellung der Aminosäurereste, die in C87A/C104A-ONC eine signifikant höhere Flexibilität als in ONC aufweisen (A) und der Aminosäurereste die an der Bildung von I_{ONC} beteiligt sind (B).

A: Aminosäurereste in blau weisen in C87A/C104A-ONC eine um einen > 3 erhöhte Flexibilität auf. Sie wurden über den Quotienten der PF von ONC und C87A/C104A-ONC ermittelt (Abb. 5-33). B: Aminosäurereste in Blau sind an der Bildung von I_{ONC} beteiligt und wurden über *quenched-flow*-Analyse in Kombination mit NMR-Spektroskopie identifiziert (Abb. 5-22).

In Abb. 5-34B sind die Aminosäurereste dargestellt, die an der Bildung von I_{ONC} beteiligt sind (Abb. 5-22). Es wird deutlich, dass viele Aminosäurereste, die in C87A/C104A-ONC eine höhere Flexibilität als in ONC aufzeigen, an der Bildung von I_{ONC} beteiligt sind. Dies könnte eine Ursache für die Abwesenheit eines Intermediats während der Faltung von C87A/C104A-ONC sein.

6 Diskussion

6.1 Faltungsverhalten von Onconase

Dass die korrekte Faltung einer Polypeptidkette zu ihrer nativen Tertiärstruktur in der Aminosäuresequenz verschlüsselt sein muss, stellte Anfinsen bereits 1973 dar. Jedoch scheint nicht die gesamte Polypeptidkette notwendig zu sein, um die native Struktur zu definieren. Beispielsweise falten diverse Proteine mit einer geringen Primärsequenzidentität zu einer vergleichbaren Tertiärstruktur. Ebenso können Proteine mit hoher Sequenzidentität (>90%) in unterschiedliche Strukturen falten und so verschiedene Funktionen erfüllen (Dalal und Regan, 2000; He *et al.*, 2008). ONC und RNase A weisen eine Sequenzidentität von nur 28% (Mosimann *et al.*, 1994) auf. Ihre Tertiärstrukturen sind dennoch zum größten Teil vergleichbar (Abb. 3-13, Abb. 3-16). Jedoch unterscheidet sich ihre thermodynamische Stabilität um mehr als 20 kJ mol⁻¹ voneinander (Arnold *et al.*, 2006). Die Proteininstabilität steht mit der Proteinfaltung in engem Zusammenhang. So sind schnell rückfaltende Proteine meist stabiler als langsam rückfaltende, und langsam entfaltende Proteine stabiler als schnell entfaltende.

Um Informationen zur Ursache der hohen Stabilität von ONC gegenüber der von RNase A zu erhalten, sollte die Faltung beider Proteine verglichen werden. Weiterhin ist nicht bekannt, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der in der Primärsequenz codierten Information und dem Faltungsweg eines Proteins zur korrekten Tertiärstruktur besteht. Durch den Vergleich des Faltungsverhaltens zweier homologer Proteine, mit niedriger Sequenzidentität und dennoch nahezu gleicher Tertiärstruktur können Informationen zum Einfluss konservierter Aminosäurereste auf den Faltungsweg erlangt werden.

Über die Stabilität und das Faltungsverhalten von RNase A ist überdurchschnittlich viel bekannt. Auf Grund der verschiedenen durch Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktionen entstehenden entfalteten Spezies ist der Faltungsmechanismus von RNase A sehr komplex (3.7.1). Während der Rückfaltungsreaktionen der verschiedenen entfalteten Spezies wurden zahlreiche Intermediate beschrieben, und teilweise detailliert charakterisiert (Abb. 3-15).

Über das Faltungsverhalten von ONC ist hingegen wenig bekannt (3.6). Da in N_{ONC} alle Peptidyl-prolyl-Bindungen in *trans*-Konformation vorliegen konnte zunächst von einem einfachen Faltungsmodell von ONC ausgegangen werden.

Durch Untersuchung der Rückfaltungsreaktion von ONC mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie wurden jedoch drei Rückfaltungsphasen detektiert, deren Geschwindigkeitskonstanten ($k_{\text{fast}}^{\text{F}}$, $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$, $k_{\text{slow}}^{\text{F}}$) sich in Abwesenheit von GdnHCl um je einen Faktor von 10 voneinander unterscheiden. Das Vorhandensein mehrerer Faltungsphasen lässt auf die Existenz von Intermediaten schließen (3.2). Da das Fluoreszenzsignal von ONC hauptsächlich durch den in Position drei lokalisierten Tryptophanrest gegeben ist, könnten die drei Rückfaltungsphasen lokale Faltungsereignisse beschreiben. Durch die Untersuchung des Faltungsverhaltens von ONC in Gegenwart von ANS wurden die drei Rückfaltungsphasen jedoch als globale Faltungsereignisse identifiziert (5.2.1).

Die einzelnen Faltungsphasen konnten in der vorliegenden Arbeit definierten Faltungsreaktionen zugeordnet werden.

Dass die mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie bestimmbare langsame Rückfaltungsphase keine Abhängigkeit von der Denaturanzkonzentration zeigt (5.1.1), weist darauf hin, dass diese Faltungsphase durch eine Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktion verursacht wird. Obwohl in N_{ONC} alle Xaa-Pro Bindungen in *trans*-Konformation vorliegen und diese Konformation generell auch im entfalteten Zustand der *cis*-Konformation dominiert, sollten in U_{ONC} dennoch zwischen 10 und 30% (in Abhängigkeit von Xaa) der Peptidyl-prolyl-Bindungen in *cis*-Konformation vorliegen (3.3). Die Amplitude der langsamen Rückfaltungsphase entspricht in *stopped-flow*-initiierten Rückfaltungsexperimenten zwischen 20 und 30% (5.1), in NMR-spektroskopisch untersuchten Echtzeit-Rückfaltungsexperimenten ($21,7 \pm 2,8$)% (5.2.3) der Gesamtamplitude. Da bei den *quenched-flow*-Experimenten innerhalb der gerätebegrenzten, maximal einstellbaren Rückfaltungszeit von 5 s nur die schnelle und mittelschnelle Rückfaltungsreaktion durchlaufen werden, erreichen die Aminosäurereste einen maximalen Schutz von nur ca. 75% (5.4.2). Die fehlenden 25% entsprechen somit $k_{\text{slow}}^{\text{F}}$ (5.1). Letztendlich identifiziert die Aktivierungsenergie von ($74,5 \pm 0,2$) kJ·mol⁻¹ die langsame Rückfaltungsreaktion als eine Peptidyl-prolyl-*cis*-zu-*trans*-Isomerisierungsreaktion (5.2.4). Jedoch wird die langsame Rückfaltungsreaktion von ONC nicht durch die PPIasen Cyclophilin 18 und *Thermus* SlyD beschleunigt (5.2.2). Dies lässt darauf schließen, dass ONC kein Substrat für die beiden hier getesteten PPIasen ist. Die mittels Echtzeit-NMR-Spektroskopie verfolgte Rückfaltungsreaktion von ONC zeigt,

dass die Peptidyl-prolyl-*cis*-zu-*trans*-Isomerisierungsreaktion in U_{ONC} stattfindet (5.2.3).

In Vergleichsstudien der homologen Proteine ONC, RNase A und Agiogenin wurde auf Grund von ähnlichen Faltungsgeschwindigkeiten eine Peptidyl-prolyl-*cis*/*trans*-Isomerisierungsreaktion während der Faltung von ONC vermutet (Pradeep *et al.*, 2006). Mit den hier vorgestellten Messungen konnte diese Vermutung experimentell bestätigt werden.

Die mittelschnelle Rückfaltungsphase, welche mit $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ verläuft, wurde mit Hilfe von Doppelsprungexperimenten mit variierenden *delay*-Zeiten untersucht. So konnte gezeigt werden, dass während der mittelschnellen Rückfaltungsreaktion mit $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ N_{ONC} gebildet wird (5.2.5). Dies stimmt mit den Reaktivierungsdaten überein, welche zeigen, dass die katalytische Aktivität ebenfalls mit der mittelschnellen Rückfaltungsphase wiedererlangt wird (5.2.6). Auch die Untersuchung der Rückfaltungsreaktion von ONC mittels Echtzeit-NMR-Spektroskopie bestätigt, dass während der Totzeit der Messung, in der die schnelle und die mittelschnellen Rückfaltungsreaktion ablaufen, bereits 78,3% der Moleküle zu N_{ONC} falten (5.2.3).

Die schnelle Rückfaltungsphase, welche mit $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ verläuft, wurde mit Hilfe unterschiedlicher Doppelsprungexperimente genauer untersucht. Durch Doppelsprungexperimente mit variierenden *delay*-Zeiten wurden die Bildung und der Zerfall des mit $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ gebildeten Faltungszustands untersucht. Es wurde deutlich, dass dieser Zustand mit $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ gebildet wird und mit $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ zerfällt. Somit sind die schnelle und mittelschnelle Rückfaltungsphase direkt miteinander verknüpft. Da dieser Zustand direkt, ohne *lag*-Phase, gebildet wird (5.2.7), ist dieser ebenfalls direkt mit U_{ONC} verbunden. Diese Experimente identifizieren somit den mit $k_{\text{fast}}^{\text{F}}$ gebildeten Faltungszustand als *on-pathway*-Intermediat (I_{ONC}), welcher direkt mit N_{ONC} (welches mit $k_{\text{medium}}^{\text{F}}$ gebildet wird) und U_{ONC} verknüpft ist (5.2.7.1).

Durch Doppelsprungexperimente in variierende finale GdnHCl-Konzentrationen wurde die Entfaltungsreaktion von I_{ONC} detektiert (5.2.7.2). Diese mit $k_{\text{fast}}^{\text{U}}$ stattfindende Entfaltungsreaktion ist durch Einfachsprungexperimente nicht detektierbar, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Entfaltungsreaktion ($k_{\text{slow}}^{\text{U}}$) vor der Entfaltung von I_{ONC} stattfindet.

Die kinetischen Daten zur Faltung von ONC wurden mit Hilfe eines sequenziellen Faltungsmodells global angepasst (5.3). Der Faltungsweg von ONC lässt sich durch das sequenzielle Modell ausreichend beschreiben (5.3), auch wenn ein komplexeres Faltungsverhalten nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann. In Abb. 6-1 ist das sequenzielle Faltungsmodell von ONC dargestellt.

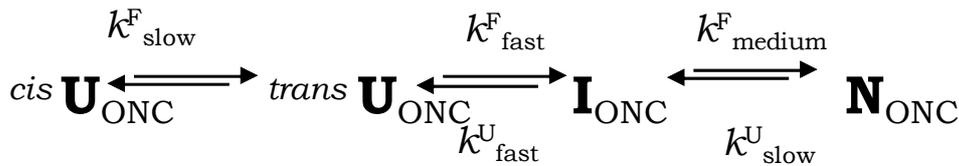


Abb. 6-1: Faltungsmodell von ONC.

Die Faltung verläuft über ein *on-pathway*- Intermediat (I_{ONC}). Der Rückfaltungsreaktion zu N_{ONC} geht eine Isomerisierungsreaktion im entfalteten Zustand ($^{\text{cis}}U_{\text{ONC}}$ nach $^{\text{trans}}U_{\text{ONC}}$) voraus. Die detektierbaren Faltungsreaktionen sind beschriftet. Dabei entsprechen $k^{\text{F}_{\text{fast}}}$, $k^{\text{F}_{\text{medium}}}$ und $k^{\text{F}_{\text{slow}}}$ den intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten der schnellen, mittelschnellen und langsamen Rückfaltungsphase, sowie $k^{\text{U}_{\text{fast}}}$ und $k^{\text{U}_{\text{slow}}}$ den intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten der schnellen und langsamen Entfaltungsphase.

Die Summe der aus den intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten ermittelten ΔG° -Werte für I_{ONC} ($\Delta G^{\circ} = 9,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) und N_{ONC} ($\Delta G^{\circ} = 42,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) weicht jedoch von der über GdnHCl-induzierte Übergangskurven ermittelten thermodynamischen Stabilität ($\Delta G^{\circ} = 61,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) ab. Diese Diskrepanz ist dadurch zu erklären, dass die Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktion im entfalteten Zustand nicht mit in die Anpassung der kinetischen Daten einbezogen wurde.

Über *quenched-flow*-Analyse in Kombination mit H/D-Austauschexperimenten und NMR-Spektroskopie konnten die an der Bildung von I_{ONC} beteiligten Aminosäurereste identifiziert werden (5.4). Diese sind hauptsächlich in der dritten α -Helix, sowie im fünften und sechsten β -Faltblattstrang lokalisiert (5.4.2). In diesen Regionen befinden sich vermehrt hydrophobe Aminosäurereste, die in ONC einen großen hydrophoben Cluster bilden (Kolbanovskaya *et al.*, 2000). I_{ONC} weist keine katalytische Aktivität auf (5.2.6). Die *quenched-flow*-Experimente zeigen, dass das für die Katalyse essentielle K31 in I_{ONC} noch keinen Schutz aufweist (5.4.2), was eine Erklärung für die fehlende Aktivität in I_{ONC} darstellen könnte.

Während der Faltung von komplett reduzierter ONC finden sich zunächst die Disulfidbrücken C48-C90 und C87-C104. Erst später werden die Disulfidbrücken C19-C68 und C30-C75 ausgebildet (Gahl *et al.*, 2008). Die zuerst gebildeten Disulfidbrücken sind in der C-terminalen Region lokalisiert, die auch in I_{ONC} bereits gefaltet vorliegt. Dies verdeutlicht, dass der Faltungsweg von ONC unabhängig von der Ausbildung der Disulfidbrücken im entfalteten Zustand in der C-terminalen Region beginnt.

6.2 Vergleich des Faltungsverhaltens von Onconase und RNase A

Das Faltungsverhalten von ONC ist im Vergleich zu dem von RNase A weniger komplex, da nur die Spezies mit allen Peptidyl-prolyl-Bindungen in nativer Konformation zurück falten können. Unter den gewählten Faltungsbedingungen wurden keine Hinweise auf parallel faltende Spezies gefunden. Bei RNase A falten hingegen auch entfaltete Spezies mit nicht-nativen Peptidyl-prolyl-Bindungen zurück, was einen Grund für das Vorhandensein weiterer Faltungsphasen darstellt. Auch während der Entfaltungsreaktion von RNase A wurden parallel Entfaltungsereignisse beschrieben (Kiefhaber und Baldwin, 1995; Juneja und Udgaonkar, 2002). Die Untersuchung der Entfaltungsreaktion von ONC mittels Einzelsprungexperimenten in Kombination mit Fluoreszenz- und Echtzeit-NMR Spektroskopie verdeutlicht, dass die Entfaltung von ONC eine globale Gesamtreaktion darstellt. Es wurden keine parallel entfaltenden Spezies detektiert (5.2.8).

Bei Vergleichen zur Rückfaltungsreaktion von ONC und RNase A bietet es sich an, nur die Faltungswege beider Protein zu vergleichen, welche von Molekülen mit allen Peptidyl-prolyl-Bindungen in nativer Konformation ausgehen. Wie in Abb. 3-15 dargestellt, treten während der entsprechenden Rückfaltungsphase von RNase A (U_{vf}) zwei Intermediate auf. Zunächst wird das stark entfaltete I_U gebildet, das zu I_Φ weiterfaltet. I_Φ weist bereits ausgebildete Tertiärstrukturanteile auf (Houry und Scheraga, 1996a; b). Mittels *quenched-flow*-Analyse in Kombination mit 2D-NMR-Spektroskopie wurden die Aminosäurereste identifiziert, die an der Bildung von I_Φ beteiligt sind. Dabei wurden jedoch nur 21 der 124 in RNase A vorkommenden Aminosäureresten untersucht. Von diesen wurden 8 Aminosäuren identifiziert, die direkt an der Bildung von I_Φ beteiligt sind. Auf Grund der Ergebnisse wird vorgeschlagen, dass die Aminosäurereste 24 bis 34, die in RNase A die zweite α -Helix bilden, an der Bildung von I_Φ beteiligt sind. Weiterhin sind in I_Φ die Aminosäurereste 106 bis 118 gefaltet, die den fünften und sechsten β -Faltblattstrang formen (Anhang 13). Die Region von Aminosäurerest 106 bis 124 wird in der Literatur auch als potenzielle Faltungsregion von RNase A beschrieben (Matheson und Scheraga, 1978; Coll *et al.*, 1999).

Die an der Bildung von I_{ONC} beteiligten Aminosäurereste sind ebenfalls hauptsächlich in der dritten α -Helix, sowie im fünften und sechsten β -Faltblattstrang lokalisiert (5.4.2). Die strukturelle Zusammensetzung von I_{ONC} (5.4) ist somit teilweise mit der von I_Φ vergleichbar. In beiden Proteinen ist der Bereich um den

fünften und sechsten β -Faltblattstrang an der Intermediatsbildung beteiligt. In ONC können keine Informationen zur Beteiligung der zweiten α -Helix an I_{ONC} erteilt werden, da diese in N_{ONC} stark flexibel ist und daher die dort lokalisierten Aminosäurereste nicht hinsichtlich ihres Schutzes in I_{ONC} ausgewertet werden können (5.4.1). Bei den Experimenten zur Bildung von I_{Φ} wurden hingegen keine Aussagen zum Einfluss der Aminosäurereste der dritten α -Helix von RNase A gemacht.

Die Ergebnisse zur Faltung und insbesondere die vergleichbare Zusammensetzung von I_{Φ} und I_{ONC} zeigen, dass im Fall der Homologen RNase A und ONC nicht nur die verwandte Tertiärstruktur, von der zu 72% unterschiedlichen Aminosäuresequenz definiert wird, sondern auch der Faltungsweg über ein konserviertes Intermediat führt.

Auch das Faltungsintermediat I_1 , welches während der langsamen Rückfaltungsreaktion U_s^{II} von RNase A auftritt (Abb. 3-15), wurde strukturell charakterisiert. In I_1 zeigen 14 Amidprotonen einen starken Schutz gegen H/D-Austausch (Udgaonkar und Baldwin, 1990). Diese Protonen sind in der dritten α -Helix sowie vereinzelt in den β -Faltblattsträngen lokalisiert (Anhang 13). In I_1 liegt jedoch die Peptidyl-prolyl-Bindung Y92-P93 in nicht-nativer Konformation vor. Da die strukturelle Zusammensetzung von I_1 und I_{ONC} dennoch weitgehend ähnlich ist, kann die oben erwähnte Aussage soweit erweitert werden, dass selbst unabhängig von der Konformation der Peptidyl-prolyl-Bindungen (nativ oder nicht-nativ), die initialen Schritte der Faltung von ONC und RNase A vergleichbar sind.

Auch innerhalb anderer Proteinfamilien wurde über vergleichbare, konservierte Faltungsmechanismen berichtet. So konnte für mehrere in Prokaryoten und Eukaryoten vorkommende Mitglieder der Cytochrom c Superfamilie ein konservierter Faltungsweg über ein partiell strukturiertes Intermediat nachgewiesen werden (Travaglini-Allocatelli *et al.*, 2004). Auch kinetische Untersuchungen fünf unterschiedlicher PDZ-Domänen, welche eine vergleichbare Tertiärstruktur, jedoch unterschiedliche Primärsequenzen aufweisen, deutet auf einen konservierten Faltungsweg dieser Domänen hin (Chi *et al.*, 2007). Weiterhin wird für SH-Domänen (Martinez und Serrano, 1999), mesophile, thermophile und hyperthermophile Kälteschockproteine (Perl *et al.*, 1998), sowie für Proteine mit Immunglobulin-ähnlicher Tertiärstruktur (Clarke *et al.*, 1999; Friel *et al.*, 2003) ein gemeinsamer Faltungsweg postuliert bzw. detailliert beschrieben.

Frühere Untersuchungen zum Faltungsverhalten verschiedener pankreatischer RNasen mit Sequenzidentitäten $>85\%$ hatten bereits vergleichbare Faltungsphasen aufgezeigt, woraufhin ein konservierter Faltungsmechanismus innerhalb der

RNase A Superfamilie postuliert wurde (Krebs *et al.*, 1983; 1985). Eine vergleichende Untersuchung des Faltungsverhaltens von Angiogenin und RNase A, die eine Sequenzidentität von 36% aufweisen, zeigte ebenfalls vergleichbare Faltungsphasen auf (Pradeep *et al.*, 2006).

Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen somit auf struktureller Ebene die frühere Vermutung, dass innerhalb der RNase A Superfamilie ein Faltungsweg teilweise konserviert ist. Weiterhin wird gezeigt, dass nur eine geringe Anzahl an konservierten Aminosäureresten ausreichend ist, um initiale Interaktionen zu ermöglichen und so den Faltungsweg zur definierten Tertiärstruktur zu leiten. Diese initialen Interaktionen scheinen sogar unabhängig von der Konformation der Peptidyl-prolyl-Bindungen (nativ oder nicht-nativ) zu sein.

6.3 Einfluss der C-terminalen Disulfidbrücke auf die Faltung von Onconase

Disulfidbrücken liefern bekanntlich einen großen Beitrag zur Proteinstabilität (Pace *et al.*, 1988). Die Eliminierung der in RNase A nicht vorhandenen C-terminalen Disulfidbrücke in ONC (C87A/C104A-ONC), führt in ONC zu einer Verminderung der thermodynamischen Stabilität um mehr als $30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, was auf eine im Vergleich zu ONC langsamere Rück- und zusätzlich schnellere Entfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC zurück zu führen ist (Schulenburg, 2005; Arnold *et al.*, 2006).

Nach Gleichung 3-16 führt die Eliminierung der C-terminalen Disulfidbrücke zu einer Stabilisierung des entfalteten Zustands um ca. $8,82 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Dies würde die langsamere Rückfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC im Vergleich zu ONC erklären.

Wie in Arnold *et al.* (2006) aufgeführt, beruht die verminderte Stabilität von C87A/C104A-ONC jedoch hauptsächlich auf einer schnelleren Entfaltungsreaktion. Somit beeinflusst die eingeführte Mutation neben der Entropie des entfalteten Zustands auch die native Struktur. Die Tertiärstrukturen von C87A/C104A-ONC und ONC sind jedoch weitgehend identisch (5.5.2.1, 5.5.2.2.).

Die sowohl in der Kristall- als auch in der NMR-Struktur von C87A/C104A-ONC veränderte Orientierung der Seitenkette von H97 (Abb. 5-29), die Teil des aktiven Zentrums ist (3.6.), könnte die um 36% verminderte Aktivität von C87A/C104A-ONC (Arnold *et al.*, 2006) erklären. Andere Varianten, die ebenfalls keine C-termi-

nale Disulfidbrücke aufweisen (C87S/des104-ONC, C87S/des103-104-ONC), zeigen vergleichbare Aktivitäten (Notomista, 2001). Jedoch ist in der Kristallstruktur der Variante C87S/des103-104-ONC keine Änderung der Orientierung des entsprechenden Restes erkennbar (Merlino *et al.*, 2005).

Durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen mit *stopped-flow*-Mischung wurde deutlich, dass das Faltungsverhalten von C87A/C104A-ONC im Vergleich zu ONC verändert ist. Während der Rückfaltungsreaktion sind auch mit *stopped-flow*-Mischung keine schnellen Faltungseignisse detektierbar. Die Doppelsprungexperimente bestätigen dass während der Rückfaltung von C87A/C104A-ONC kein Intermediat durchlaufen oder nicht ausreichend populiert wird. Würde die Rückfaltungsreaktion von C87A/C104A-ONC über I_{ONC} verlaufen, so müsste auf Grund der mikroskopischen Reversibilität auch die Entfaltungsreaktion, genau wie in ONC, über I_{ONC} verlaufen. Im Chevron-Plot müssten daher die Entfaltungsäste beider Proteine einen vergleichbaren Anstieg aufweisen. Da die Entfaltungsäste von C87A/C104A-ONC und ONC jedoch veränderte Anstiege zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass C87A/C104A-ONC einen anderen Faltungsmechanismus als ONC aufweist.

In U_{ONC} findet eine Peptidyl-prolyl-*cis*-zu-*trans*-Isomerisierungsreaktion statt, die vor der eigentlichen Faltungsreaktion stattfindet. Die Isomerisierungsreaktion wird im Chevron-Plot (Abb. 5-15) durch $k_{\text{slow}}^{\text{F}}$ beschrieben. Im Fall von C87A/C104A-ONC ist nur eine Faltungsreaktion messbar. Diese Reaktion ist bei 0 M GdnHCl vergleichbar, mit steigenden GdnHCl-Konzentrationen jedoch langsamer als die Peptidyl-prolyl-*cis*-zu-*trans*-Isomerisierungsreaktion in ONC (Abb. 5-25). Da die Eliminierung der C-terminalen Disulfidbrücke keinen Einfluss auf die Konformation der Peptidyl-prolyl-Bindungen im nativen Zustand hat (Abb. 5-28), kann davon ausgegangen werden, dass, wie bei ONC, auch bei C87A/C104A-ONC eine Peptidyl-prolyl-*cis*-zu-*trans*-Isomerisierungsreaktion im entfalteten Zustand stattfindet. Bei C87A/C104A-ONC sollte der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion jedoch vor der Isomerisierungsreaktion stattfinden, wodurch diese nicht detektierbar ist.

Da die Tertiärstrukturen von C87A/C104A-ONC und ONC weitgehend übereinstimmen, könnte eine veränderte Proteindynamik zur Änderung des Faltungsverhaltens führen. Die Moleküldynamik von C87A/C104A-ONC und ONC in Amidprotonenaustauschexperimenten (3.5.2.3) zeigt, dass die Verteilung flexibler und starrer Aminosäurereste in beiden Proteinen sehr ähnlich ist (Abb. 5-32). Sowohl in ONC als auch in C87A/C104A-ONC sind die Bereiche um die zweite α -Helix sowie die *loop*-Regionen stark flexibel. Ähnliches wurde für die Variante C87S/des103-

104-ONC im Vergleich zu ONC über Dynamiksimulationen aus Kristallstrukturen beschrieben (Merlino *et al.*, 2005). Die Verteilung von starren und flexiblen Aminosäureresten aus den Simulationsstudien an Kristallstrukturen ist vergleichbar mit den hier präsentierten Amidprotonenaustauschdaten.

Aus dem Verhältnis der Schutzfaktoren von ONC und C87A/C104A-ONC wurden Informationen hinsichtlich stark veränderter Flexibilitäten einzelner Aminosäurereste erhalten. So wurde deutlich, dass 11 der 21 Aminosäurereste, welche eine um einen Faktor > 3 erhöhte Flexibilität in C87A/C104A-ONC aufweisen als in ONC, an der Bildung von I_{ONC} in ONC beteiligt sind. Die höhere Flexibilität dieser Reste in C87A/C104A-ONC scheint die Ausbildung von I_{ONC} zu behindern, wodurch die Faltung von C87A/C104A-ONC nicht mehr gezielt zum nativen Zustand gelenkt wird. Dies erklärt wiederum die langsamere Rückfaltungsreaktion, welche eine Ursache für die verminderte Stabilität von C87A/C104A-ONC darstellt. Daraus erklärt sich, dass das Durchlaufen von I_{ONC} die Faltung von ONC zu N_{ONC} dirigiert, wodurch die Rückfaltungsreaktion beschleunigt wird. Die schnelle Rückfaltungsreaktion begründet unter anderem die hohe Stabilität von ONC. Folglich ist die Bildung von I_{ONC} essentiell für die extrem hohe thermodynamische Stabilität von ONC.

Obwohl in RNase A die in ONC vorhandene C-terminale Disulfidbrücke nicht existiert, verläuft die Rückfaltungsreaktion von RNase A dennoch über ein konserviertes Intermediat. Somit kann trotz fehlender kovalenter Fixierung dieser Region ein Intermediat gebildet werden. Da auch die Faltungsregion von RNase A in der C-terminalen Region vermutet wird (Matheson und Scheraga, 1978; Coll *et al.*, 1999), könnte davon ausgegangen werden, dass diese Region in RNase A alternativ stabilisiert ist. Die Sequenzidentität des C-terminalen Bereiches, die die fünften und sechsten β -Faltblattstränge (jeweils die letzten 20 Aminosäurereste von RNase A bzw. ONC) beinhalten, ist mit 40% relativ hoch. Aus Betrachtungen der Kristallstruktur von RNase A im Vergleich zu ONC wird sichtbar, dass eine im Vergleich zu ONC extrem verlängerte *loop*-Struktur in RNase A zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zu D121 eingeht (Anhang 14). Es lässt sich vermuten, dass die zwei zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen von K66 (lokalisiert in der *loop*-Region zwischen der dritten α -Helix und dem fünften β -Faltblattstrang) zu D121 die C-terminale Faltungsregion von RNase A zusätzlich stabilisieren und somit die Bildung von I_{ϕ} ermöglichen. In ONC ist diese *loop*-Region hingegen stark verkürzt, wodurch keine zusätzlichen Wechselwirkungen zustande kommen.

Änderungen am C-Terminus von RNase A haben unterschiedliche Einflüsse auf die Stabilität und Rückfaltungsgeschwindigkeit von RNase A. So wird beispielsweise

durch die kovalente Verbrückung des C-Terminus an den N-Terminus die thermische Stabilität von RNase A um 5 K erhöht (Klink und Raines, 2000). Eine zusätzliche inseriert C-terminale Disulfidbrücke in RNase A resultiert hingegen in einer Verringerung bzw. überhaupt keinem Einfluss auf die thermodynamische Stabilität (Pecher und Arnold, 2009). Jedoch führt die Fixierung der Peptidyl-prolyl-Bindung N113-P114 in ihrer nativen *cis*-Konformation zu einer erhöhten Stabilität von RNase A. Diese wird durch eine schnellere Rückfaltungsreaktion verursacht (Arnold *et al.*, 2003). Die Peptidyl-prolyl-Bindungen Y92-P93 und N113-P114 liegen im entfalteten Zustand U_s^{II} in nicht-nativer Konformation vor (Abb. 3-14). Während der Rückfaltungsreaktion von U_s^{II} werden zwei Intermediate durchlaufen (Abb. 3-15) (Udgaonkar und Baldwin, 1990). Vermutlich führt die fixierte native Konformation der Peptidyl-prolyl-Bindung N113-P114 (Arnold *et al.*, 2003), die im β -turn zwischen dem fünften und sechsten β -Faltblattstrang lokalisiert ist, die in der C-terminalen Region befindlichen Resten in unmittelbare Nähe. Somit können diese Reste schneller interagieren und darauf hin schneller in den nativen Zustand zurück falten.

Generell können nur Vermutungen zur Stabilisierung der C-terminalen Faltungsregion von RNase A gemacht werden. Die hohe Stabilität von ONC basiert jedoch auf einer effektiven Stabilisierung der Faltungsregion im C-terminalen Bereich durch eine kovalente Disulfidverbrückung. So wird die Bildung von I_{ONC} ermöglicht, welches die Faltungsreaktion schnell und effizient zur definierten nativen Struktur leitet.

7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Ursachen für die im Vergleich zu anderen RNasen extrem hohe thermodynamische Stabilität von ONC aufzuzeigen. Da die Proteinstabilität in enger Beziehung zur Proteinfaltung steht, wurde das Faltungsverhalten von ONC detailliert untersucht.

Mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie wurden während der Rückfaltung von ONC drei Phasen detektiert (eine schnelle, eine mittelschnelle und eine langsame Phase), deren Geschwindigkeiten sich jeweils um einen Faktor von 10 voneinander unterscheiden. Rückfaltungsexperimente in Gegenwart von ANS verdeutlichten, dass die drei beobachtbaren Faltungsphasen globale Faltungsereignisse darstellen. Durch Echtzeit-NMR-Rückfaltungsexperimente und die Bestimmung der Aktivierungsenergie konnte die langsame Rückfaltungsphase einer Peptidyl-prolyl-*cis*-zu-*trans*-Isomerisierungsreaktion im entfalteten Zustand von ONC zugeordnet werden. Mit Hilfe von Doppelsprungexperimenten und der Untersuchung der Reaktivierung von ONC wurde deutlich, dass die mittelschnelle Rückfaltungsphase zu nativem Protein führt. Die Bildung und der Zerfall des mit der schnellen Rückfaltungsphase gebildeten Zustands wurden durch Doppelsprungexperimente mit variierenden *delay*-Zeiten analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die schnelle Rückfaltungsphase durch die Bildung eines *on-pathway*-Intermediats (I_{ONC}) verursacht wird.

Die kinetischen Daten konnten durch ein sequenzielles Faltungsmodell ausreichend beschrieben werden.

Mit Hilfe von *quenched-flow*-Experimenten in Kombination mit H/D-Austausch und 2D-NMR-Spektroskopie konnten Aussagen zur strukturellen Zusammensetzung von I_{ONC} gemacht werden. In I_{ONC} sind bereits hydrophobe Bereiche, sowie die C-terminale Proteinregion strukturiert. I_{ONC} weist eine vergleichbare Komposition zu mindestens einem während der Faltung von RNase A auftretenden Intermediat auf. Somit wird gezeigt, dass nicht nur die tertiäre Struktur der beiden homologen Proteine RNase A und ONC analog sind, sondern dass auch der Faltungsweg teilweise konserviert ist. Da die Sequenzidentität beider Proteine nur 28% beträgt, wird deutlich, dass eine geringe Anzahl an konservierten Aminosäureresten ausreichend ist, um in homologen Proteinen vergleichbare initiale Interaktionen zu ermöglichen und so die Faltung effektiv zur nativen Struktur zu lenken.

Faltungsuntersuchungen zur Variante C87A/C104A-ONC, bei der die C-terminale Disulfidbrücke eliminiert, und somit die thermodynamische Stabilität um mehr als $30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ vermindert wurde, verdeutlichten, dass auch mit Hilfe von *stopped-flow*-Fluoreszenzmessungen (Einzel- und Doppelsprungexperimente) keine schnellen Faltungsphasen beobachtet werden konnten. Somit wird während der Faltung von C87A/C104A-ONC kein Intermediat populiert. Durch die Bestimmung der Kristall- und NMR-Struktur von C87A/C104A-ONC konnte gezeigt werden, dass die Mutationen keinen erheblichen Einfluss auf die Tertiärstruktur haben. Jedoch zeigten vergleichende Untersuchungen zur Dynamik von C87A/C104A-ONC und ONC Unterschiede in der Flexibilität. 11 der 21 Aminosäurereste, die eine deutlich höhere Flexibilität in C87A/C104A-ONC aufweisen als in ONC, sind in ONC an der Bildung von I_{ONC} beteiligt. Die erhöhte Flexibilität scheint die Ausbildung von I_{ONC} in C87A/C104A-ONC zu verhindern. Da die Faltung nicht über ein Intermediat zum nativen Zustand geleitet wird, läuft diese verlangsamt ab, was ein Grund für die geringe Stabilität von C87A/C104A-ONC darstellt. Damit wird gezeigt, dass die hohe Stabilität von ONC auf einer effektiven Stabilisierung der C-terminalen Region beruht. Durch die Bildung von I_{ONC} wird dann die Faltung schnell und effizient zur nativen Struktur geleitet.

8 Literaturverzeichnis

- Adams, P.D., Grosse-Kunstleve, R.W., Hung, L.W., Ioerger, T.R., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Read, R.J., Sacchettini, J.C., Sauter, N.K., and Terwilliger, T.C. 2002. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 1948-1954.
- Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230.
- Anfinsen, C.B., Redfield, R.R., Choate, W.L., Page, J., and Carroll, W.R. 1954. Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. *J Biol Chem* **207**: 201-210.
- Ardelt, B., Ardel, W., and Darzynkiewicz, Z. 2003. Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi). *Cell Cycle* **2**: 22-24.
- Ardelt, W., Mikulski, S.M., and Shogen, K. 1991. Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *J Biol Chem* **266**: 245-251.
- Arnold, U. 2008. Aspects of the cytotoxic action of ribonucleases. *Curr Pharm Biotechnol* **9**: 161-168.
- Arnold, U., Hinderaker, M.P., Köditz, J., Golbik, R., Ulbrich-Hofmann, R., and Raines, R.T. 2003. Protein prosthesis: a nonnatural residue accelerates folding and increases stability. *J Am Chem Soc* **125**: 7500-7501.
- Arnold, U., Schulenburg, C., Schmidt, D., and Ulbrich-Hofmann, R. 2006. Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics. *Biochemistry* **45**: 3580-3587.
- Bachmann, A. and Kiefhaber, T. 2005. *Kinetic mechanisms in protein folding. Protein Folding Handbook*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Bai, Y., Milne, J.S., Mayne, L., and Englander, S.W. 1993. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**: 75-86.
- Balbach, J., Forge, V., van Nuland, N.A., Winder, S.L., Hore, P.J., and Dobson, C.M. 1995. Following protein folding in real time using NMR spectroscopy. *Nat Struct Biol* **2**: 865-870.
- Baldwin, R.L. 1996. On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Fold Des* **1**: R1-8.
- Barnard, E.A. 1969. Biological function of pancreatic ribonuclease. *Nature* **221**: 340-344.
- Beintema, J.J., Breukelman, H.J., Carsana, A., and Furia, A. 1997. Evolution of vertebrate ribonucleases: Ribonuclease A superfamily. In *Ribonucleases: Structures and functions*, 1st ed. (eds. G. D'Alessio, and J.F. Riordan), pp. 245-269. Academic Press, New York.
- Betz, S.F. and Pielak, G.J. 1992. Introduction of a disulfide bond into cytochrome c stabilizes a compact denatured state. *Biochemistry* **31**: 12337-12344.
- Bhat, R., Wedemeyer, W.J., and Scheraga, H.A. 2003. Proline isomerization in bovine pancreatic ribonuclease A. 2. Folding conditions. *Biochemistry* **42**: 5722-5728.
- Blank, A. and Dekker, C.A. 1981. Ribonucleases of human serum, urine, cerebrospinal fluid, and leukocytes. Activity staining following electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Biochemistry* **20**: 2261-2267.
- Boix, E., Wu, Y., Vasandani, V.M., Saxena, S.K., Ardel, W., Ladner, J., and Youle, R.J. 1996. Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *J Mol Biol* **257**: 992-1007.
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R., and Brennan, M. 1975. Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**: 4953-4963.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. 1998. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**: 905-921.
- Bulaj, G. 2005. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnol Adv* **23**: 87-92.

- Cheng, H.N. and Bovey, F.A. 1977. Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycyl-L-proline. *Biopolymers* **16**: 1465-1472.
- Chi, C.N., Gianni, S., Calosci, N., Travaglini-Allocatelli, C., Engstrom, K., and Jemth, P. 2007. A conserved folding mechanism for PDZ domains. *FEBS Lett* **581**: 1109-1113.
- Clarke, J., Cota, E., Fowler, S.B., and Hamill, S.J. 1999. Folding studies of immunoglobulin-like beta-sandwich proteins suggest that they share a common folding pathway. *Structure* **7**: 1145-1153.
- Coll, M.G., Protasevich, I.I., Torrent, J., Ribó, M., Lobachov, V.M., Makarov, A.A., and Vilanova, M. 1999. Valine 108, a chain-folding initiation site-belonging residue, crucial for the ribonuclease A stability. *Biochem Biophys Res Commun* **265**: 356-360.
- Connelly, G.P., Bai, Y., Jeng, M.F., and Englander, S.W. 1993. Isotope effects in peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**: 87-92.
- Cook, K.H., Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. 1979. Role of proline isomerization in folding of ribonuclease A at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 6157-6161.
- Curtis, P.J., Burdon, M.G., and Smellie, R.M. 1966. The purification from rat liver of a nuclease hydrolysing ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. *Biochem J* **98**: 813-817.
- Dalal, S. and Regan, L. 2000. Understanding the sequence determinants of conformational switching using protein design. *Protein Sci* **9**: 1651-1659.
- Darzynkiewicz, Z., Carter, S.P., Mikulski, S.M., Ardelt, W.J., and Shogen, K. 1988. Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent. *Cell Tissue Kinet* **21**: 169-182.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. 1995. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* **6**: 277-293.
- Dill, K.A., Ozkan, S.B., Shell, M.S., and Weikl, T.R. 2008. The protein folding problem. *Annu Rev Biophys* **37**: 289-316.
- Dobson, C.M. 1991. NMR spectroscopy and protein folding: studies of lysozyme and alpha-lactalbumin. *Ciba Found Symp* **161**: 167-181; discussion 181-169.
- Dodge, R.W., Laity, J.H., Rothwarf, D.M., Shimotakahara, S., and Scheraga, H.A. 1994. Folding pathway of guanidine-denatured disulfide-intact wild-type and mutant bovine pancreatic ribonuclease A. *J Protein Chem* **13**: 409-421.
- Dodge, R.W., and Scheraga, H.A. 1996. Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* **35**: 1548-1559.
- Doig, A.J. and Williams, D.H. 1991. Is the hydrophobic effect stabilizing or destabilizing in proteins? The contribution of disulphide bonds to protein stability. *J Mol Biol* **217**: 389-398.
- Doig, A.J., Williams, D.H., and Sauer, R.T. 1990. Surface areas of unfolded proteins. *Nature* **348**: 397.
- Doyle, D.F., Waldner, J.C., Parikh, S., Alcazar-Roman, L., and Pielak, G.J. 1996. Changing the transition state for protein (Un) folding. *Biochemistry* **35**: 7403-7411.
- Eftink, M.R. and Ghiron, C.A. 1976. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* **15**: 672-680.
- Eftink, M.R. and Shastry, M.C. 1997. Fluorescence methods for studying kinetics of protein-folding reactions. *Methods Enzymol* **278**: 258-286.
- Emsley, P. and Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2126-2132.
- Fanghanel, J. and Fischer, G. 2004. Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front Biosci* **9**: 3453-3478.
- Fersht, A.R. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. 1985. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* **24**: 5480-5486.
- Fischer, G. and Bang, H. 1985. The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochim Biophys Acta* **828**: 39-42.
- Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. 1984. Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta* **43**: 1101-1111.

- Flory, P.J. 1956. Theory of elastic mechanism in fibrous proteins. *J Am Chem Soc* **78**: 5222-5235.
- Freedman, R.B., Hillson, D.A., and Creighton, T.E. 1981. Disulphide-bound formation in protein folding catalysed by highly-purified protein disulphide-isomerase. *Biochem Soc Trans* **9**: 78-80.
- Friel, C.T., Capaldi, A.P., and Radford, S.E. 2003. Structural analysis of the rate-limiting transition states in the folding of Im7 and Im9: similarities and differences in the folding of homologous proteins. *J Mol Biol* **326**: 293-305.
- Gahl, R.F., Narayan, M., Xu, G., and Scheraga, H.A. 2008. Dissimilarity in the oxidative folding of onconase and ribonuclease A, two structural homologues. *Protein Eng Des Sel* **21**: 223-231.
- Galat, A. 1993. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem* **216**: 689-707.
- Garel, J.R. and Baldwin, R.L. 1973. Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 3347-3351.
- Gorbatyuk, V., Chen, Y.C., Wu, Y.J., Youle, R.J., and Huang, T.H. 1999. Sequence-specific ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of recombinant onconase/P-30 protein. *J Biomol NMR* **15**: 343-344.
- Grathwohl, C. and Wüthrich, K. 1981. NMR studies of the rates of proline cis-trans isomerization in oligopeptides. *Biopolymers* **20**: 2623-2633.
- He, Y., Chen, Y., Alexander, P., Bryan, P.N., and Orban, J. 2008. NMR structures of two designed proteins with high sequence identity but different fold and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 14412-14417.
- Hornig, J.C., Tracz, S.M., Lumb, K.J., and Raleigh, D.P. 2005. Slow folding of a three-helix protein via a compact intermediate. *Biochemistry* **44**: 627-634.
- Houry, W.A., Rothwarf, D.M., and Scheraga, H.A. 1994. A very fast phase in the refolding of disulfide-intact ribonuclease A: implications for the refolding and unfolding pathways. *Biochemistry* **33**: 2516-2530.
- Houry, W.A. and Scheraga, H.A. 1996a. Nature of the unfolded state of ribonuclease A: effect of cis-trans X-Pro peptide bond isomerization. *Biochemistry* **35**: 11719-11733.
- Houry, W.A. and Scheraga, H.A. 1996b. Structure of a hydrophobically collapsed intermediate on the conformational folding pathway of ribonuclease A probed by hydrogen-deuterium exchange. *Biochemistry* **35**: 11734-11746.
- Hubbard, S.J. 1998. The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim Biophys Acta* **1382**: 191-206.
- Hvidt, A. and Nielsen, S.O. 1966. Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem* **21**: 287-386.
- Ikai, A. and Tanford, C. 1973. Kinetics of unfolding and refolding of proteins. I. Mathematical analysis. *J Mol Biol* **73**: 145-163.
- Jaenicke, R. 1996. How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability? *Naturwissenschaften* **83**: 544-554.
- Jeong, M.Y., Kim, S., Yun, C.W., Choi, Y.J., and Cho, S.G. 2007. Engineering a de novo internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *J Biotechnol* **127**: 300-309.
- Johnson, B.A. 2004. Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol Biol* **278**: 313-352.
- Johnson, R.J., McCoy, J.G., Bingman, C.A., Phillips, G.N., Jr., and Raines, R.T. 2007. Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein. *J Mol Biol* **368**: 434-449.
- Juneja, J. and Udgaonkar, J.B. 2002. Characterization of the unfolding of ribonuclease a by a pulsed hydrogen exchange study: evidence for competing pathways for unfolding. *Biochemistry* **41**: 2641-2654.
- Kiefhaber, T. and Baldwin, R.L. 1995. Kinetics of hydrogen bond breakage in the process of unfolding of ribonuclease A measured by pulsed hydrogen exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2657-2661.
- Kiefhaber, T., Labhardt, A.M., and Baldwin, R.L. 1995. Direct NMR evidence for an intermediate preceding the rate limiting step in the unfolding of ribonuclease A. *Nature* **375**: 513-515.

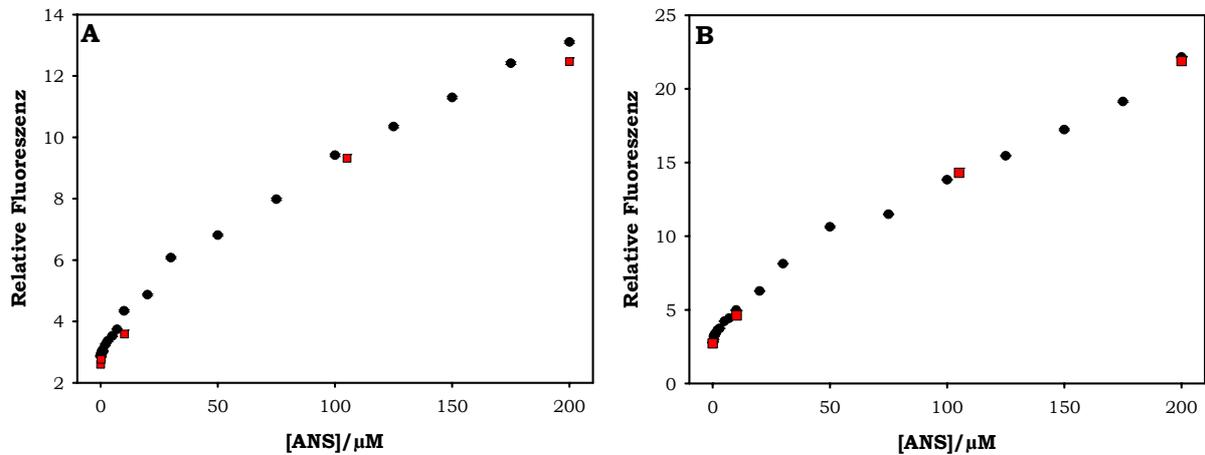
- Kim, B.M., Kim, H., Raines, R.T., and Lee, Y. 2004. Glycosylation of onconase increases its conformational stability and toxicity for cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 976-983.
- Klink, T.A. and Raines, R.T. 2000. Conformational stability is a determinant of ribonuclease A cytotoxicity. *J Biol Chem* **275**: 17463-17467.
- Kobe, B., Ma, Z., and Deisenhofer, J. 1994. Complex between bovine ribonuclease A and porcine ribonuclease inhibitor crystallizes in a similar unit cell as free ribonuclease inhibitor. *J Mol Biol* **241**: 288-291.
- Koide, S., Jahnke, W., and Wright, P.E. 1995. Measurement of intrinsic exchange rates of amide protons in a ¹⁵N-labeled peptide. *J Biomol NMR* **6**: 306-312.
- Kolbanovskaya, E.Y., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Mukhortov, V.G., Ardelt, W., Beintema, J.J., and Karpeisky, M.Y. 2000. Localization and analysis of nonpolar regions in onconase. *Cell Mol Life Sci* **57**: 1306-1316.
- Krebs, H., Schmid, F.X., and Jaenicke, R. 1983. Folding of homologous proteins. The refolding of different ribonucleases is independent of sequence variations, proline content and glycosylation. *J Mol Biol* **169**: 619-635.
- Krebs, H., Schmid, F.X., and Jaenicke, R. 1985. Native-like folding intermediates of homologous ribonucleases. *Biochemistry* **24**: 3846-3852.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lang, K., Schmid, F.X., and Fischer, G. 1987. Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**: 268-270.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**: 283-291.
- Lee, J.E., Bae, E., Bingman, C.A., Phillips, G.N., Jr., and Raines, R.T. 2008. Structural basis for catalysis by onconase. *J Mol Biol* **375**: 165-177.
- Lee, J.E. and Raines, R.T. 2003. Contribution of active-site residues to the function of onconase, a ribonuclease with antitumoral activity. *Biochemistry* **42**: 11443-11450.
- Leland, P.A., Staniszewski, K.E., Kim, B., and Raines, R.T. 2000. A synapomorphic disulfide bond is critical for the conformational stability and cytotoxicity of an amphibian ribonuclease. *FEBS Lett* **477**: 203-207.
- Levinthal, C. 1968. Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* **65**: 44-45.
- Liao, Y.D., Wang, S.C., Leu, Y.J., Wang, C.F., Chang, S.T., Hong, Y.T., Pan, Y.R., and Chen, C. 2003. The structural integrity exerted by N-terminal pyroglutamate is crucial for the cytotoxicity of frog ribonuclease from *Rana pipiens*. *Nucleic Acids Res* **31**: 5247-5255.
- Lin, L.N., Hasumi, H., and Brandts, J.F. 1988. Catalysis of proline isomerization during protein-folding reactions. *Biochim Biophys Acta* **956**: 256-266.
- Linderstrom-Lang, K. 1955. The pH-dependence of the deuterium exchange of insulin. *Biochim Biophys Acta* **18**: 308.
- Linge, J.P., Habeck, M., Rieping, W., and Nilges, M. 2003. ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* **19**: 315-316.
- Liu, X., Siegel, D.L., Fan, P., Brodsky, B., and Baum, J. 1996. Direct NMR measurement of folding kinetics of a trimeric peptide. *Biochemistry* **35**: 4306-4313.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B.W., Veltman, O.R., Van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R., and Eijsink, V.G. 1997. Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. *J Biol Chem* **272**: 11152-11156.
- Martinez, J.C., and Serrano, L. 1999. The folding transition state between SH3 domains is conformationally restricted and evolutionarily conserved. *Nat Struct Biol* **6**: 1010-1016.
- Mason, J.M., Gibbs, N., Sessions, R.B., and Clarke, A.R. 2002. The influence of intramolecular bridges on the dynamics of a protein folding reaction. *Biochemistry* **41**: 12093-12099.
- Matheson, R.R., and Scheraga, H.A. 1978. A Method for Predicting Nucleation Sites for Protein Folding Based on Hydrophobic Contacts. *American Chemical Society* **11**: 819-829.
- Maxwell, K.L., Wildes, D., Zarrine-Afsar, A., De Los Rios, M.A., Brown, A.G., Friel, C.T., Hedberg, L., Horng, J.C., Bona, D., Miller, E.J., et al. 2005. Protein folding: defining

- a "standard" set of experimental conditions and a preliminary kinetic data set of two-state proteins. *Protein Sci* **14**: 602-616.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C., and Read, R.J. 2005. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**: 458-464.
- Meiler, J., Prompers, J.J., Peti, W., Griesinger, C., and Bruschweiler, R. 2001. Model-free approach to the dynamic interpretation of residual dipolar couplings in globular proteins. *J Am Chem Soc* **123**: 6098-6107.
- Merlino, A., Mazzarella, L., Carannante, A., Di Fiore, A., Di Donato, A., Notomista, E., and Sica, F. 2005. The importance of dynamic effects on the enzyme activity: X-ray structure and molecular dynamics of onconase mutants. *J Biol Chem* **280**: 17953-17960.
- Mizuguchi, M., Kroon, G.J., Wright, P.E., and Dyson, H.J. 2003. Folding of a beta-sheet protein monitored by real-time NMR spectroscopy. *J Mol Biol* **328**: 1161-1171.
- Mosimann, S.C., Ardel, W., and James, M.N. 1994. Refined 1.7 Å X-ray crystallographic structure of P-30 protein, an amphibian ribonuclease with anti-tumor activity. *J Mol Biol* **236**: 1141-1153.
- Mucke, M. and Schmid, F.X. 1994. Intact disulfide bonds decelerate the folding of ribonuclease T1. *J Mol Biol* **239**: 713-725.
- Neira, J.L. and Rico, M. 1997. Folding studies on ribonuclease A, a model protein. *Fold Des* **2**: R1-11.
- Nesterenko, M.V., Tilley, M., and Upton, S.J. 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28**: 239-242.
- Newton, D.L., Boque, L., Wlodawer, A., Huang, C.Y., and Rybak, S.M. 1998. Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties. *Biochemistry* **37**: 5173-5183.
- Notomista, E., Catanzano, F., Graziano, G., Dal Piaz, F., Barone, G., D'Alessio, G., and Di Donato, A. 2000. Onconase: an unusually stable protein. *Biochemistry* **39**: 8711-8718.
- Notomista, E., Catanzano, F., Graziano, G., Di Gaetano, S., Barone, G., and Di Donato, A. 2001. Contribution of chain termini to the conformational stability and biological activity of onconase. *Biochemistry* **40**: 9097-9103.
- Pace, C.N. 1986. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* **131**: 266-280.
- Pace, C.N., Grimsley, G.R., Thomson, J.A., and Barnett, B.J. 1988. Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J Biol Chem* **263**: 11820-11825.
- Pace, C.N., Laurents, D.V., and Thomson, J.A. 1990. pH dependence of the urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease A and ribonuclease T1. *Biochemistry* **29**: 2564-2572.
- Pavlikis, N. and Vogelzang, N.J. 2006. Ranpirnase--an antitumour ribonuclease: its potential role in malignant mesothelioma. *Expert Opin Biol Ther* **6**: 391-399.
- Pecher, P. and Arnold, U. 2009. The effect of additional disulfide bonds on the stability and folding of ribonuclease A. *Biophys Chem* **141**: 21-28.
- Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schroder, K., Marahiel, M.A., Jaenicke, R., and Schmid, F.X. 1998. Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins. *Nat Struct Biol* **5**: 229-235.
- Peters, T., Jr. 1996. *All About Albumin Biochemistry*. Academic Press Inc, New York.
- Pradeep, L., Shin, H.C., and Scheraga, H.A. 2006. Correlation of folding kinetics with the number and isomerization states of prolines in three homologous proteins of the RNase family. *FEBS Lett* **580**: 5029-5032.
- Radford, S.E., Buck, M., Topping, K.D., Dobson, C.M., and Evans, P.A. 1992. Hydrogen exchange in native and denatured states of hen egg-white lysozyme. *Proteins* **14**: 237-248.
- Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M., and Fischer, G. 1998. Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation. *J Mol Biol* **279**: 449-460.
- Roder, H. and Wuthrich, K. 1986. Protein folding kinetics by combined use of rapid mixing techniques and NMR observation of individual amide protons. *Proteins* **1**: 34-42.

- Rose, G.D., Geselowitz, A.R., Lesser, G.J., Lee, R.H., and Zehfus, M.H. 1985. Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science* **229**: 834-838.
- Rudolph, R. and Lilie, H. 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *Faseb J* **10**: 49-56.
- Rutkoski, T.J. and Raines, R.T. 2008. Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity. *Curr Pharm Biotechnol* **9**: 185-189.
- Sambrook, J. 1989. Molecular cloning - a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*: New York.
- Santoro, M.M. and Bolen, D.W. 1988. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**: 8063-8068.
- Schanda, P., Forge, V., and Brutscher, B. 2007. Protein folding and unfolding studied at atomic resolution by fast two-dimensional NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11257-11262.
- Scheraga, H.A., Konishi, Y., and Ooi, T. 1984. Multiple pathways for regenerating ribonuclease A. *Adv Biophys* **18**: 21-41.
- Schmid, F.X. 1981. A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 1. Detection by tyrosine fluorescence changes. *Eur J Biochem* **114**: 105-109.
- Schmid, F.X. 1983. Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates. *Biochemistry* **22**: 4690-4696.
- Schmid, F.X. and Blaschek, H. 1981. A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 2. Comparison of its properties to native ribonuclease A. *Eur J Biochem* **114**: 111-117.
- Schmid, F.X., Mayr, L.M., Mucke, M., and Schonbrunner, E.R. 1993. Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv Protein Chem* **44**: 25-66.
- Schulenburg, C. 2005. Stabilität und Faltung von Onconase und gentechnisch erhaltenen Varianten. *Diplomarbeit*.
- Schulenburg, C., Ardelt, B., Ardelt, W., Arnold, U., Shogen, K., Ulbrich-Hofmann, R., and Darzynkiewicz, Z. 2007. The interdependence between catalytic activity, conformational stability, and cytotoxicity of onconase. *Cancer Biol Ther* **6**: 1233-1239.
- Steeb, C., Schneider-Hassloff, H., Zeeb, M., and Balbach, J. 2000. Cooperativity of a protein folding reaction probed at multiple chain positions by real-time 2D NMR spectroscopy. *Biochemistry* **39**: 7910-7919.
- Stewart, D.E., Sarkar, A., and Wampler, J.E. 1990. Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *J Mol Biol* **214**: 253-260.
- Stryer, L. 1965. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J Mol Biol* **13**: 482-495.
- Suhasini, A.N. and Sirdeshmukh, R. 2006. Transfer RNA cleavages by onconase reveal unusual cleavage sites. *J Biol Chem* **281**: 12201-12209.
- Travaglini-Allocatelli, C., Gianni, S., and Brunori, M. 2004. A common folding mechanism in the cytochrome c family. *Trends Biochem Sci* **29**: 535-541.
- Tsong, T.Y., Baldwin, R.L., and Elson, E.L. 1972. Properties of the refolding and unfolding reactions of ribonuclease A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 1809-1812.
- Turcotte, R.F. and Raines, R.T. 2008. Interaction of onconase with the human ribonuclease inhibitor protein. *Biochem Biophys Res Commun* **377**: 512-514.
- Udgaonkar, J.B. and Baldwin, R.L. 1988. NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* **335**: 694-699.
- Udgaonkar, J.B. and Baldwin, R.L. 1990. Early folding intermediate of ribonuclease A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8197-8201.
- Wagner, C. and Kiefhaber, T. 1999. Intermediates can accelerate protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6716-6721.
- Wagner, G. and Wuthrich, K. 1982. Amide proton exchange and surface conformation of the basic pancreatic trypsin inhibitor in solution. Studies with two-dimensional nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol* **160**: 343-361.
- Wand, A.J., Roder, H., and Englander, S.W. 1986. Two-dimensional ¹H NMR studies of cytochrome c: hydrogen exchange in the N-terminal helix. *Biochemistry* **25**: 1107-1114.

- Wedemeyer, W.J., Welker, E., and Scheraga, H.A. 2002. Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry* **41**: 14637-14644.
- Williamson, M.P., Havel, T.F., and Wuthrich, K. 1985. Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J Mol Biol* **182**: 295-315.
- Wong, C., Sridhara, S., Bardwell, J.C., and Jakob, U. 2000. Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques* **28**: 426-428, 430, 432.
- Wu, Y., Mikulski, S.M., Ardelt, W., Rybak, S.M., and Youle, R.J. 1993. A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J Biol Chem* **268**: 10686-10693.
- Youle, R.J., Wu, Y.N., Mikulski, S.M., Shogen, K., Hamilton, R.S., Newton, D., D'Alessio, G., and Gravel, M. 1994. RNase inhibition of human immunodeficiency virus infection of H9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6012-6016.
- Young, J.D., Peterson, C.G., Venge, P., and Cohn, Z.A. 1986. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* **321**: 613-616.
- Zhao, H., Ardelt, B., Ardelt, W., Shogen, K., and Darzynkiewicz, Z. 2008. The cytotoxic ribonuclease onconase targets RNA interference (siRNA). *Cell Cycle* **7**: 3258-3261.

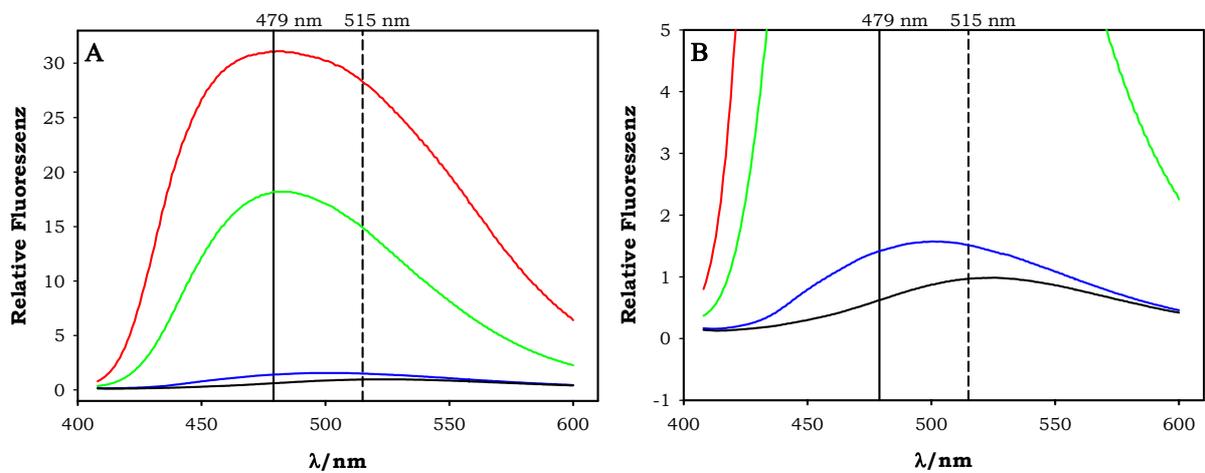
9 Anhang



Anhang 1: Fluoreszenzintensität von ANS in Gegenwart von ONC unter nativen bzw. entfaltenden Bedingungen.

A: Relative Fluoreszenzintensität bei 479 nm in Abwesenheit (■) bzw. Gegenwart von 2 μM ONC (●) als Funktion der ANS-Konzentration in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5.

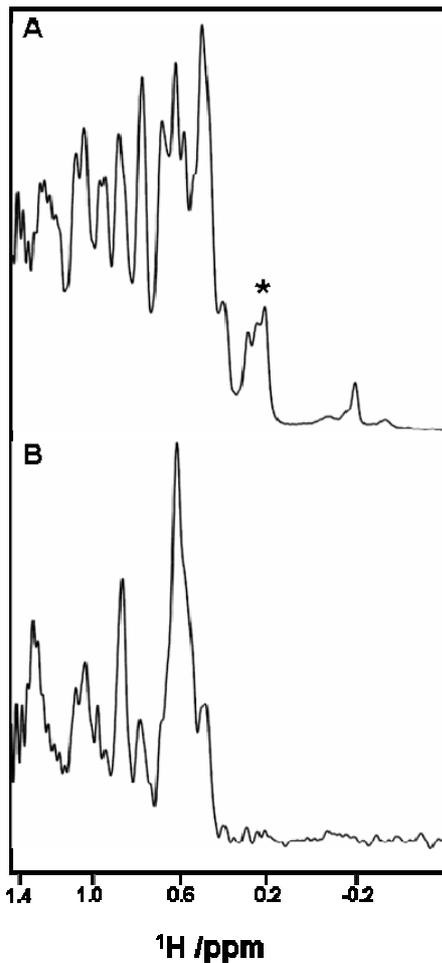
B: Relative Fluoreszenzintensität bei 479 nm in Abwesenheit (■) bzw. Gegenwart von 2 μM ONC (●) als Funktion der ANS-Konzentration in 100 mM Natriumacetat, 6 M GdnHCl, pH 5,5.



Anhang 2: Fluoreszenzspektren von ANS in Gegenwart von BSA bei verschiedenen GdnHCl Konzentrationen.

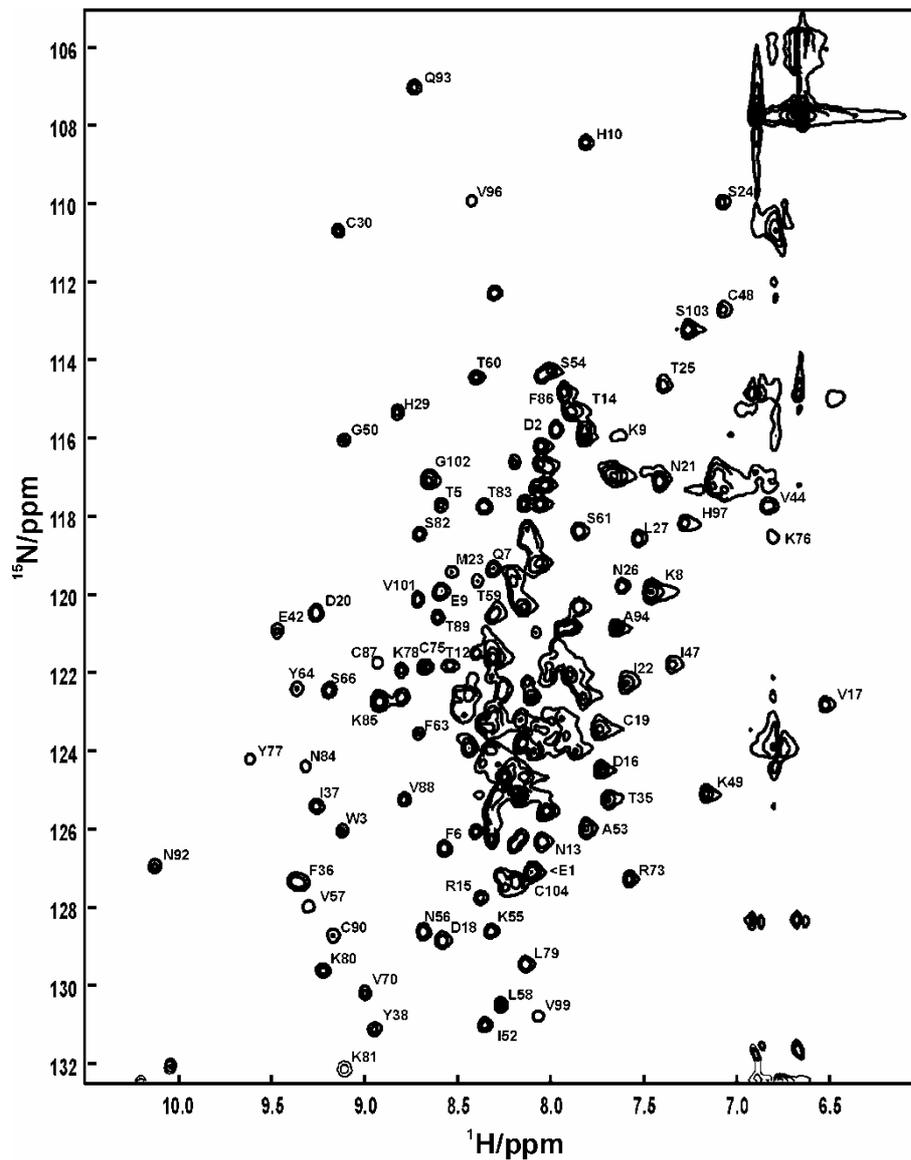
A: Fluoreszenzspektren von 75 μM ANS in Gegenwart von 25 μM BSA. Die Spektren wurden in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5, in Gegenwart von 0 (—), 2 (—), 4 (—) bzw. 6 M GdnHCl (—) aufgenommen. Die Wellenlängenmaxima von gebundenem (479 nm) bzw. freiem (515 nm) ANS sind gezeigt.

B: In A dargestellte Spektren mit vergrößerter Ordinate.

**Anhang 3: Ausschnitt aus 1D-¹H-NMR-Spektren von ONC.**

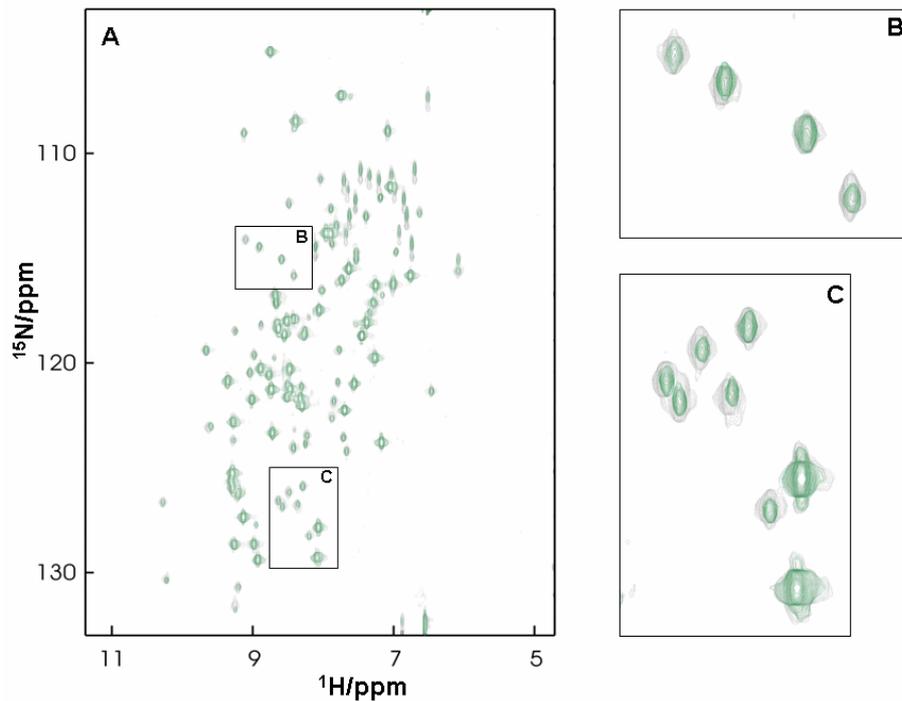
A: Spektrum nativer ONC mit allen Peptidyl-prolyl-Bindungen in *trans*-Konformation. Der Stern markiert das NMR-Signal, dessen Intensitätszunahme als Funktion der Rückfaltungszeit in Abb. 5-8 dargestellt ist.

B: Extrahiertes Spektrum von ONC mit mindestens einer Peptidyl-prolyl-Bindung in *cis*-Konformation. Im ersten Spektrum des Rückfaltungsexperiments ($t = 12$ s) wurden die schnelle und mittelschnelle Rückfaltungsreaktion (78,3%, 5.2.5) bereits durchlaufen. Durch Subtraktion von 78,3% des Spektrums nativer ONC (letzte Spektrum der Reaktion, Anhang-3A) erhält man das Spektrum entfalteter ONC mit mindestens einer Peptidyl-prolyl-Bindung in *cis*-Konformation.



Anhang 4: Erstes 2D-TROSY-Spektrum der mittels Echtzeit-NMR-Spektroskopie detektierten Entfaltungsreaktion von ONC.

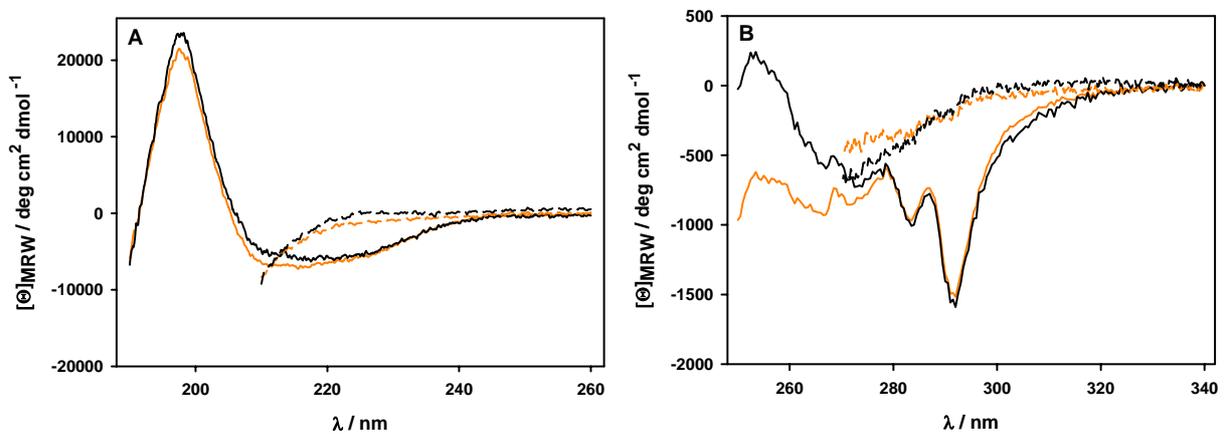
Die Entfaltungsreaktion wurde durch Lösen von ONC in 50 mM Natriumacetat, 5,5 M GdnHCl, pH 5,5, initiiert.



Anhang 5: Vergleich von ^{15}N - ^1H -HSQC-NMR-Spektren von ONC nach der quenched-flow-Analyse.

A: Das graue NMR-Spektrum entspricht der Referenzprobe, das grüne NMR-Spektrum einer Probe, welche vor der H/D-Austauschreaktion für 250 ms rückgefaltet wurde.

B/C: Ausschnitte aus A.



Anhang 6: Vergleich der CD-Spektren von ONC und C87A/C104A-ONC.

A: CD-Spektren im fernen UV-Bereich von nativer (durchgezogene Linien) und entfalteter (gestrichelte Linien) ONC (schwarz) bzw. C87A/C104A-ONC (orange).

B: CD-Spektren im nahen UV-Bereich von nativer (durchgezogene Linien) und entfalteter (gestrichelte Linien) ONC (schwarz) bzw. C87A/C104A-ONC (orange).

Anhang 7: Kristallstruktur von C87A/C104A-ONC (3FD7.pdb): Datensammlung und Verfeinerung.

Die in Klammern stehenden Werte entsprechen denen für die höchste Auflösung (1.58-1.53 Å).

Parameter	Wert
Datensammlung	
Wellenlänge (Å)	1,5418
Röntgenquelle	Drehanode
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zelldimensionen	
a (Å)	45,46
b (Å)	51,19
c (Å)	87,69
Auflösung (Å)	1,53
R _{merge} ^a	7,3 (54,39)
<I/σ(I)>	36,16 (5,88)
Vollständigkeit (%)	99,3 (95,5)
Redundanz	30,3
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	26,86-1,53
äußerste Auflösungsschale (Å)	(1,58-1,53)
Reflexe (work/test set)	31390 (2518)
R _{cryst} ^b (%)	13,76 (21,03)
R _{free} ^c (%)	18,80 (29,90)
Atome	
Protein	1691
Wasser	355
Sulfat	35
Glycerin	34
Durchschnitt der B-Faktoren	
Protein	14,69
Wasser	10,03
Sulfat	30,12
Glycerin, Ethylenglycol	27,76
Standardabweichung vom Idealwert	
Bindungslänge (Å)	0,006
Bindungswinkel (grd)	1,16
Dihedrale Winkel (grd)	15,68
Unzulässige Winkel (grd)	0,081

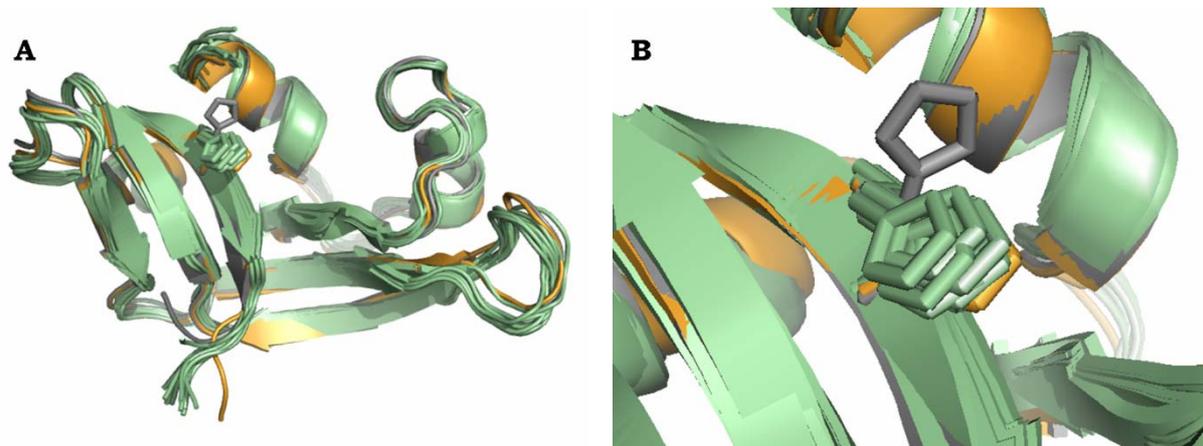
$$^a R_{merge} = |I - \langle I \rangle| / \langle I \rangle$$

$$^b R_{cryst} = ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / |F_{obs}|$$

^c R_{free} wurde wie R_{cryst} für einen Testanteil (5.0% der Reflexionen) berechnet, welcher nicht für die Datenverfeinerung genutzt wurde.

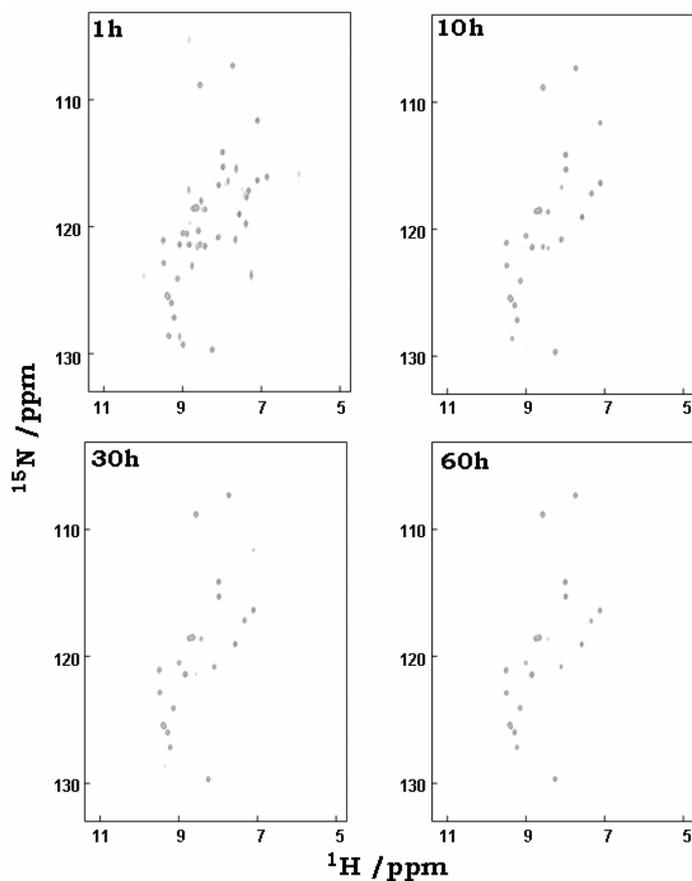
Anhang 8: NMR-Struktur von C87A/C104A-ONC (2KB6.pdb).

Parameter	Wert
Experimentelle Vorgaben	
NOEs	1874
Dihedrale Winkel	132
NOE Übertretungen	
> 0,5 (Å)	0,00 ± 0,00
> 0,3 (Å)	0,28 ± 0,45
> 0,1 (Å)	17,84 ± 2,99
Standardabweichung NOE (Å)	0,0191 ± 0,0016
Standardabweichung	
Rückgrad (Å)	0,83 ± 0,19
Bindungen (Å)	0,0022 ± 0,0001
Standardabweichung	
Winkel zwischen Bindungen (grad)	0,4056 ± 0,0024
Winkel zwischen Ebenen (grad)	0,3427 ± 0,0071
Energie	
E _{total} (kcal mol ⁻¹)	363,9 ± 17,2
E _{Bindung} (kcal mol ⁻¹)	33,6 ± 1,7
E _{Winkel} (kcal mol ⁻¹)	150,0 ± 8,2
E _{unzulässig} (kcal mol ⁻¹)	82,5 ± 11,8
E _{NOE} (kcal mol ⁻¹)	88,6 ± 9,0
E _{Dihedrale Winkelschränkung} (kcal mol ⁻¹)	9,2 ± 1,8
Ramachandran Analyse	
Bevorzugt (%)	88,8
Zusätzlich Zulässig (%)	11,2
Generell Zulässig (%)	0,0
Unzulässig (%)	0,0



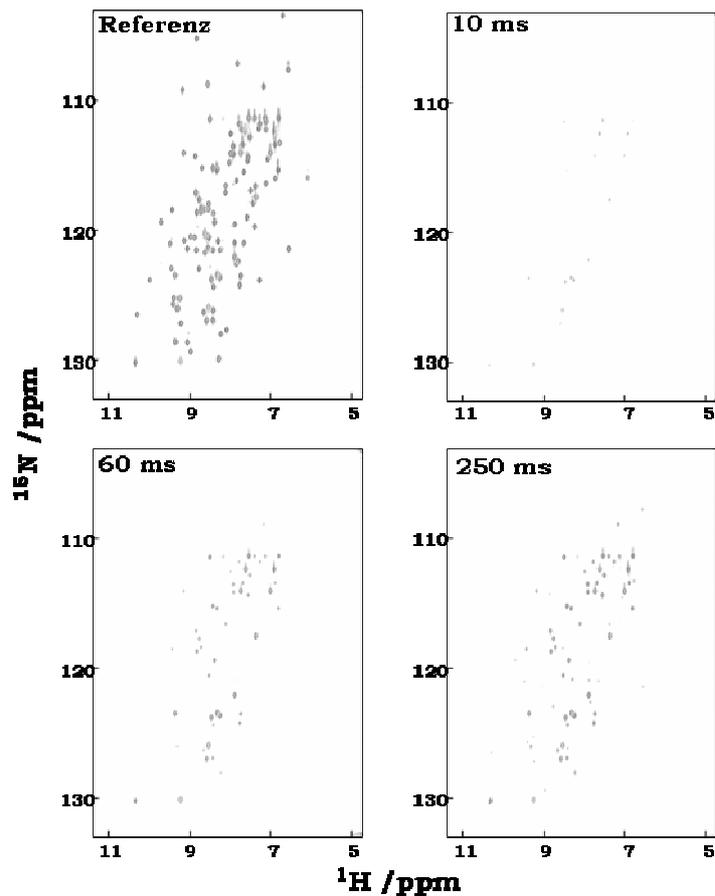
Anhang 9: Vergleich der Kristallstrukturen von ONC und C87A/C104A-ONC mit den 10 energieärmsten NMR-Strukturen von C87A/C104A-ONC.

Grau: Kristallstruktur ONC, orange: Kristallstruktur C87A/C104A-ONC, grün: NMR-Strukturen C87A/C104A-ONC. A: Vergleich der Gesamtstrukturen. Der Aminosäurerest H97 ist dargestellt. B: Vergrößerte Darstellung der Orientierung des Aminosäurerestes H97.



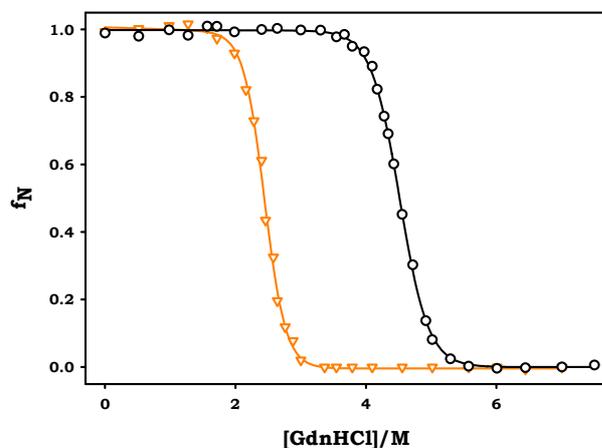
Anhang 10: Ausgewählte 2D-HSQC-NMR-Spektren während der H/D-Austauschreaktion von ONC.

Die Spektren nach einer, 10, 30 bzw. 60 h sind dargestellt. Die Austauschreaktion fand in 50 mM Natriumphosphat, pH 8,2, in 100% D₂O statt.



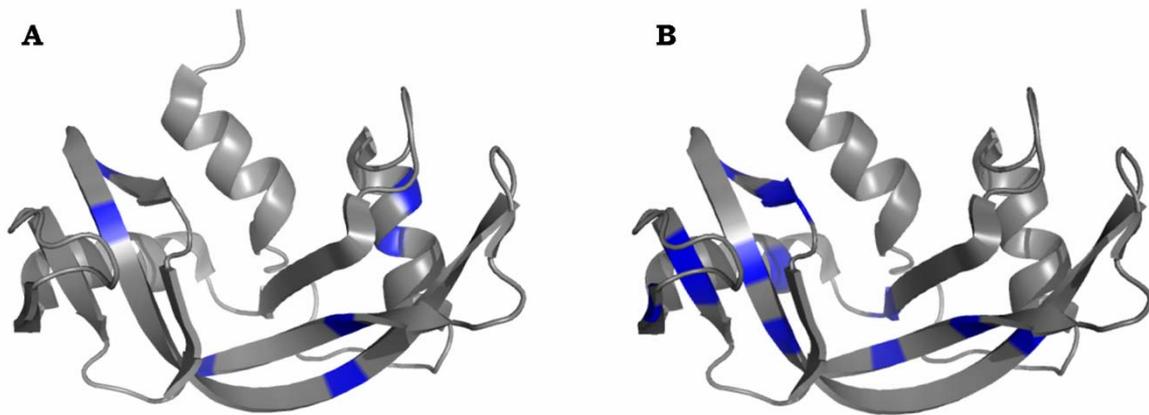
Anhang 11: Ausgewählte 2D-HSQC-NMR-Spektren während der mittels New MEXICO Pulssequenz induzierten H/H-Austauschreaktion von ONC.

2D-HSQC-Spektrum von ONC vor Induktion der H/H Austauschreaktion (Referenz) bzw. 10, 60 und 250 ms nach Induktion der H/H-Austauschreaktion in 50 mM Natriumphosphat, pH 8,2, in 100% D_2O .



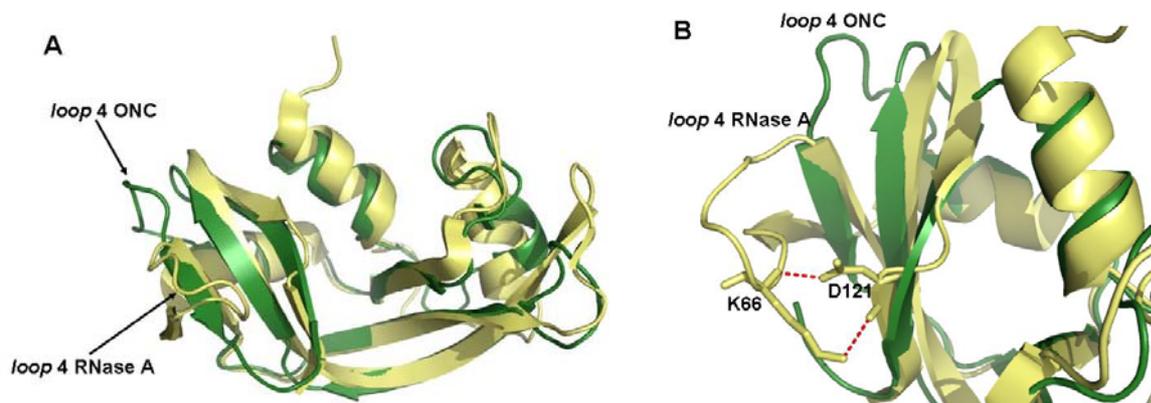
Anhang 12: GdnHCl-induzierte Übergangskurven von ONC und C87A/C104A-ONC.

Die Übergangskurven von C87A/C104A-ONC (∇) und ONC (\circ) wurden wie unter 4.3.13. dargestellt in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,2, in 100% D_2O ermittelt.



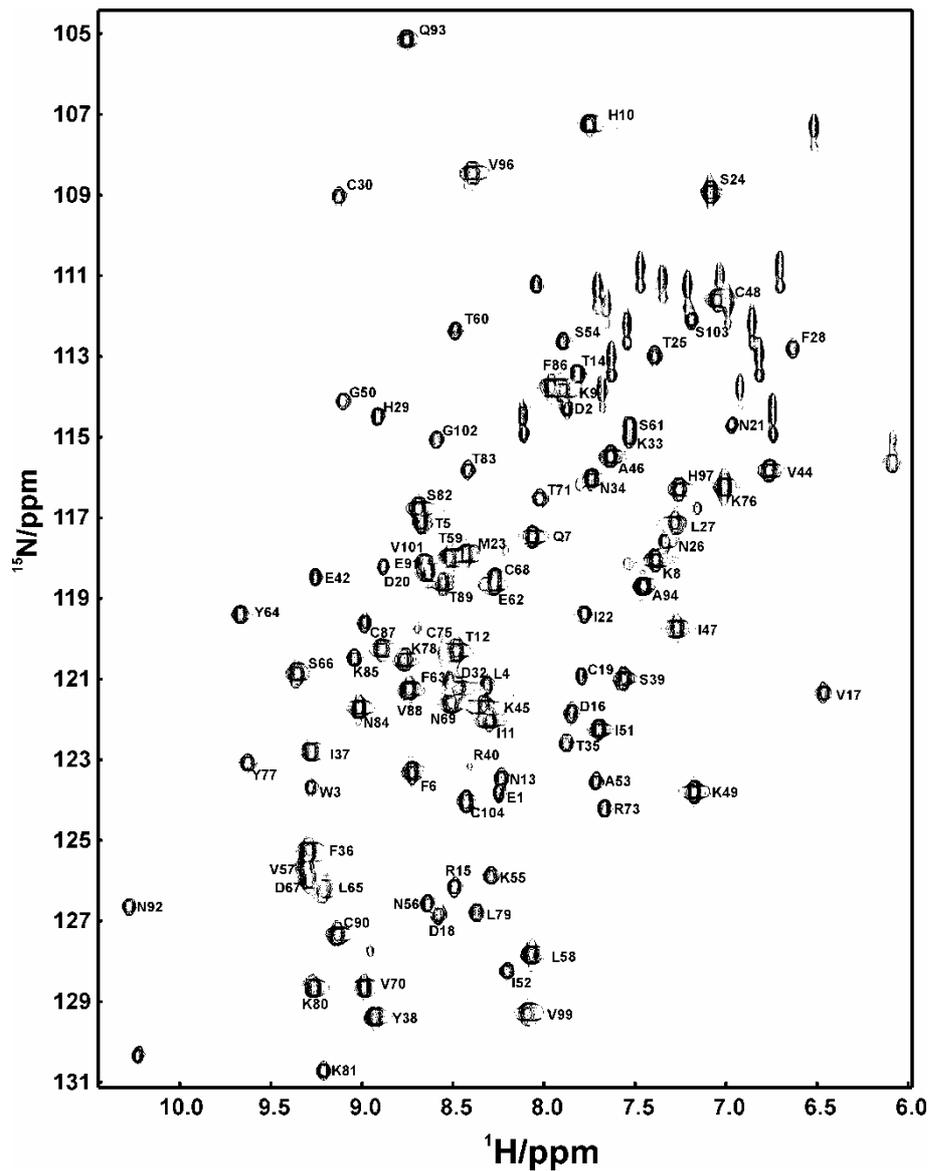
Anhang 13: In $I\phi$ (A) und I_1 (B) geschützte Aminosäurereste in RNase A.

Die Informationen zum Schutz der Aminosäurereste in $I\phi$ wurden aus Houry and Scheraga (1996) entnommen, die Informationen der Aminosäurereste in I_1 aus Udgaonkar und Baldwin (1990).



Anhang 14: Vergleich der *loop*-Region zwischen der dritten α -Helix und dem sechsten β -Faltblattstrang (*loop 4*) von ONC und RNase A.

A: Tertiärstrukturen von ONC (grün) und RNase A (gelb). Die vierte *loop*-Region ist in beiden Proteinen beschriftet. B: Vergleichende Darstellung der vierten *loop*-Region von ONC (grün) und RNase A (gelb). Die in RNase A zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen bildenden Aminosäurereste K66 und D121 sind markiert.



Anhang 15: ^{15}N - ^1H -HSQC-NMR-Spektrum von nativer ONC in 50 mM Natriumacetat, 10% D_2O , pH 5,5 bei 20°C.

Publikationen, Poster und Vorträge

Publikationen

Schulenburg, C., Weininger, U., Neumann, P., Stubbs, M.T., Balbach, J., Ulbrich-Hofmann, R., Arnold, U., Impact of the C-terminal disulfide bond on the folding of Onconase, *in preparation*

Schulenburg, C., Löw, C., Weininger, U., Mrestani-Klaus, C., Hofmann, H., Balbach, J., Ulbrich-Hofmann, R., Arnold, U., The folding of Onconase is directed by a conserved intermediate, *in press, Biochemistry*

Schulenburg, C., Martinez-Senac, M.M., Löw, C., Golbik, R., Ulbrich-Hofmann, R., Arnold, U., 2007, Identification of three phases in Onconase refolding, *FEBS J.* 274: 5826-5833

Schulenburg, C., Ardelt, B., Ardelt, W., Arnold, U., Shogen, K., Ulbrich-Hofmann, R., Darzynkiewicz, Z. 2007, The interdependence between catalytic activity, conformational stability, and cytotoxicity of Onconase, *Cancer Biol. Ther.* 6: 1233-1239

Arnold, U., **Schulenburg, C.**, Schmidt, D., Ulbrich-Hofmann, R., 2006, Contribution of structural peculiarities of Onconase to its high stability and folding kinetics, *Biochemistry* 45: 3580-3587

Poster

Schulenburg, C., Löw, C., Weininger, U., Balbach, J., Ulbrich-Hofmann, R., Arnold, U., *Folding of Onconase proceeds via a structurally conserved intermediate*
VIII European Symposium of The Protein Society, Zurich, Switzerland, 2009

Schulenburg, C., AG Ulbrich-Hofmann
Impact of the C-terminal disulfide bond on the folding of Onconase
Begutachtung Graduiertenkolleg 1026, Halle, 2009

Schulenburg, C., Weininger, U., Balbach, J. & Ulbrich-Hofmann, R.
Folding of Onconase at atomic resolution
First International Meeting, Graduiertenkolleg 1026, Halle, 2008

Schulenburg, C., Arnold, U. & Ulbrich-Hofmann, R.
First steps on the folding pathway of Onconase
6th European Biophysics Congress, London, UK, 2007
European Biophysical Journal, **36**, 2007, p. 246

Schulenburg, C., Martinez-Senac, M.M., Ulbrich-Hofmann, R. & Arnold, U.
Folding and unfolding of Onconase
19, Faltertage, Halle, 2006

Arnold, U., **Schulenburg, C.**, Schmidt, D. & Ulbrich-Hofmann, R.
Stability determinants in Onconase
7th International Meeting on Ribonucleases, Stará Lesná, Slovakia, 2005

Vorträge

Onconase - eine extrem stabile und zytotoxische Verwandte der Ribonuklease A
Symposium zu Ehren des 80. Geburtstags von Prof. Dr. Alfred Schellenberger, Halle, 2008

The impact of the C-terminal disulfide bond on the folding of Onconase
Herbsttreffen, Graduiertenkolleg 1026, Dresden, 2008

Folding of Onconase at atomic resolution
20. Faltertage, Wittenberg, 2008

Characterization of the intermediates in the Onconase folding pathway
Herbsttreffen, Graduiertenkolleg 1026, Wittenberg, 2007

First steps on the Onconase folding pathway
Frühjahrstreffen, Graduiertenkolleg 1026, Oppurg, 2007

Onconase - an uncommonly stable protein
Herbsttreffen, Graduiertenkolleg 1026, Potsdam, 2006

Lebenslauf

Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum:	18.04.1982
Geburtsort:	Salzwedel
ab 04.2006	Promotion Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie Technische Enzymologie
02.2006 – 04.2006	Praktikum, Alfacell Corporation, Somerset, NJ, USA
07.2005 – 12.2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie Technische Enzymologie
07.2003 – 09.2003	Praktikum Uppsala Universität, Uppsala, Schweden Biochemie
10.2000 – 06.2005	Studium Biochemie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Biochemie und Biotechnologie Thema der Diplomarbeit: Stabilität und Faltung von Onconase und gentechnisch hergestellten Varianten
07.2000 – 09.2000	Praktikum Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Biochemie und Biotechnologie Enzymologie
09.1992 – 06.2000	Abitur Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium Salzwedel

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Renate Ulbrich-Hofmann für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ihr Interesse am Voranschreiten der Arbeit, die zahlreichen Diskussionen sowie ihre aufbauenden Worte in scheinbar ausweglosen Situationen haben mich sehr motiviert.

Herrn Professor Jochen Balbach danke ich für die Möglichkeit viele der in seiner Arbeitsgruppe verfügbaren Geräte nutzen zu dürfen und für sein stetes Interesse am Projekt.

Herrn Professor Milton T. Stubbs danke ich für die Kooperation hinsichtlich der Kristallisation der Variante C87A/C104A-ONC.

Herrn Dr. Ulrich Arnold möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und für seine vielen Anregungen und Diskussionen, sowie für die Messungen zur Reaktivierung von ONC danken.

Mein ausdrücklicher Dank richtet sich an Herrn Dr. Christian Löw für seine stete Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude, sowie für die zeitraubende globale Analyse meiner Daten und die Bereitstellung von *Thermus* SlyD. Herrn Diplom-Biochem. Ulrich Weininger möchte ich für die Durchführung der NMR-Messungen und das Lösen der NMR-Struktur von C87A/C104A-ONC, sowie für die wohltuenden Mangosaftabende danken. Herrn Dr. Hagen Hofmann danke ich für die lehrreichen Debatten während der Kaffeepausen und für die gemeinsamen Tagungserlebnisse.

Frau Dr. Carmen Mrestani-Klaus danke ich für die Durchführung der NMR-Messungen am 400 MHz Spektrometer, für ihr offenes Ohr und für das gewissenhafte Korrekturlesen der Publikationsmanuskripte. Herrn Dr. Christian Lücke möchte ich für die geduldige Hilfe bei der Zuordnung der NMR-Signale für ONC danken.

Herrn Dr. Piotr Neumann danke ich für die Bestimmung der Kristallstruktur der Variante C87A/C104A-ONC. Diplom-Biochem. Ulrike Bräuer möchte ich herzlich für die Ratschläge zur Kristallisation sowie für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft danken.

Bei Herrn Dr. Ralph Golbik und Herrn Dr. Hauke Lilie bedanke ich mich für die zahlreichen Hinweise zur Durchführung von Experimenten sowie Herrn Dr. Hauke Lilie für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation.

Frau Dr. Cordelia Schiene-Fischer danke ich für die Bereitstellung von Cyclophilin 18. Frau Diplom-Biochem. Doreen Schmidt danke ich für das *ONC*-Gen im pET26b(+)-Vektor. Professor Dr. Ronald Raines stellte das *C87A/C104A-ONC*-Gen im pET22b(+)-Vektor zur Verfügung.

Danke an alle Mitglieder des GRK1026 für die lehrreiche und schöne Zeit.

Ich möchte mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Technische Enzymologie, besonders bei Janine, Pascal, Martin und Frau Sonntag, für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken.

Ein herzlicher Dank an Christoph für das Zusenden zahlreicher Publikationen, die unzählbaren Tipps und seine unglaubliche Geduld.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterschätzung bei der Arbeit, das Verständnis für die Arbeit und die Ablenkung von der Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation verwendet. Aus der Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, die vorliegende Dissertation an keiner anderen Einrichtung zur Bewerbung um einen Doktorgrad eingereicht zu haben. Ich selbst habe mich noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle (Saale),

Cindy Schulenburg