

**Die Konstruktion einer artifiziellen Oxidoreduktase**  
**Implementierung des CXXC-Tetrapeptids in das Strukturprotein M7**

**Dissertation**

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Martin Voigtmann

geboren am 20.03.1985 in Erfurt

Gutachter: PD Dr. Hauke Lilie  
Prof. Dr. Rudolf Glockshuber  
Prof. Dr. Milton T. Stubbs

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.01.2018

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1. Proteinengineering	3
1.2. M7, ein nicht evolutionär gereiftes Protein	4
1.3. Die Redoxaktivität der Thioredoxin-Superfamilie	6
1.4. Thioredoxin – Grundlagen zu Struktur und Katalyse	6
1.5. DsbA – Grundlagen zu Struktur und Katalyse	9
1.6. Modulatoren des CXXC-Redoxpotentials	10
1.7. Katalyserate von Disulfidaustauschreaktionen	14
1.8. Zielsetzung	16
2. Material	17
2.1. Chemikalien	17
2.2. Zusammensetzung verwendeter Stoffgemische	19
2.3. Verwendete Enzyme, Enzymzusätze, Antikörper und Kits	21
2.4. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	21
2.5. Geräte und Zubehör	22
3. Methoden	25
3.1. Molekularbiologische Methoden	25
3.1.1. Restriktionsverdau und Ligation	25
3.1.2. Mutagenese per Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.1.3. Kolonie-PCR	26
3.1.4. Herstellung elektrokompenter Zellen	27
3.1.5. Transformation per Elektroporation	27
3.2. Proteinpräparation	27

3.2.1.	<i>E. coli</i> Anpassung an M9-Minimalmedium	27
3.2.2.	Kryokonservierung von Zellen	28
3.2.3.	Rekombinante Proteinproduktion	28
3.2.4.	Zellaufschluss	29
3.2.5.	Proteinreinigung über chromatografische Methoden	29
3.2.6.	Proteinkonzentrierung mittels Zentrifugalkonzentratoren	30
3.2.7.	Analyse von Proteinreinheit und -integrität	30
3.2.7.1.	Diskontinuierliche SDS-PAGE und Coomassiefärbung	30
3.2.7.2.	Western Blot	30
3.2.7.3.	Fluoreszenzspektroskopie	31
3.2.7.4.	Bestimmung des Protein-Oligomerisierungsgrad	31
3.2.7.4.1.	Analytische Größenausschlusschromatografie (SEC)	31
3.2.7.4.2.	Analytische Ultrazentrifugation	32
3.2.7.5.	Massenspektrometrie	32
3.2.7.6.	Atomspektroskopie (ICP-MS)	32
3.3.	Bestimmung von Konzentrationen	33
3.3.1.	Refraktrometrie von Guanidinium-Lösungen	33
3.3.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
3.4.	Peptidsynthese und -präparation	34
3.4.1.	Spritzenfestphasensynthese	34
3.4.2.	Automatisierte Peptidsynthese	34
3.5.	Biophysikalische Charakterisierung	35
3.5.1.	Messung von Redoxpotentialen der CXXC-Varianten	36
3.5.1.1.	Redoxpotentialbestimmung von Proteinen	36
3.5.1.1.1.	Zusammenstellung des Redoxansatzes	36
3.5.1.1.2.	Quantifizierung der Proteinredoxspezies	36

3.5.1.1.3.	Quantifizierung von Glutathion (GSH und GSSG)	37
3.5.1.1.4.	Berechnung des Redoxpotentials	38
3.5.1.2.	Redoxpotentialbestimmung von CXXC-Peptiden mittels DTT	39
3.5.1.3.	Sekundärstrukturbestimmung mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie	39
3.5.1.3.1.	Sekundärstrukturbestimmung der M7-Varianten	39
3.5.1.3.2.	Sekundärstrukturbestimmung der CXXC-Peptide	40
3.5.2.	Denaturierungsübergänge	40
3.5.2.1.	Thermisch induzierte Denaturierungsübergänge über CD-Spektroskopie	41
3.5.2.2.	Chemisch induzierte Denaturierungsübergänge über Fluoreszenz-Spektroskopie	41
3.5.2.3.	Reversibilität der Denaturierung	42
3.5.2.4.	Überprüfung des Zwei-Zustandsmodells	43
3.5.3.	Kinetische Untersuchungen zur Redoxaktivität	44
3.5.3.1.	Cysteinyl-pK <sub>a</sub> -Bestimmung mittels Stopped-Flow-Absorptions-Spektroskopie	44
3.5.3.2.	Die Redoxkinetik der Varianten mit DTT	46
3.5.4.	Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie	46
3.5.5.	Histidinyl-pK <sub>a</sub> -Bestimmung mittels NMR-Spektroskopie	48
4.	Ergebnisse	49
4.1.	Design von M7-Redoxvarianten und deren Nomenklatur	49
4.2.	Präparation der M7-Redoxvarianten	50
4.2.1.	Reinigungsverlauf	51
4.2.2.	Der Reinheitsgrad der Redoxvarianten	52
4.2.3.	Präparation und Reinheit der CXXC-Peptide	53
4.3.	Biophysikalische Charakterisierung	54
4.3.1.	Bestimmung des Redoxpotentials	54
4.3.2.	Temperatur- und Ionenstärkeabhängigkeit des Redoxpotentials	57
4.3.3.	Proteinstabilitäten	58

4.3.3.1.	Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung	58
4.3.3.2.	Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln	59
4.3.4.	Reversibilität der Proteinfaltung	62
4.3.5.	Faltungsmodell der Redoxvarianten	63
4.3.6.	Kinetische Untersuchungen zur CXXC-Reaktivität	64
4.3.6.1.	Cysteinyl-pK <sub>a</sub> -Werte der CXXC-Varianten	64
4.3.6.2.	Reduktions- und Oxidationskinetik mit DTT	67
4.4.	Strukturanalyse der Protein- und Peptidvarianten	70
4.4.1.	Sekundärstrukturanalyse der CXXC-Proteine	70
4.4.2.	Sekundärstrukturanalyse der CXXC-Peptide	71
4.4.3.	NMR-spektroskopische Untersuchungen der CXXC-Varianten	73
4.4.3.1.	Definition der Signifikanzgrenzen der $\Delta_{av(NH)^-}$ und $\Delta_{av(CNH)^-}$ -Werte	73
4.4.3.2.	NMR-spektroskopische Vergleich zwischen Redoxformen von M7 <sub>Di26</sub> und M7 <sub>Di23</sub>	73
4.4.3.3.	Temperatureinfluss auf die Struktur von oxidiertem M7 <sub>Di26</sub>	76
4.4.3.4.	Vergleich zwischen den M7-Redoxvarianten und dem M7(wt)	77
4.4.4.	Bestimmung der Histidiny-pK <sub>a</sub> -Werte mittels NMR-Spektroskopie	79
5.	Diskussion	82
5.1.	Proteinproduktion und strukturelle Betrachtungen	82
5.1.1.	Strukturelle Ableitungen – Denaturierung und Zwei-Zustandsmodell	82
5.1.2.	Strukturelle Ableitungen – Tyrosinfluoreszenz der M7-Varianten	85
5.1.3.	Strukturelle Ableitungen – NMR Spektroskopie	86
5.2.	Funktionelle Einordnung	88
5.2.1.	Das Redoxpotential der M7-Varianten	88
5.2.2.	Die Redoxaktivität der M7-Varianten	91
5.3.	Weiterführende Versuche	94
5.3.1.	Weitere Experimente im ersten Designzyklus	94

<b>5.3.2. Der folgende Designzyklus</b>	<b>95</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>106</b>
<b>7.1. Herleitung der Gleichgewichtskonstante (K) von Redoxreaktionen</b>	<b>106</b>
<b>7.2. Vergleich des Peptidrückgrats von M7 mit DsbA, Thioredoxin und Top7</b>	<b>106</b>
<b>7.3. Sequenz, Molekulargewicht und <math>\epsilon_{280\text{nm}}</math> verwendeter Proteine und Peptide</b>	<b>107</b>
<b>7.4. Präparation der M7-Varianten – Chromatogramme, Übersichtsgel und Spektren</b>	<b>111</b>
<b>7.5. Trennung von Redoxspezies mittels rpHPLC</b>	<b>114</b>
<b>7.6. Bestimmung der <math>\text{pK}_a</math>-Werte von DTNB und Cystein</b>	<b>115</b>
<b>7.7. Fern-UV-CD-Spektren der M7-Varianten</b>	<b>116</b>
<b>7.8. Chemisch-induzierte Denaturierungsübergänge</b>	<b>117</b>
<b>7.9. NMR-spektroskopische Vergleiche der M7-Varianten</b>	<b>120</b>
<b>7.10. Liste chemischer Verschiebungen von M7-Varianten</b>	<b>123</b>
<b>7.11. <math>^1\text{H}</math>-<math>^{15}\text{N}</math> HSQC-NMR-Spektren der Redoxvarianten</b>	<b>127</b>
<b>7.12. Abkürzungsverzeichnis und fremdsprachige Begriffe</b>	<b>128</b>
<b>8. Publikationen, Poster und Vorträge</b>	<b>131</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>132</b>
<b>10. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>133</b>
<b>11. Danksagung</b>	<b>134</b>

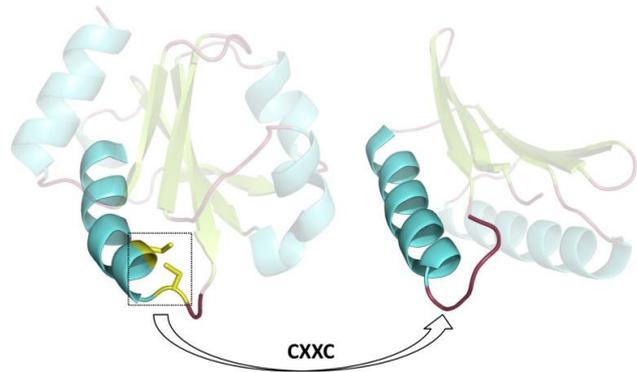
## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der erste Designversuch zur Umwandlung des Strukturproteins M7 hin zu einem redoxaktiven Protein realisiert. Dabei widmet sich diese Arbeit primär den thermodynamischen Hintergründen. Das Designziel war es ein nukleophiles Cystein zu erzeugen, dessen Redoxpotential durch die M7-Struktur moduliert wird.

Das Gerüstprotein für das Proteindesign ist M7, ein per Computeralgorithmus berechnetes Protein, das sich durch eine extreme thermodynamische Stabilität auszeichnet. In dieses Strukturprotein wurde die redoxaktive Sequenz, das cysteininhaltige CXXC-Tetrapeptid, der Thioredoxin-*fold*-Oxidoreduktasen (Thioredoxin, DsbA) implementiert. Durch den Einbau des CXXC-Tetrapeptids in eine Proteinstruktur, die nicht durch Evolution an die Funktion der CXXC-Sequenz angepasst ist, können grundlegende Erkenntnisse über die Wirkungsweise dieser Oxidoreduktasen erhalten werden. Die entscheidende Fragestellung war: "Ist es möglich ein Strukturprotein durch die Implementierung des CXXC-Tetrapeptids in ein redoxaktives Protein umzuwandeln?". Hierfür wurde das CXXC-Peptid (CGPC aus Thioredoxin bzw. CPHC von DsbA) an verschiedene Positionen im Loop-Helix-Übergangsbereich von  $\alpha_1$ -Helix in M7 eingefügt (Abbildung 0-1). Dieser rationale Designansatz greift die Lage der CXXC-Sequenz in der Sekundärstruktur der natürlichen CXXC-Oxidoreduktasen auf.

Der Fokus der biophysikalischen Charakterisierung des oxidierten und reduzierten Redoxzustandes der Varianten lag auf der Analyse von **i)** Redoxpotentialen, **ii)** der Proteinstabilität, **iii)** der Cysteinyl- $pK_a$ -Werte und **iv)** der Strukturaufklärung mittels

CD- und NMR-Spektroskopie. Zusätzlich galt es Informationen über den denaturierten Zustand der M7-Varianten und der Wildtyp CXXC-Oxidoreduktasen zu sammeln. Hierfür wurden verschiedene CXXC-Peptide (Tetra- bis Oktapeptide) synthetisiert. Diese stellten das Modell für den denaturierten Zustand der Redoxproteine und fungierten als Referenz für die Charakterisierung der M7-Varianten. Im Ergebnis wurde ein breites Spektrum an M7-Redoxvarianten erzeugt. Das Redoxpotential ( $E^\circ$ ) variiert dabei von -178 bis -255 mV in Abhängigkeit der CXXC-Position und der Dipeptid-Sequenz zwischen den Cysteinen. Damit wurden im Vergleich zu den CXXC-Peptiden ( $E^\circ \approx -215$  mV), sowohl oxidierende als auch reduzierende Varianten erzeugt. Gegensätzlich den Wildtyp Oxidoreduktasen sind die M7-Varianten mit der Thioredoxin-CXXC-Sequenz weit oxidierender ( $E^\circ \leq -178$  mV) als die DsbA-Varianten ( $E^\circ \geq -255$  mV). Dies zeigt, dass für die M7-Varianten eine Wechselbeziehung aus Struktur und Redoxpotential vorliegt. Das Redoxpotential der Varianten ist dabei an die Proteinstabilität der Redoxspezies gekoppelt, wenn auch über einen komplexeren Zusammenhang



**Abbildung 0-1: CXXC-Implementierung in die M7-Struktur.** Die Lage der CXXC-Sequenz ist in Thioredoxin-Superfamilie am N-Terminus einer  $\alpha$ -Helix konserviert (**links**): hier anhand von Thioredoxin aus *E. coli* gezeigt. Das N-terminale Cystein nimmt dabei die N-Cap-Position im Loop-Helix-Übergang ein. Das CXXC-Tetrapeptid (im Quadrat hervorgehoben) wird in dieser Arbeit in den N-terminalen Übergangsbereich von  $\alpha$ -Helix<sub>1</sub> des M7-Proteins transferiert (**rechts**). Dadurch soll ein redoxaktives Protein generiert werden. Dargestellt werden Thioredoxin (pdb: 1XOB) und M7 (pdb: 2JVF) als Cartoon. Der relevante Strukturbereich (Loop-Helix) ist hervorgehoben. Die Seitenketten der Cysteine des CXXC sind zudem als gelbe *sticks* gezeigt.

als bei den natürlichen Oxidoreduktasen. So gilt für alle Varianten, dass die oxidierte Form stets instabiler ist als die korrespondierende reduzierte Struktur mit  $\Delta\Delta G_{\text{OX/RED}}$ -Werten von  $\approx 3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  bis zu  $\approx 53 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Entgegen den natürlichen CXXC-Oxidoreduktasen spiegeln somit die  $\Delta\Delta G_{\text{OX/RED}}$ -Werte nur bedingt den entsprechenden Redoxcharakter der jeweiligen Variante wider. Aus der NMR-Strukturaufklärung ging hervor, dass hierfür wahrscheinlich strukturelle Unterschiede in den nativen Zuständen der Redoxformen ursächlich sind. Damit herrscht eine schwer fassbare thermodynamische Wechselbeziehung aus Struktur und Redoxpotential in den Varianten. Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit nicht weiter aufgelöst werden.

Die kinetische Charakterisierung der Varianten umfasste die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Oxidations- und Reduktionsreaktion mit oxidierten und reduzierten DTT, sowie mit Ellman's Reagenz (DTNB). Hierbei zeigten die Varianten beachtliche Geschwindigkeitskonstanten von bis zu  $38 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  für deren Reduktion durch reduziertes DTT und waren damit nahezu 2 Größenordnungen schneller als die vergleichbare Reduktion von GSSG durch DTT ( $0.2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Dennoch ist die Reduktion der M7-Varianten bis zu 4 Größenordnungen langsamer als die der natürlichen Oxidoreduktasen. Die Oxidationskinetik der CXXC-Sequenz der M7-Varianten durch DTNB liegt mit  $47 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (pH 7.0) wiederum annähernd im Bereich der gleichen Reaktion von DsbA mit  $54 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die erzeugten Aktivitäten sind vergleichbar mit Literaturwerten für verschiedene initiale Designversuche zur Implementierung von Funktionalitäten in Proteine. Aus der pH-Titration der Reaktion der reduzierten Redoxvariante mit DTNB erhält man zudem die  $\text{pK}_a$ -Werte der CXXC-Cysteine. Die deprotonierte Thiolatform ist die für Disulfidaustauschreaktionen relevante katalytisch aktive Spezies, die in den Wildtyp-Oxidoreduktasen bevorzugt stabilisiert ist. So besitzen ebenso alle M7-Redoxvarianten ein Cystein, dessen  $\text{pK}_a$  gering, aber signifikant azider ist ( $\text{pK}_a \geq 7.3$ ), als das der isolierten CXXC-Redoxpeptide bzw. von freiem Cystein ( $\text{pK}_a \approx 8.4$ ).

Der Transfer der CXXC-Sequenz in das Strukturprotein M7 liefert somit redoxaktive Proteine, die Grundzüge der natürlichen CXXC-Oxidoreduktasen besitzen.

# 1. Einleitung

## 1.1. Proteinengineering

Das finale Ziel des Protein-Engineering ist es maßgeschneiderte Proteine herzustellen, die je nach Belieben in ihrer Funktion angepasst werden können. Mittels solcher Proteine wäre man beispielsweise in der Lage verschiedenste chemische Reaktionen mit hohen Ausbeuten und in extrem hoher Reinheit durchzuführen. Enzyme könnten dank spezifischer Optimierung fern von physiologischen Bedingungen operieren, wie Temperaturen über 100 °C oder in organischem Lösungsmittel. Hochaffine Bindungen von Proteinen könnten die Krankheitstherapie und -diagnostik revolutionieren. Die einzige Grenze für den Einsatz maßgeschneiderter Proteine liegt in der Vorstellungskraft ihrer Anwender. Noch ist dieses Vorhaben allerdings Utopie. Hauptsächlich liegt dies in der enormen Komplexität dieses Vorhabens begründet, das zu wiederholen, was die Evolution über Milliarden Jahre etabliert hat. Die heutigen natürlichen Enzyme stellen hochgradig angepasste Moleküle dar, deren Struktur und Funktion sich unzählige Male verändert hat. Ebenso komplex wie die Faltung eines Proteins vorauszusagen, wodurch dessen Funktion generiert wird, ist es nachzuvollziehen woher die einzelnen Wechselwirkungen kommen, die dem Enzym seine Aktivität verleihen. Um maßgeschneiderte Proteine zu erzeugen, gilt es zu verstehen, wie Topologie und Funktion einander bedingen. Hierfür werden verschiedene Ansätze verfolgt. Im klassischen Vorgehen werden natürliche Proteine verwendet, die in Abhängigkeit von Mutationen hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion bzw. Aktivität untersucht werden. Beispiele hierfür sind die veränderten Substratspezifitäten bei Subtilisin<sup>1</sup> oder von Glutathion Reduktase<sup>2</sup>. Ein neuerer Ansatz wird im *de novo* Proteindesign und in der *de novo* Proteinstrukturvorhersage verfolgt. Im *de novo* Design wird einer gesuchten Struktur entsprechend eine Aminosäuresequenz generiert. Im Gegensatz dazu wird in der *de novo* Proteinstrukturvorhersage anhand einer gegebenen Aminosäuresequenz eine Struktur vorhergesagt bzw. konstruiert. Für diese beiden Ansätze der Proteinfaltung gilt das Prinzip, dass der gefaltete Zustand des Proteins die Struktur der niedrigsten Energie darstellt. Im *de novo* Bereich werden besonders durch die Gruppe um David Baker große Fortschritte erzielt. Diese schufen mit den Rosetta-Programmen<sup>3,4</sup> die Möglichkeit, sowohl Proteinstrukturen *de novo* zu erzeugen, als auch Proteinstrukturen gegebenen Sequenzen zuzuordnen. So konnten atomgenaue Proteinstrukturen generiert werden, wie beispielsweise im Fall von Top7<sup>5</sup>, das erste *de novo* designte Protein, dessen Struktur die Grundlage für das in dieser Arbeit verwendete Protein M7<sup>6</sup> darstellte. Inzwischen konnten sogar strukturgenaue Proteinkomplexe im Megadaltonbereich erzeugt werden<sup>7</sup>. Gleichermaßen ist der Wert von Strukturvorhersage-Programmen, wie Rosetta@Home<sup>8</sup> nicht hoch genug einzuschätzen, da hier Proteine, die z.B. experimentell schwer zugänglich sind, eine Struktur zugeordnet werden kann. Dadurch wird ein Ausgangspunkt für strukturelle und funktionelle Analysen geschaffen, wie unter anderem am prognostizierten Strukturmodell eines Zink-Transporters gezeigt werden kann<sup>9</sup>. Der Erfolg im *de novo* Bereich ist untrennbar mit dem Fortschritt in der computergestützten Datenverarbeitung verbunden. Erst dadurch ist es überhaupt möglich die komplexe Verbindung der Strukturparameter zu prozessieren. Das Wissen um die Bildung der Proteinstruktur ist die Grundlage für die Erzeugung von spezifischen Aktivitäten der Proteine. Dies beinhaltet das Vorhandensein spezieller katalytischer Gruppen und von Resten, die spezifisch das Substrat im katalytischen Zentrum ausrichten. Aktivitäten können auf unterschiedliche Arten erzeugt werden. Es ist möglich ein existierenden *fold* zu verwenden, der entsprechend verändert wird. So werden zum Beispiel Metallionen durch spezifische Anordnungen von Aminosäuren in der Proteinstruktur koordiniert. Die  $Me^{2+}$  können dann strukturierende oder katalytische Funktionen

besitzen<sup>10</sup>. Die Variation in der Aktivität gelingt durch die Änderung der physikochemischen Umgebung dieser Kofaktoren. Neben Kofaktoren werden spezifische Aktivitäten durch funktionelle Reste von Aminosäuren der Primärsequenz des Proteins zu erzeugt. So konnten im Bindeprotein Calmodulin enzymatische Aktivität<sup>11</sup>, oder in ehemals nicht-katalytisch aktiven Strukturen, durch die Implementierung von katalytischen Triaden hydrolytischen Funktionen erzeugt werden<sup>12</sup>. Meist jedoch geht die initiale Veränderung der Ursprungsstruktur mit Proteininstabilität und Funktionsverlust bzw. geringer Aktivität einher<sup>11-16</sup>. Ursache für die geringe Aktivität kann zum Einen das zugrunde liegende physikochemische Modell zur Generierung der Aktivität sein, welches nicht vollständig oder nicht korrekt ist. Desweiteren sind Abweichungen des *de novo* designten Proteins zur vorhergesagten Zielstruktur möglich. Dies kann dazu führen, dass beispielsweise die Substratinteraktion blockiert wird, oder dass funktionelle Gruppen nicht wechselwirken können. Die Aktivität kann allerdings, ausgehend vom initialen Konstrukt in weiteren Design-Runden durch beispielsweise *directed evolution*, *deep sequencing*<sup>17</sup> und verschiedener Display-Methoden (z.B. *yeast display*) erheblich gesteigert werden<sup>12,18,19</sup>.

Eine weitere Möglichkeit der *de novo* Konstruktion von funktionellen Proteinen bietet die Maquett-Methode<sup>20</sup>. Hier wird die grundlegende Proteineinheit aus besonders wenigen Einzelbausteinen, lediglich vier  $\alpha$ -Helices, konstruiert. Diese sind in der Lage durch geringe Sequenzmodulationen unterschiedliche Kofaktor-assoziierte Redoxreaktionen durchzuführen<sup>21</sup>. Die Kombination verschiedener Kofaktoren ist sowohl innerhalb eines Maquetts oder durch die Assemblierung verschiedener Maquetts denkbar<sup>21</sup>. Die Bildung von supramolekularen Komplexen mit verschiedensten Funktionen ist eines der Hauptziele des Proteinengineering<sup>10,22</sup>. Die sich hierbei anbietenden Möglichkeiten in Produktdiversität und -ausbeute sind enorm.

Das Verständnis von Proteinfaltung, -struktur und -funktion ist von immensem Wert für die Entwicklung von Therapeutika. Durch optimierte Bindungspartner aus dem *de novo* Design können gezielt Enzyme<sup>23</sup> und Epitope von Antigenen inhibiert werden, wie am Beispiel eines Influenza-Inhibitors gezeigt<sup>17</sup>. Gleichermäßen können diese Entwicklungen auch in der Diagnostik eingesetzt werden. Desweiteren führte *de novo* Proteindesign zur Entwicklung neuartiger Materialien, beispielsweise zur Stromleitung<sup>24</sup>. Auch ist es möglich Nanostrukturen zu konstruieren, die verschiedenste geometrische Formen bilden<sup>22,25</sup>, unter anderem zum Einsatz im Wirkstofftransport *in vivo*. Bemerkenswert ist, dass *de novo* designte Enzyme Reaktionen ausführen können, für die es von der Natur sehr wenige bis keine Lösung gibt<sup>26</sup>. Beispiele hierfür sind die Knoevenagel-Kondensation<sup>27</sup> und die intermolekulare Diels-Alder-Reaktion<sup>28</sup> oder die Cyclopropanierung durch ein modifiziertes Cytochrom P450<sup>29</sup>. Für die Entwicklung und den Einsatz von *de novo* designten Proteinen scheint das Potential grenzenlos.

## 1.2. M7, ein nicht evolutionär gereiftes Protein

Im Protein-Engineering-Ansatz dieser Arbeit findet das artifizielle Protein M7 Verwendung. Die Nutzung eines artifiziellen *fold* und der damit verbundenen artifiziellen Aminosäuresequenz beherbergen spezielle Herausforderungen. Die Folgen von Mutationen in einem nicht evolutionär gereiften Protein sind schwer abzuschätzen, aber hier können auch unerwartete Erkenntnisse liegen. Die M7-Struktur stellt die Grundlage dar für alle Versuche dieser Arbeit. Es handelt sich um ein kleines 1-Domänen-Protein von 10.4 kDa, bestehend aus zwei  $\alpha$ -Helices, einem 5-strängigen  $\beta$ -Faltblatt und relativ kurzen Loops (Abbildung 1.2- I). M7 wurde von R. Dalügge (2007) *de novo* designt<sup>6</sup>. Es entstammt einem Algorithmus, dem "Tetrapeptidbasierten-Proteindesign", der versucht

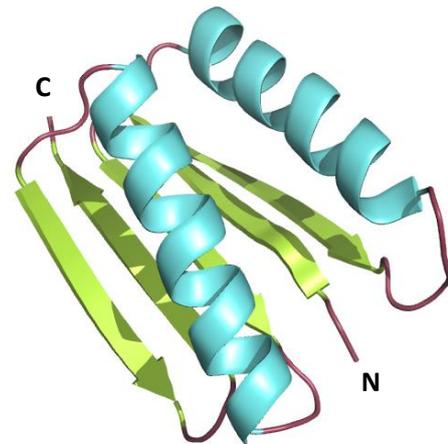
stringent eine Zielstruktur nachzubauen und damit alternative, nicht-homologe Aminosäuresequenzen generiert, die in die Zielstruktur falten<sup>6</sup>. Dieser Algorithmus nutzt die statistische Information der Konformation des Peptidrückgrats von Tetrapeptiden. Die Tetrapeptide wiederum entstammen einer nicht redundanten Datenbank aller Proteine der PDB. Der Algorithmus basiert darauf, dass in der Konformation von lediglich zwei Dieederwinkeln der Tetrapeptide ( $\Psi_2 / \Phi_3$ ) die räumliche Information für die beiden inneren Reste des Tetrapeptids ( $R_1-R_2-R_3-R_4$ ) ausreichend definiert ist. Im Folgenden wird anhand der vorgegebenen Dieederwinkel ( $\Psi / \Phi$ ) der Zielstruktur das optimale Tetrapeptid entsprechend der  $\Psi_2 / \Phi_3$ -Winkel ausgewählt. Die Zielstruktur wird durch die Aneinanderreihung von überlappenden Tetrapeptiden N- zu C-terminal nachgebaut. Dabei definiert das vorhergehende Tetrapeptid die drei N-terminalen Reste des folgenden Tetrapeptids. Nur der C-terminale Rest kann im neuen Tetrapeptidfragment variiert werden. Die Seitenketten werden erst nach Konstruktion der Aminosäuresequenz in die Berechnungen einbezogen und mittels Energieminimierungsfunktion validiert. Letztendlich wird angenommen, dass die energetisch günstigste Sequenz in die Zielstruktur faltet.

Grundlage für das Proteinrückgrat von M7 ist das, unter 1.1 erwähnte, *de novo* designte Protein Top7<sup>5</sup>. Im Ergebnis des Redesigns sind nur noch 26 von 92 Aminosäuren in M7 identisch mit Top7. Dabei generiert es weiterhin die gleiche Topologie und ist nahezu identisch in der Struktur<sup>30</sup>. Der RMSD-Wert für das Proteinrückgrat liegt bei 1.24 Å und ist damit im Messfehler der experimentellen NMR-Daten. Ein erfolgreiches Redesign von Proteinen ist noch immer eine immense Herausforderung, die nur selten zum Erfolg führt<sup>31</sup>. Umso erstaunlicher war die hohe Erfolgsquote im Redesign durch den Algorithmus von R. Dallüge, die neben M7 weitere vielversprechende Top7-Varianten generierte<sup>32</sup>.

Bemerkenswert am M7 ist ein weiterer Gewinn in der Proteinestabilität ( $\approx 80 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )<sup>6</sup> gegenüber dem bereits äußerst stabilen Top7 ( $\approx 55 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )<sup>5</sup>. Die Ursache für die extreme Stabilität von M7 ist vermutlich begründet durch die hohe Packungsdichte des hydrophoben Inneren von M7<sup>32</sup>, dem hohen Sekundärstrukturanteil und damit verbunden den kurzen Loopregionen<sup>33</sup>.

Kinetisch betrachtet, weisen kleinere ( $< 100$  Reste) Proteine natürlichen Ursprungs oft monophasische Faltungs- und Entfaltungsprozesse auf<sup>34</sup>. Für Top7, M7 und weitere *de novo* erzeugte Proteine<sup>35-37</sup> hingegen wurde festgestellt, dass diese trotz geringer Proteingröße relativ langsam falten und über komplexe Faltungswege verfügen. Eine Ursache hierfür könnte im Prinzip des Proteindesigns liegen, das auf hohe Stabilität abzielt, jedoch nicht den Faltungsweg berücksichtigt<sup>37</sup>.

Aufgrund seiner hohen Stabilität ( $\approx 80 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )<sup>6</sup> sollte sich M7 für Mutationen im Protein-Engineering eignen. Desweiteren ist das lösliche Monomer (11 kDa) in hoher Konzentration rekombinant produzierbar ( $\approx 1 \text{ mM}$ ), wodurch Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie möglich ist<sup>30</sup>. Diese Arbeit zielt darauf dem Strukturprotein M7 eine Redoxaktivität zu verleihen. Die Reaktivität ist im Falle von Redoxreaktionen an die Thermodynamik der Proteine gekoppelt



**Abbildung 1.2- I: Faltungstopologie M7(wt).** Cartoon-Darstellung des M7(wt) in sekundärstrukturabhängiger Färbung mit separater Kennung für (N)- und (C)-Terminus. M7(wt) besteht aus 92 Resten (10.4 kDa) in einer kompakten  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Faltungstopologie, die nicht in der Natur vertreten ist. pdb: 2JVF

(siehe 1.3). Damit soll die Fragestellung, in wie fern sich unter anderem Redoxaktivität und Stabilität im *de novo* designte M7 beeinflussen, in dieser Arbeit untersucht werden.

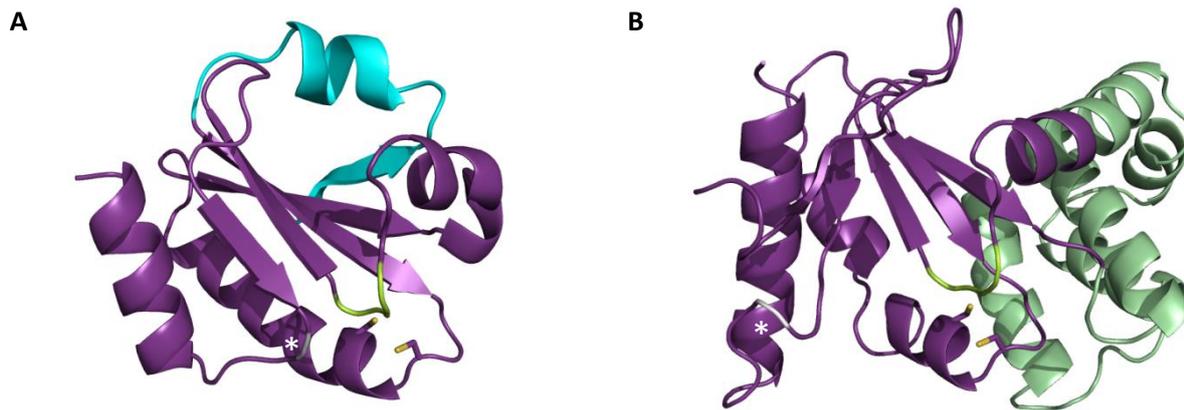
### 1.3. Die Redoxaktivität der Thioredoxin-Superfamilie

Redoxaktivität beschreibt das kinetische Potential eines Moleküls reduziert bzw. oxidiert zu werden. *In vivo* existiert ein großes Spektrum an Enzymen für die Ausübung von Redoxreaktionen, die Oxidoreduktasen. Gemein ist allen, dass sie den Transfer von Elektronen auf das Substrat bzw. die umgekehrte Reaktion katalysieren. Einteilen kann man die mannigfaltigen Oxidoreduktasen durch die genutzten funktionellen Gruppen, die die Redoxreaktion ermöglichen. Um nur ein paar Beispiele zu nennen, werden: **i)** Metallionen in Eisen-Schwefel-Clustern eingesetzt um Elektronentransportketten zu ermöglichen; **ii)** Die Reduktion des aromatischen Nicotinamidringes im  $\text{NAD}^+$  zum energiereichen NADH ist grundlegend im Katabolismus; **iii)** Die energiefreisetzende Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser durch Cytochrom-c-Oxidase ist die essentielle Reaktion für alles aerobe Leben; **iv)** Schwefel kann auf Aminosäureebene verschiedenste Oxidationsstufen einnehmen: unter anderem von der Thioetherbindung (-2) im Methionin, zum Disulfid (-1) im Cystin, dem Sulfoxid (0) bei einfach oxidierten Methionin bis hin zur Sulfonsäure (+4) im zweifach oxidierten Cystein. Der letztgenannte Schwefel, im speziellen die schwefelhaltige Aminosäure Cystein, ist die funktionelle Gruppe, auf die sich diese Arbeit konzentriert. Die hier relevanten Cysteine bilden das namensgebende Redoxzentrum der CXXC-Oxidoreduktasen, einer Klasse von Oxidoreduktasen, die in allen Lebensformen vertreten ist. Das redoxaktive CXXC-Tetrapeptid besteht aus zwei Cysteinen, die durch ein Dipeptid getrennt sind, wobei X für verschiedene Aminosäuren stehen kann. Durch Elektronenabgabe (Oxidation) und -aufnahme (Reduktion) bilden beide Cysteine ein dynamisches System. Für die Umwandlung zwischen oxidiertes (Disulfid) und reduziertes Form (Thiol bzw. Thiolat) der CXXC-Cysteine ist der direkte Kontakt zum Substrat über die Bildung eines gemischten Disulfids zwingend notwendig (Abbildung 1.3- II). Das Substrat fungiert als Elektronenakzeptor, bei seiner Reduktion, oder in der Substratoxidation als Elektronendonator. Beide Reaktionsrichtungen werden durch eine Vielzahl von CXXC-Oxidoreduktasen in unterschiedlichem Ausmaß katalysiert. Das stark reduzierende Thioredoxin ( $E^\circ = -271 \text{ mV}$ )<sup>38</sup> und das oxidierende DsbA ( $E^\circ = -122 \text{ mV}$ )<sup>39</sup> bilden dabei die jeweiligen Enden im Redoxspektrum der CXXC-Oxidoreduktasen. Für diese Arbeit dienen die CXXC-Tetrapeptide beider Enzyme als Basis für die Generierung eines redoxaktiven M7-Proteins.

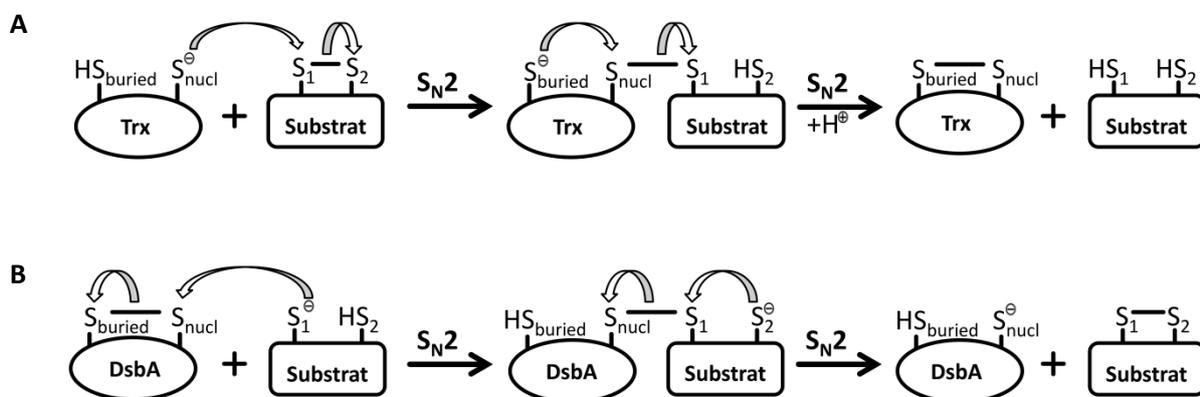
### 1.4. Thioredoxin – Grundlagen zu Struktur und Katalyse

Thioredoxin, zuerst durch Laurent *et al.* (1964)<sup>40</sup> beschrieben, kommt sowohl in Pro- als auch Eukaryoten vor und ist Bestandteil des Thioredoxin-Systems im Cytoplasma<sup>41</sup>. Dieses System aus Thioredoxin und der NADPH-abhängigen Thioredoxin-Reduktase stellt neben dem Glutaredoxin-System<sup>42</sup>, die Basis für den reduktiven Charakter des Cytoplasmas. Substrate von Thioredoxin sind cysteininhaltige Proteine in verschiedensten Funktionsbereichen der zellulären Homeostasis<sup>43</sup>. So ist Thioredoxin Teil von Signaltransduktionkaskaden<sup>44,45</sup>, die Zellteilung, -differenzierung und Apoptose regulieren, indem es beispielweise die DNA-Synthese<sup>42</sup> beeinflusst. Hieraus ergibt sich auch die Bedeutung von Thioredoxin in redoxassoziierten Krebserkrankungen<sup>46</sup>, wodurch seine Relevanz als klinisches Ziel noch zunimmt.

Die Faltungstopologie von Thioredoxin gilt als die Grundstruktur der CXXC-Oxidoreduktasen, die daher als Thioredoxin-*fold*-Oxidoreduktasen bezeichnet werden. Bei Thioredoxin handelt es sich um ein kleines Protein (11.7 kDa), bestehend aus einem 5-strängigen  $\beta$ -Faltblatt, das von vier  $\alpha$ -Helices umgeben wird (Abbildung 1.3- I-A). Im CXXC-Motiv von Thioredoxin werden die Cysteine durch das Glycin-Prolin-Dipeptid getrennt, dies führt zur Bildung eines stark reduzierenden Redoxpotentials von  $-271 \text{ mV}^{38}$ . Abbildung 1.3- II (A) stellt den Reaktionsmechanismus von Thioredoxin dar. Allen Thioredoxin-*fold*-Oxidoreduktasen ist gemein, dass ihr reaktives CXXC-Tetrapeptid am N-terminalen Ende einer  $\alpha$ -Helix lokalisiert ist (Abbildung 1.6- II und Abbildung 1.6- III). Das N-terminale Cystein ( $\text{Cys}_{\text{nucl}}$ ) befindet sich auf der N-Cap-Position, die den Loop-Helix-Übergangsbereich definiert<sup>47</sup>. Dieses Cystein ist lösungsmittlexponiert und reaktiv. Hingegen ist das C-terminale Cystein ( $\text{Cys}_{\text{buried}}$ ) in der Struktur des Thioredoxin verborgen und nicht reaktionsfähig im initialen Reaktionsschritt (die genaue physikochemische Erklärung der Reaktivität erfolgt in den Kapiteln 1.6 und 1.7). Die Substratbindung durch Thioredoxin ist vergleichbar der Wechselwirkung von zwei antiparallelen  $\beta$ -Strängen, bei der das Proteinerückgrat von Substrat und Enzym miteinander interagieren<sup>48</sup>. Diese Wechselwirkung findet über den sogenannten *cis*-Prolin Loop statt, der in der Thioredoxin-Superfamilie konserviert ist<sup>49</sup> und sich in unmittelbarer Nähe zur CXXC-Sequenz befindet (Abbildung 1.3- I-A). Zusätzlich wird die Substratbindestelle durch Reste von und um das CXXC-Tetrapeptid<sup>50</sup>, sowie den ebenfalls konservierte Glycin-Loop<sup>51</sup> (Abbildung 1.3- I-A), ergänzt. Wie in Abbildung 1.3- II (A) gezeigt, werden die oxidierten Disulfidbrücken im Substrat nukleophil durch die Thiolatspezies des katalytisch aktiven N-terminalen Cysteins ( $\text{Cys}_{\text{nucl}}$ ) der CGPC-Sequenz angegriffen. Dieser Vorgang verläuft in einer  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion<sup>52</sup>. Entsprechend bildet sich ein Übergangszustand aus angreifenden Nukleophil (Thiolat als Elektronendonator) und der Disulfidbrücke (Elektronenakzeptor) im Substrat. Aus dem Übergangszustand geht sowohl das gemischte Disulfid aus Thioredoxin und Substrat hervor, als auch die Abgangsgruppe des freiwerdenden Thiolats im Substrat ( $\text{S}_2^-$  bzw.  $\text{S}_2\text{H}$ ). Dabei folgt der Reaktionsmechanismus aller Disulfidaustauschreaktionen dem HSAB-Prinzip (*hard soft acid base*)<sup>53</sup>, das die kinetisch und thermodynamisch begünstigte Reaktion von harten Basen mit harten Säuren und weichen Basen mit weichen Säuren beschreibt. Das heißt, Moleküle die ähnlich in Größe und Polarisierbarkeit sind, werden bevorzugt miteinander reagieren. In Disulfidaustauschreaktionen wird dadurch bestimmt, welche Cysteine miteinander Disulfidbrücken bilden und welche Cysteine die Abgangsgruppen stellen. Die Bildung des gemischten Disulfid ( $\text{S}_{\text{nucl}}-\text{S}_1$ ) induziert strukturelle Änderungen im Thioredoxin<sup>54</sup>. Dies ermöglicht einen nukleophilen Angriff des C-terminalen Cysteins ( $\text{Cys}_{\text{buried}}$ ) in seiner Thiolatform ( $\text{S}_{\text{buried}}$ ) auf das gemischte Disulfid, resultierend im oxidierten Thioredoxin und dem freigesetzten, reduzierten Substrat. Lediglich für reduziertes Thioredoxin ist die Substratbindung detektierbar<sup>50,55</sup>, sodass aus der Katalyse resultierendes oxidiertes Thioredoxin und reduziertes Substrat sofort dissoziieren. Oxidiertes Thioredoxin wird anschließend über Thioredoxin-Reduktase NADPH-abhängig zu seiner reduzierten Form regeneriert<sup>41</sup>.



**Abbildung 1.3- I: Topologie von Thioredoxin und DsbA.** **A)** Thioredoxin (violett, pdb: 1XOA aus *E. coli*) besteht aus der eigentlichen Thioredoxin-*fold*-Domäne, die sich aus einem 4-strängigen  $\beta$ -Faltblatt, welches von drei Helices  $\alpha_2$  bis  $\alpha_4$  umgeben wird, zusammensetzt. Zusätzlich zu der Thioredoxin-*fold* besitzt Thioredoxin noch die  $\alpha_1$ -Helix und den  $\beta_1$ -Strang (cyan). Domänendefinition nach Shouldice *et al.* (2011)<sup>56</sup>. **B)** DsbA (pdb: 1A2L aus *E. coli*) setzt sich aus der Thioredoxin-Domäne (violett) zusammen, die sich aus einem 4-strängigen  $\beta$ -Faltblatt und zwei Helices  $\alpha_1$  und  $\alpha_7$  aufbaut. Zusätzlich ist eine helikale Domäne (dunkelgrün) in DsbA eingefügt, die sich aus den Helices  $\alpha_2$  bis  $\alpha_5$  und  $\alpha_6$  ergibt. Domänendefinition nach Martin *et al.* (1993)<sup>57</sup>. Strukturen werden als Cartoon gezeigt und Cysteinseitenketten der CXXC-Sequenz sind als *sticks* hervorgehoben, mit dem Schwefelatom in Gelb. Die *cis*-Prolin Loops sind in hellgrün gezeigt, das weiße Sternchen (\*) markiert die Glycin-Loops (hellgrau) der Thioredoxin-Domänen (Trx: Gly<sub>92</sub>; DsbA: Gly<sub>165</sub>). Darstellung modifiziert nach Voigtmann and Lilie (2017)<sup>58</sup>.



**Abbildung 1.3- II: Reaktionsmechanismus von Thioredoxin und DsbA.** Nukleophile Angriffe werden nur durch die Thiolatform ( $S^-$ ) in einem  $S_N2$ -Mechanismus durchgeführt und sind hier durch Pfeile gekennzeichnet. **A)** Reduktion von oxidiertem Substrat durch reduziertes Thioredoxin (Trx). Das Thiolat ( $S_{nucl}^-$ ) des katalytisch aktiven N-terminalen Cysteins des CXXC-Motivs greift die intramolekulare Disulfidbrücke im Substrat an. Dies ergibt ein gemischtes Disulfid, das durch den folgenden nukleophilen Angriff des C-terminalen verborgenen Cysteins ( $S_{buried}^-$ ) wieder aufgebrochen wird. Es bildet sich reduziertes Substrat und oxidiertes Thioredoxin, das anschließend durch Thioredoxin Reduktase wieder zu seiner aktiven reduzierte Form regeneriert wird (nicht dargestellt). **B)** Oxidationsreaktion von reduziertem Substrat durch oxidiertes DsbA. Es ist entscheidend, dass im Substrat die Cysteine in der Thiolatform vorhanden sind, damit die beiden  $S_N2$ -Reaktionen ablaufen. Ein erhöhter  $pK_a$ -Wert des C-terminalen Cysteins ( $HS_{buried}$ ) im DsbA ( $pK_a > 10$ )<sup>59,60</sup> verhindert die Rückreaktion des gemischten Disulfid hin zur Ausgangssituation. Die Regeneration von oxidierten DsbA wird von DsbB katalysiert (nicht dargestellt). Darstellung modifiziert nach Voigtmann and Lilie (2017)<sup>58</sup>.

### 1.5. DsbA – Grundlagen zu Struktur und Katalyse

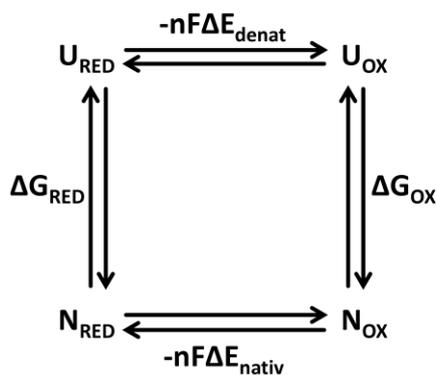
Cytoplasmatische Proteine haben den Vorteil im geschützten und gepufferten System der Zelle ihre Funktion auszuüben. Proteine, die hingegen im Periplasma oder extrazellulär lokalisiert sind, benötigen aufgrund destrukturierender Faktoren (pH, Temperatur, destabilisierende Substanzen), zusätzliche Stabilisierung. Eine erhöhte Rigidität und damit verbesserte Haltbarkeit kann unter anderem mittels Disulfidverbrückung von Cysteinen erreicht werden<sup>61</sup>. Zu diesem Zweck weist das Periplasma einen oxidierenden Charakter auf. Teil der oxidativen Proteinfaltungsmaschinerie im Periplasma gram-negativer Bakterien<sup>62</sup> ist die Oxidoreduktase DsbA, die während der Proteinfaltung die Disulfidverbrückung katalysiert. DsbA (*disulfide bond*) wurde unabhängig durch Bardwell *et al.* (1991)<sup>63</sup> und Kamitani *et al.* (1992)<sup>64</sup> entdeckt. Verschiedenste Funktionen sind mit DsbA verbunden, so katalysiert es die Enterotoxinbildung<sup>65</sup> und hat bedeutend Anteil in der Formation des bakteriellen Pilus<sup>66</sup> und der Flagelle<sup>67</sup>. Damit ist DsbA auch für die Therapie von *E. coli* vermittelten Infektionskrankheiten ein interessantes Ziel. DsbA gehört zur Thioredoxin-Superfamilie (Abbildung 1.3- I-B), deren Redoxzentrum das CXXC-Motiv bildet. Das cysteintrennende Dipeptid wird im Fall von DsbA durch Prolin-Histidin gebildet. Das CPHC-Motiv im DsbA besitzt ein stark oxidierendes Redoxpotential von -122 mV<sup>39</sup>. Aufgrund der Rolle in der Proteinfaltung wird die bevorzugte Bindung von nicht-nativen Proteinen als Substrat durch DsbA postuliert<sup>68</sup>. Die Anzahl möglicher Substrate wird dabei auf mehrere Hundert geschätzt<sup>69,70</sup> und entsprechend gering muss die Substratspezifität von DsbA ausfallen<sup>71</sup>. Durch den charakteristischen Thioredoxin-*fold* gleicht die Substratbindung von DsbA der durch Thioredoxin (siehe 1.4). So erfolgt eine Wechselwirkung zwischen dem Peptidrückgrat von Substrat und dem des *cis*-Prolin Loops von DsbA<sup>38,71</sup>. Ebenso unterstützen Reste von und um das CXXC-Motiv die Bindung<sup>71</sup>. Zusätzlich besitzt DsbA eine helixreiche Domäne, die nicht im Thioredoxin vorhanden ist (Abbildung 1.3- I). Diese helikale Domäne trägt ebenfalls zur Substratbindung bei<sup>71</sup>. Der initialen Bindung zwischen oxidiertem DsbA und reduziertem Substrat folgt der nukleophile Angriff eines Cysteins (Thiolat-Form bzw.  $S_1^-$ ) aus dem Substrat auf die intramolekulare Disulfidbrücke im DsbA (Abbildung 1.3- II-B). Die Reaktion folgt dem unter 1.4 beschriebenen HSAB-Prinzip, das definiert, welche Cysteine miteinander eine Disulfidbrücke bilden (Substrat- $S_1^-$ - $S_{cat}$ -DsbA) und welches als Abgangsgruppe (DsbA- $S_{buried}^-$ ) fungiert. Nach Couprie *et al.* (2000)<sup>72</sup> ist bereits die Bildung des gemischten Disulfids thermodynamisch getrieben. Hierfür muss das gemischte Disulfid stabiler als DsbA in seiner oxidierten Form sein. Das gemischte Disulfid zerfällt anschließend durch den erneuten Angriff eines nukleophilen Cysteins aus dem Substrat ( $S_2^-$ ) unter Bildung des dsulfidverbrückten Substrates und des thermodynamisch bevorzugten reduzierten DsbA<sup>73</sup>. Die Regeneration von oxidierten DsbA erfolgt durch das membranständige DsbB. Die Energie zur Bildung des thermodynamisch ungünstigen, oxidierten DsbA entstammt final der Sauerstoffreduktion in der Atmungskette<sup>74</sup>. Dabei überlappt, ähnlich der Thioredoxin- und Thioredoxin-Reduktase-Wechselwirkung<sup>75</sup>, die DsbB-Bindestelle zu großen Teilen mit der der Substrate. Da DsbB und Substrat zu unterschiedlichen Zeitpunkten des katalytischen Zyklus an DsbA binden müssen, ist eine Selektion erforderlich. Dies wird durch unterschiedliche Struktur dynamiken der beiden Domänen<sup>76</sup> und durch verschiedene Rotamerstellungen des Histidin in der CPHC-Sequenz vermittelt<sup>71</sup>.

Durch den stark oxidierenden Charakter von DsbA können nicht-native Disulfidverbrückungen entstehen, die Proteinmissfaltung und Aggregation zur Folge haben können. Für diesen Fall existiert das DsbC/DsbG:DsbD System<sup>77,78</sup>, das nicht-native Disulfide wieder reduziert. Daraufhin erfolgt durch DsbA die erneute Oxidation um die native Disulfidverbrückung zu generieren. Dsb-Oxidoreduktasen der gram-negativen Bakterien bilden damit ein Disulfidisomerisierungs-System. Eukaryotische Zellen

hingegen besitzen für die Disulfidaustauschreaktion eine Oxidoreduktase, die sowohl Oxidation, Reduktion und Isomerisierung katalysiert: die PDI (Proteindisulfidisomerase), die ebenfalls der Thioredoxin-Superfamilie angehört.

### 1.6. Modulatoren des CXXC-Redoxpotentials

Für den Designansatz dieser Arbeit dienen Thioredoxin und DsbA als Quelle der CXXC-Sequenz. Beide Proteine generieren durch den Thioredoxin-*fold* für das CXXC-Motiv eine strukturell sehr ähnliche Umgebung. Desweiteren unterscheiden sich die beiden Redoxzustände der Oxidoreduktasen nur wenig in ihrer Struktur (Abbildung 1.6- II). Dennoch variieren beide Enzyme extrem in ihren Redoxpotentialen ( $\Delta\Delta E^\circ \approx 150$  mV). Das Redoxpotential als thermodynamische Größe beschreibt das Verhältnis der oxidierten Spezies zur reduzierten Form im Gleichgewicht. Dies ist wiederum direkt an die Proteininstabilität gekoppelt, wodurch sich ein thermodynamischer Kreislauf ergibt (Abbildung 1.6- I). Die einfachste thermodynamische Verbindung besteht aus vier Zuständen: **i)** oxidiert nativ ( $N_{OX}$ ); **ii)** reduziert nativ ( $N_{RED}$ ); **iii)** oxidiert denaturiert ( $U_{OX}$ ) und **iv)** reduziert denaturiert ( $U_{RED}$ ). Stabilisierung bzw. Destabilisierung der einzelnen Zustände kann folglich zur Änderung des Redoxpotentials führen. Für das Redoxpotential der Thioredoxin-*fold*-Oxidoreduktasen sind die nachfolgenden gemeinsam wirkenden Faktoren ursächlich.



**Abbildung 1.6- I: Thermodynamischer Kreislauf von Oxidoreduktasen.** In vereinfachter Betrachtung existieren für Oxidoreduktasen, wie Thioredoxin, vier thermodynamische Zustände: oxidiert (**OX**); reduziert (**RED**); nativ (**N**); denaturiert (**U**). Die Zustände sind über die freien Energien der Entfaltung ( $\Delta G_{OX}$ ,  $\Delta G_{RED}$ ), und ihre Redoxpotentiale ( $\Delta E_{denat}$ ,  $\Delta E_{nativ}$ ) miteinander verbunden. Redoxpotentiale ( $\Delta E$ ) können in die entsprechende freie Energie ( $\Delta G_{OX/RED}$ ) nach Gleichung 2-I umgewandelt werden:

$$\Delta G_{OX/RED} = -nF\Delta E \quad 2-I$$

Hierbei ist  $\Delta E$  das Redoxpotential in Volt (V);  $n$  ist die Anzahl ausgetauschten Elektronen pro Mol Produkt;  $F$  ist die Faraday-Konstante [ $96\,487\text{ J}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ].

Im Idealfall ergeben alle Werte des Kreislaufes in der Summe ( $\Sigma\Delta G$ )  $0\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  nach Gleichung 2-II:

$$-nF\Delta E_{nativ} - (-nF\Delta E_{denat}) = \Delta G_{RED} - \Delta G_{OX} \quad 2-II$$

### Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk und Cysteinyl- $pK_a$

Der größte Einfluss auf die Cysteine und damit auf das Redoxpotential wird wahrscheinlich durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken innerhalb des CXXC-Motivs erzeugt, im Speziellen Wasserstoffbrücken des katalytisch aktiven N-terminalen Cysteins. Die Stärke der wirkenden Wasserstoffbrücken lässt sich anhand des  $pK_a$ -Wertes der Sulfhydryl-Gruppe dieses Cysteins sehr gut verdeutlichen. Der  $pK_a$ -Wert gibt das Verhältnis zwischen protonierten Thiol und der nukleophilen Thiolatspezies an, die für Disulfidaustauschreaktionen (Abbildung 1.3- II) zwingend nötig ist. Die protonierte Sulfhydrylgruppe ist etwa  $5 \times 10^{10}$  reaktionsträger für nukleophile Reaktionen als das Thiolat<sup>79,80</sup> und damit katalytisch nicht relevant. Durch ihren moderaten  $pK_a$ -Wert haben Cysteine bereits unter physiologischen Bedingungen den Vorteil, gute Nukleophile zu sein. Ohne spezifische

Aktivierung weisen Cysteine in unstrukturierten Peptiden  $pK_a$ -Werte von 8.1 - 8.8<sup>81</sup> auf, was unter pH 7.0 einem Anteil an reaktiven Thiolat von 2 bis 7 % entsprechen würde. Für Thioredoxin sinkt der  $pK_a$ -Wert des N-terminalen Cysteins auf  $\approx 7.1$ <sup>82</sup> und für DsbA sogar auf 3.3<sup>39</sup>, wodurch der Thiolatanteil bei pH 7.0 bei 44 % für Thioredoxin liegt und bei DsbA auf nahezu 100 % steigt. Die N-Cap-Position des aziden Cysteins am Ende einer Helix führt dazu, dass die nachfolgenden Reste im CXXC-Motiv in ihrer Anordnung direkte Donatoren für Wasserstoffbrücken sind. Im DsbA (Abbildung 1.6- III-B) kommen dafür vier Gruppen in der C<sub>30</sub>PHC<sub>33</sub>-Sequenz in Frage: **i)** die Sulfhydryl-Gruppe und **ii)** das Amid-Proton des C-terminalen Cysteins (Cys<sub>33</sub>); **iii)** das Amidproton und **iv)** die Imidazol-Seitenkette des Histidin<sub>32</sub>. Im Thioredoxin (Abbildung 1.6- III-A) hingegen sind nur zwei Gruppen im C<sub>32</sub>GPC<sub>35</sub>-Motiv relevant für Wasserstoffbrücken mit dem Thiolat des N-Cap-Cysteins: **i)** die Sulfhydryl-Gruppe und **ii)** das Amid-Proton des C-terminalen Cysteins (Cys<sub>35</sub>). Für beide Motive gilt, dass Prolin kein Donor für Wasserstoffbrücken sein kann, sowie, dass Reste in der i+1-Position (i entspricht dem N-Cap-Cystein) konformationell nicht für Wasserstoffbrücken zum Thiolat in Frage kommen. Es gilt damit der Zusammenhang: Je mehr Wasserstoffbrücken das Thiolat stabilisieren, desto niedriger ist der  $pK_a$  des N-terminalen Cysteins, und desto oxidierender wird das Redoxpotential. Diese Korrelation zwischen steigendem (stärker oxidierenden) Redoxpotential und sinkendem  $pK_a$  für das N-terminale Cystein wurde ebenfalls für eine Reihe von DsbA-Mutanten beschrieben<sup>83</sup>. Der  $pK_a$ -Wert des in der Proteinstruktur verborgenen<sup>84</sup> C-terminalen Cysteins liegt für Thioredoxin bei 8.4<sup>85</sup> (gleich freiem Cystein<sup>81</sup>) und für DsbA bei basischeren  $> 10$ <sup>59,60</sup>. Ebenso wie ein sehr niedriger  $pK_a$  für einen stabilisierten reduzierten Zustand steht, so ist dies auch der Fall für sehr hohe  $pK_a$ -Werte, da damit die protonierte Sulfhydryl-Form stark bevorzugt wird. Ein bevorzugter reduzierter Zustand führt in einer Wechselbeziehung zur Ausbildung eines oxidierten Redoxpotentials. So wird für das oxidierende DsbA der reduzierte Zustand thermodynamisch mit  $\Delta\Delta G_{OX/RED} \approx 15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  bevorzugt<sup>39</sup> und für Thioredoxin als Reduktionsmittel ist es die oxidierte disulfidverbrückte Form, die um ca.  $17 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  stabiler ist als ihr reduziertes Gegenstück<sup>82</sup>. Der thermodynamische Zusammenhang zwischen Redoxpotential und Proteinstabilität nach Abbildung 1.6- I konnte für die Thioredoxin-*fold*-Oxidoreduktasen in guter Näherung bestätigt werden<sup>58,73,86</sup>.

### Der *cis*-Prolin Loop

Der *cis*-Prolin Loop ist eine stark konservierte Struktur der Thioredoxin-Superfamilie und dient sowohl der Substratbindung als auch der Wechselwirkung mit dem Upstream-Enzym zur Regeneration der katalytisch aktiven Form der Oxidoreduktase (siehe 1.4 und 1.5). Durch seine räumliche Nähe ( $< 4 \text{ \AA}$ ) zur CXXC-Sequenz ist der dem *cis*-Prolin vorangehende Rest über seine Seitenkette in der Lage mit dem CXXC-Tetrapeptid zu interagieren (Abbildung 1.6- III). Die Mutationen dieses Restes zu potentiellen Wasserstoffbrücken-Donatoren (z.B. Thr) führten zu sinkenden  $pK_a$ -Werten im N-terminalen Cysteinen und steigenden (oxidierenden) Redoxpotentialen<sup>38</sup>. Mutationen hin zu hydrophoberen Resten (z.B. Val) dagegen erhöhten den  $pK_a$ -Wert und verringerten das Redoxpotential bzw. stabilisierten die Disulfidbrücke<sup>38</sup>. Im Vergleich zum Wasserstoffbrückennetzwerk, innerhalb des CXXC-Motivs, ist der relative Einfluss des *cis*-Prolin Loops auf das Redoxpotential geringer. So veränderte sich für DsbA das Redoxpotential durch Mutationen im CXXC-Dipeptid bis zu  $100 \text{ mV}$ <sup>83</sup> und für Thioredoxin bis zu  $70 \text{ mV}$ <sup>87</sup>. Hingegen führten für DsbA Mutationen im *cis*-Prolin Loop zu maximalen Unterschieden von  $25 \text{ mV}$ <sup>69</sup> und für Thioredoxin von  $45 \text{ mV}$ <sup>38,88</sup>.

### N-Cap-Position des N-terminalen Cysteins

Wie zuvor beschrieben, ist die Lage der CXXC-Sequenz am N-Terminus einer  $\alpha$ -Helix in allen Thioredoxin-*fold*-Oxidoreduktasen konserviert<sup>49</sup> (Abbildung 1.6- II). Helixstrukturen besitzen einen Dipol, dessen positiver Pol am N-Terminus der Helix und der negative am C-Terminus lokalisiert sind<sup>89,90</sup>. Die Dipolladung wird durch den permanenten Dipol der Peptidbindung gebildet. Dabei erzeugen jeweils die letzten zwei Helixwindungen an den Helix-Termini den Hauptanteil der Ladung<sup>89-91</sup>. Das Maximum dieser elektrostatischen Wechselwirkung betrifft das Helix-N- bzw. Helix-C-Cap<sup>47</sup>, die den Übergangsbereich zwischen Loop-Helix (N-Cap) bzw. Helix-Loop (C-Cap) definieren. Zur Helixstabilisierung weist der hier relevante N-Cap-Rest tendenziell negativ geladene Seitenketten auf, wie z.B. die Thiolatform von Cysteinen. Die Berechnungen für den Einfluss auf den  $pK_a$  der Sulfhydryl-Gruppe von Cysteinen am Helix-N-Terminus variieren von 6.3 bis 11.7  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , das einer  $pK_a$ -Absenkung der Thiolgruppe um 1.6 bis 2.1 pH-Einheiten entsprechen würde<sup>92,93</sup>. Dabei ist für die optimale Wechselwirkung mit dem Dipol die korrekte Rotamerstellung der Cysteinseitenkette entscheidend. Es muss beachtet werden, dass die hier genannten Berechnungen zur Wechselwirkung Näherungen sind, die Unterschiede in der Lösungsmittelzugänglichkeit bzw. Dielektrizitätskonstante und zusätzliche Einflüsse von Seitenketten nicht einbeziehen. Desweiteren nimmt Prolin bei der Dipol-Untersuchung eine Sonderstellung ein, da es über kein Amid-Proton verfügt und damit einen potentiell kleineren Dipol generiert<sup>90</sup>. Der Bedeutung von Prolin innerhalb der ersten Helix-Windung auf den  $pK_a$  des N-Cap-Restes, wie im CXXC-Motiv von Thioredoxin (CGPC) und DsbA (CPHC), wurde bisher nicht untersucht.

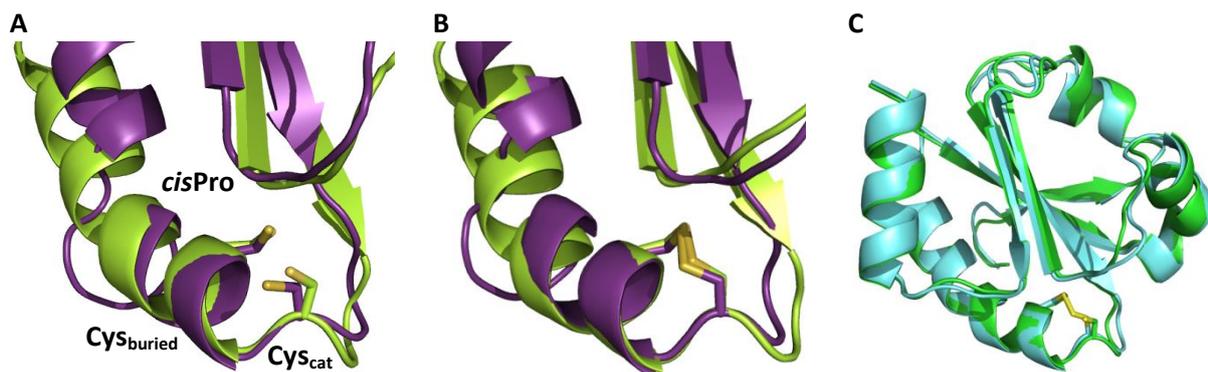
### Die Geometrie der Disulfidbrücke

Die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke im CXXC-Motiv führt, sowohl für die CXXC-Sequenz, seine Umgebung, als auch für die Gesamtstruktur der Thioredoxin-*fold*-Oxidoreduktasen zu keinen größeren Konformationsänderungen (Abbildung 1.6- II). Oxidiert bilden die CXXC-Oxidoreduktasen stets eine rechtsgängige Disulfidbindung. Rechtsgängige Disulfide<sup>94</sup> weisen für den  $\chi_3$  Dieder-Winkel, zwischen den beiden Schwefelatomen,  $\approx +90^\circ$  auf, dabei beträgt der Abstand zwischen den  $C_\alpha$ - $C_\alpha$ -Atomen der Cysteine  $\approx 5 \text{ \AA}$ . Für DsbA und Thioredoxin wird praktisch die identische Konformation für den 12-atomigen Disulfidring geformt<sup>95</sup>. Daraus resultieren wiederum sehr ähnliche Dieder-Winkel-Energien, die ein Maß für konformationelle Spannungen der Disulfidbindung darstellen. Für das CPHC-Disulfid von DsbA<sup>96</sup> ergibt dies eine Winkelenergie von  $16 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  und für das CGPC-Motiv von Thioredoxin<sup>96</sup> liegt diese bei  $14 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Damit trägt die gering höhere Winkelspannung nur marginal zum Unterschied im Redoxpotential ( $\Delta\Delta E^\circ \approx 150 \text{ mV}$ ) zwischen den beiden Oxidoreduktasen bei, ebenso ist diese nicht Hauptursache für die Stabilitätsunterschiede ( $\Delta\Delta G_{\text{OX/RED}}$ ) zwischen den Redoxzuständen von  $-17 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  für Thioredoxin<sup>39</sup> und  $+15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  für DsbA<sup>82</sup>.

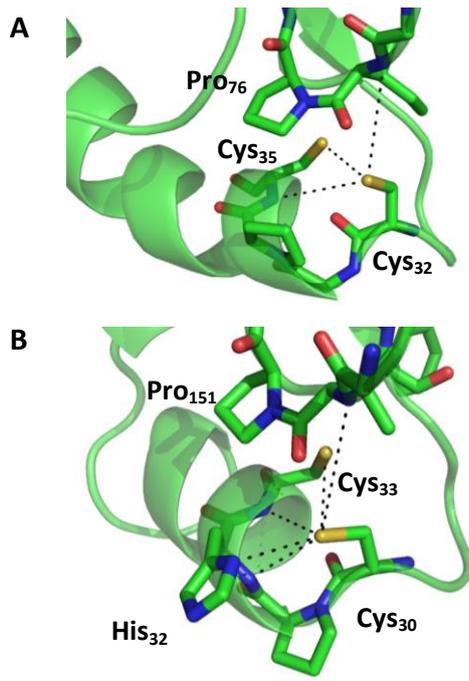
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Variationen im Netzwerk der Wasserstoffbrücken wohl den größten Anteil am Unterschied der Redoxpotentiale der beiden Enzyme generieren. Desweiteren trägt der *cis*-Prolin Loop signifikant zur Modellierung des Redoxpotentials bei. Hingegen haben die N-Cap-Position des reaktiven Cysteins und die Geometrie der Disulfidbindung einen geringeren Einfluss auf das Redoxpotential der CXXC-Sequenz. Mögliche zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen mit der CXXC-Sequenz sollten kaum Bedeutung haben<sup>97</sup>. So gezeigt für DsbA, bei dem die Mutation von geladenen Resten in der Umgebung der

CXXC-Sequenz zu keiner wesentlichen Änderung des Redoxpotentials und des  $pK_a$ -Wertes des reaktiven Cysteins führte<sup>98</sup>.

Die vollständige Beschreibung des thermodynamischen Kreislaufes (Abbildung 1.6- I) macht es unabdingbar den denaturierten Zustand einzubeziehen. Der Charakterisierung des ungefalteten Zustands wird häufig weniger Aufmerksamkeit gewidmet. Für den denaturierten Zustand wird der Unterschied zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand hauptsächlich aus einer allgemeinen Formel nach Pace *et al.* (1988)<sup>99</sup> über entropische Verluste durch die Disulfidbildung beschrieben. Der denaturierte Zustand ist allerdings keine homogene *random coil* Struktur für jegliche Sequenzen. Es ist vielmehr eine Ansammlung von lokalen sequenzabhängigen nativ-ähnlichen und nicht-nativen Reststrukturen<sup>100,101</sup>. Vor allem Prolin- und Glycin-Reste können hierbei die Bildung von Turn-Strukturen fördern und die freie Energie von Peptidsequenzen erheblich bestimmen<sup>102,103</sup>. Fügt man, wie im Falle der CXXC-Motive, einer prolin-glycin-haltigen-Sequenz eine mögliche Disulfidbindung hinzu, ergibt sich eine besondere Situation, bei der sowohl das *cis/trans*-Gleichgewicht der Peptidbindung des Prolins, mögliche Turn-Strukturen im reduziert-denaturierten Zustand und konformationelle Einschränkungen durch den Ringschluss der Disulfidbildung eine wichtige Rolle spielen können. Dies könnte erheblich zu Unterschieden in der freien Energie der denaturierten Zustände der CPHC- und CGPC-Sequenz von DsbA bzw. Thioredoxin beitragen.



**Abbildung 1.6- II: Vergleich der Redoxzustände von Thioredoxin und DsbA.** Gegenübergestellt wird die CXXC-Umgebung für **A)** die reduzierten Zustände und **B)** die oxidierten Zustände von Thioredoxin (grün) und DsbA (violett), beide aus *E. coli*. Dabei unterscheiden sich die Redoxzustände beider Oxidoreduktasen nur geringfügig. Dies wird sowohl im direkten Vergleich der CXXC-Sequenz am Helix N-Terminus (*Cys<sub>cat</sub>* und *Cys<sub>buried</sub>*) als auch für den *cis*-Prolin Loop (*cisPro*), der sich oberhalb der CXXC-Sequenz befindet, deutlich. **C)** Ebenfalls führt der Wechsel zwischen oxidiertem (blau) und reduziertem (grün) Zustand für die Oxidoreduktasen der Thioredoxin-Superfamilie nicht zu größeren Strukturänderungen, wie hier beispielsweise für Thioredoxin gezeigt. Alle Strukturen werden als Cartoon gezeigt, in der zusätzlich die Cysteinseitenketten der CXXC-Motive als *sticks* hervorgehoben sind. Pdb: reduziert (DsbA: 1A2L; Trx: 1XOB); oxidiert (DsbA: 1A2M; Trx: 1XOA).



**Abbildung 1.6- III: Die Wasserstoffbrücken der CXXC-Sequenz von Thioredoxin und DsbA.** Die Anzahl und die Ausrichtung der Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) um das N-terminale Cystein haben entscheidenden Einfluss auf die  $pK_a$ -Werte der Cysteine, das Redoxpotential, sowie die Gesamtstabilität ( $\Delta G_{N \rightarrow U}$ ) der Redoxzustände der Oxidoreduktasen. Gezeigt wird die CXXC-Umgebung von **A)** *E. coli* Thioredoxin und **B)** *E. coli* DsbA. Die Struktur wird als Cartoon gezeigt, in der zusätzlich die Reste des CXXC-Motivs und des *cis*-Prolin Loops als *sticks* hervorgehoben sind. Mögliche WBB-Donatoren für das N-terminale Cystein sind abgebildet (gestrichelte Linien). Die bestimmten Abstände für die WBB sind wie folgt:

**A)** Thioredoxin: Schwefel des Cys<sub>32</sub> mit Cys<sub>35</sub>S<sub>γ</sub> (3.7 Å), Cys<sub>35</sub>N<sub>α</sub> (4.7 Å) und Ile<sub>75</sub>N<sub>α</sub> (5.2 Å).

**B)** DsbA: Schwefel des Cys<sub>30</sub> mit Cys<sub>33</sub>S<sub>γ</sub> (3.5 Å), Cys<sub>33</sub>N<sub>α</sub> (3.6 Å), His<sub>32</sub>N<sub>α</sub> (3.6 Å), His<sub>32</sub>N<sub>δ1</sub> (3.6 Å) und Val<sub>150</sub>N<sub>α</sub> (5.8 Å).

Pdb: Trx: 1XOB; DsbA: 1A2L

Darstellung modifiziert nach Voigtmann and Lilie (2017)<sup>58</sup>.

## 1.7. Katalyserate von Disulfidaustauschreaktionen

Oxidoreduktasen der Thioredoxin-Superfamilien unterscheiden sich in ihrer Redoxaktivität von nicht katalysierten Reaktionen um bis zu vier Größenordnungen. So verläuft beispielsweise die Reduktion von Insulin durch Thioredoxin<sup>104</sup> mit einem  $k_{cat}$ -Wert von  $1.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  gegenüber  $5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  der Insulin-Reduktion durch DTT<sup>105</sup>. Dabei ist das Redoxpotential von DTT nochmals 60 mV reduzierender als das von Thioredoxin. Dies ist ein gutes Beispiel dafür, dass das Redoxpotential die Redoxkinetik zwar beeinflusst, diese aber nicht als einziger Parameter determiniert. Im Folgenden soll verdeutlicht werden, durch welche Faktoren die hohen katalytischen Effekte der CXXC-Oxidoreduktasen erzeugt werden.

### Die Rolle des $pK_a$ -wertes

Disulfidaustauschreaktionen hängen, wie unter 1.6 beschrieben, vom Vorhandensein des reaktiven Thiolats ab, das nukleophil Disulfidbindungen angreifen kann. Damit könnte irrtümlich angenommen werden, dass ein sehr niedriger Thiol- $pK_a$ , der mit einem hohen Thiolat-Anteil gleichzusetzen ist, ebenso für hohe Geschwindigkeitskonstanten steht. Dies ist jedoch nicht der Fall, da mit sinkenden  $pK_a$  die Nukleophilie des Thiolats sinkt<sup>106</sup>. Ein niedriger  $pK_a$  bedeutet, dass eine besondere Stabilisierung des Thiolats vorliegt. Diese muss wiederum für einen nukleophilen Angriff erst überwunden werden. Die Bedeutung des verringerten  $pK_a$ -wertes sollte in Abhängigkeit der Art der katalysierten Reaktion betrachtet werden. DsbA oxidiert cysteinhaltige Substrate (Abbildung 1.3- II-B). In beiden beteiligten  $S_N2$ -Reaktionen werden die zwei DsbA-CXXC-Cysteine als Abgangsgruppen frei. Zuerst das C-terminale Cystein, mit dem basischen  $pK_a$  von  $> 10^{59,60}$  und anschließend das N-terminale Cystein mit dem sehr niedrigen  $pK_a$  von 3.3<sup>39</sup>. Der  $pK_a$ -Wert der Seitenkette von freiem Cystein liegt zwischen 8.1 und 8.8<sup>81</sup>. Der hohe basische  $pK_a$  spricht für zusätzliche Stabilisierung der protonierten Sulfhydryl-Gruppe, wodurch der Thiolatanteil praktisch bei null liegt. Dies verhindert im ersten Teilschritt die Rückreaktion zur Ausgangssituation. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt

einer Thiolaustauschreaktion ist die Spaltung des gemischten Disulfids. Daher führt die Stabilisierung der Abgangsgruppe, z.B. durch Wasserstoffbrücken mit dem Thiolat (siehe Kapitel 1.6), zu optimierten Katalyseraten. Der extrem niedrige  $pK_a$  des N-terminalen Cysteins beschreibt diese Situation im thermodynamisch bevorzugten reduzierten Zustand von DsbA. Im Resultat zeigt reduziertes DsbA *in vivo* keine Aktivität gegenüber oxidierten Substraten<sup>107</sup>.

Thioredoxin dient der thermodynamisch gesteuerten Reduktion von Disulfiden in Substraten (Abbildung 1.3- II-B). In beiden Reaktionsschritten der Disulfidaustauschreaktion gehört die Abgangsgruppe jeweils zum Substrat. Über eine spezifische Stabilisierung der Abgangsgruppen durch Thioredoxin oder durch das Substrat selbst, ist bisher wenig bekannt<sup>54</sup>. Das Verständnis dieser Reaktion ist allerdings notwendig um die molekularen Hintergründe der hohen Reduktionsraten von Thioredoxin zu verstehen. Für die Substratreduktion greift zuerst das N-terminale Cystein des CXXC-Motivs die Disulfidbindung im Substrat an. Ein stark stabilisiertes Thiolat wäre äußerst reaktionsträge für nukleophile Angriffe, daher liegt der  $pK_a$  des reaktiven Cysteins bei moderaten 7.1<sup>82</sup> und entspricht damit der unteren Grenze des pH-Wertes des *E. coli* Cytoplasmas, der bei 7.2 bis 7.8 liegt<sup>108</sup>. Damit wird der maximale Anteil an Thiolat mit der höchst möglichen Nukleophilie generiert. Das gemischte Disulfid wird im zweiten Reaktionsschritt durch das C-terminale Cystein gespalten. Im gemischten Disulfid wird dieses Cystein durch Strukturänderungen aktiviert, wodurch der *in silico* berechnete  $pK_a$ -Wert von 8.2 auf 7.4 sinkt<sup>54</sup>, um einen erhöhten Anteil an nukleophilen Thiolat zu erzeugen.

Hiernach liegt für Thioredoxin die Ursache im verminderten  $pK_a$  in der Generierung von reaktiven Thiolat. Für DsbA hingegen scheint der niedrige  $pK_a$  eher die Folge der Stabilisierung des reduzierten Zustands zu sein um dadurch die Rückreaktion zu verhindern.

### Die Geometrie der Disulfidaustauschreaktion

Die maximale Geschwindigkeit der Reaktion kann nur bei optimaler Ausrichtung von der Disulfidbrücke und dem nukleophilen Thiolat erreicht werden. Für Thiolaustauschreaktion bedeutet dies, dass das Nucleophil ( $S_1$ ) entlang der  $S_2$ - $S_3$  Disulfidbindung angreift ( $S_1 \cdots S_2 - S_3$  Winkel  $\approx 180^\circ$ ) und sich die Abgangsgruppe ( $S_3$ ) im selben Winkel von der neu gebildeten Disulfidbindung entfernt<sup>52,80</sup>. Neben der Geometrie der Austauschreaktion entscheidet das HSAB-Prinzip, nach dem Konzept der harten und weichen Säuren bzw. Basen (siehe 1.4), welche Schwefelatome miteinander reagieren. Daher ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit untrennbar mit der optimalen Ausrichtung des Substrates im Enzym-Substrat-Komplex verbunden. Dies wiederum betont die Rolle des *cis*-Prolin Loops im Katalysemechanismus. Für DsbA und Thioredoxin beruht die Substratbindung auf demselben strukturellen Hintergrund. Es ist anzunehmen, dass sich für die Thioredoxin-Superfamilie die optimale Ausrichtung für die Disulfidaustauschreaktion evolutionär etabliert hat.

Es ist stets zu beachten, dass Redoxprozesse bzw. Disulfidaustauschreaktionen dynamische Vorgänge sind. Ermittelte Parameter, wie der  $pK_a$  oder das Redoxpotential stellen Mittelwerte dar, deren Einzelbeiträge sich stark unterscheiden können. Zu jeder Zeit liegen dynamische Unterschiede in der Protein-, der Lösungsmittelstruktur und Substratausrichtung vor. Die katalytisch aktive Struktur könnte sich daher durchaus von den hier beschriebenen Gegebenheiten unterscheiden.

### 1.8. Zielsetzung

Die CXXC-Oxidoreduktasen stellen durch ihr breites Aktivitätsspektrum an Redoxreaktionen die Grundlage für eine Vielzahl an Redoxprozessen *in vivo*. Entgegen ihrer großen Funktionsspanne besitzen diese dabei kaum strukturelle Unterschiede. Dabei ist es noch immer nicht ausreichend verstanden, wie die Proteinstruktur eine derartige Aktivitätsbreite erzeugt. Durch den Transfer der CXXC-Sequenz in ein Protein, das keinen gemeinsamen evolutionären Hintergrund zu den CXXC-Oxidoreduktasen besitzt, können neue Erkenntnisse über die Struktur-Funktionsbeziehung der Oxidoreduktasen erhalten werden. Diese Arbeit hat das Ziel dem artifiziellen Strukturprotein M7 die Funktionalität eines redoxaktiven Proteins zu verleihen. In erster Linie soll durch die Implementierung der *active site* Tetrapeptid-Sequenz Cys<sub>1</sub>-X-X-Cys<sub>2</sub>, aus den Oxidoreduktasen Thioredoxin und DsbA, innerhalb von M7 ein nukleophiles Cystein erzeugt werden, dessen Aktivität mit der Proteinstruktur gekoppelt ist. Dies stellt den ersten Designzyklus zur Generierung von redoxaktiven M7-Varianten dar. Die Wechselwirkung wird primär thermodynamisch betrachtet. Die Thermodynamik der CXXC-Oxidoreduktasen stellt einen entscheidenden Anteil am physikochemischen Hintergrund für die Redoxcharakteristik dieser Enzyme. Hierfür galt es entsprechende Methoden zur Proteinreinigung und der Messung von Proteinstabilität, dem Redoxpotential und der Cystein-pK<sub>a</sub>-Werte zu etablieren. Als Kontrolle dienten unterschiedliche Peptide mit der CXXC-Sequenz, die das Modell für eine strukturunabhängige Aktivität repräsentieren. Die Analyse der Proteinstruktur ist für die Einschätzung der gegenseitigen Beeinflussung von Proteinumgebung und CXXC-Sequenz zwingend notwendig. Hier sollte neben der Sekundärstrukturanalyse, vor allem die NMR-Spektroskopie Aufschluss geben. Die biologisch relevante Größe ist trotzdem die Kinetik, mit der Redoxreaktionen ablaufen. Daher wurden für die Redoxvarianten von M7 die Geschwindigkeitskonstanten der Oxidation und Reduktion mittels kinetischer Messungen bestimmt.

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien

In dieser Arbeit wurden, die in Tabelle 2.1- I aufgeführten, Chemikalien, Lösungen und Medien verwendet. Der vollständige Name der Hersteller und die Vertriebsorte sind im Abkürzungsverzeichnis (Anhang 7.12) hinterlegt. Die Chemikalien und Lösungen besaßen, wenn nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad *pro analysis* (p.a.). Wässrige Lösungen wurden mit Reinstwasser aus der Purelab Plus UV/UF angefertigt. Wenn nicht anders gekennzeichnet, beziehen sich Angaben, wie z.B. 10 % (w/v) auf Lösungen, die in Reinstwasser hergestellt wurden.

**Tabelle 2.1- I: Liste verwendeter Chemikalien**

Chemikalien	Abkürzung	Hersteller
Acetanhydrid		Merck
Aceton		VWR
Acetonitril (HPLC grade)	ACN	Roth
30 % Acrylamid / 0.8 % <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid		Roth
Agar-Agar; Kobe I Pulver	Agar	Roth
Agarose GTQ		Roth
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol	Tris	MP
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	Roth
Ammoniumchlorid; <sup>15</sup> N markiert (98 %)		Sigma
Ammoniumperoxodisulfat	APS	Roth
Ampicillin; Natriumsalz		AppliChem
2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborat	TBTU	Merck
2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat	HBTU	IRIS
Bromphenolblau		Roth
Calciumchlorid (wasserfrei; - Dihydrat)	CaCl <sub>2</sub>	Roth
Chloramphenicol		AppliChem
Citronensäure - Monohydrat	Citrat	Roth
Cobalt(II)-chlorid - Hexahydrat	CoCl <sub>2</sub>	Roth
Coomassie-Brillant-Blau G-250	Coomassie	Roth
L-Cystein	Cystein	Roth
Dichlormethan	DCM	Merck
Diethylether	Ether	Merck
Diisopropylethylamin	DIPEA	Merck
Natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat-d <sub>6</sub> ; deuteriert 98 %	DSS-d <sub>6</sub>	Sigma
Dimethylformamid	DMF	Merck
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth
di-Natriumtetraborat - Decahydrat	Borat	Roth
5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)	DTNB	Sigma
DL-Dithiothreitol; oxidiert	DTT <sub>OX</sub>	Sigma
DL-Dithiothreitol; reduziert	DTT <sub>RED</sub>	MP
DL-Dithiothreitol; reduziert; deuteriert (98 %)		Cortecnet
6x DNA-Ladepuffer		Fisher
DNA-Marker (1 kb)	Marker	Fisher
Eisen(III)-chlorid - Hexahydrat	FeCl <sub>3</sub>	AppliChem
Entwicklerlösung für Autoradiographie		Sigma
Essigsäure (96 %)		VWR
Ethanol; absolut	EtOH	Merck
Ethidiumbromid		AppliChem
Natrium-Ethylendiamintetraacetat	EDTA	Roth
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure	EGTA	Roth
Fixiererlösung für Autoradiographie		Sigma
FMOC-L-Alanin-OH		Merck

Chemikalien	Abkürzung	Hersteller
FMOC-L-Cystein-(Trt)-OH		Merck
FMOC-L-Glutamat-(otBu)-OH		Novabiochem
FMOC-L-Glycin-OH		Merck
FMOC-L-Histidin-(Trt)-OH		Merck
FMOC-L-Leucin-OH		Merck
FMOC-L-Lysin-(Boc)-OH		Novabiochem
FMOC-L-Phenylalanin-OH		Merck
FMOC-L-Prolin-OH		Novabiochem
FMOC-L-Serin-(tBu)-OH		Merck
FMOC-L-Threonin-(tBu)-OH		Merck
FMOC-L-Tyrosin-(tBu)-OH		Merck
FMOC-L-Valin-OH		Merck
Formaldehyd-Lösung (36.5 %)		Sigma
L-Glutathion; oxidiert	GSSG	AppliChem
L-Glutathion; reduziert	GSH	AppliChem
Glycerin (99.8 %)		CVM
L-Glycin	Glycin	Roth
D-Glucose		Roth
D-Glucose; <sup>13</sup> C markiert (99 %)		Spectra
Guanidiniumchlorid; <i>ultra pure</i> (> 99 %)	GdmCl	MP
Guanidiniumthiocyanat (≥ 99 %)	GdmSCN	Merck
Harnstoff		Weigert
Hefeextrakt		Roth
Hippursäure		Sigma
ICP-multi-element standard solution XVI		Merck
Imidazol		Merck
Indium (TraceCERT®)		Sigma
Isopropanol		VWR
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG	Roth
Kaliumchlorid	KCl	VWR
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Kupfersulfat - Pentahydrat	CuSO <sub>4</sub>	Roth
Magnesiumchlorid - Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub>	Roth
Magnesiumsulfat - Heptahydrat	MgSO <sub>4</sub>	Roth
Mangansulfat - Monohydrat	MnSO <sub>4</sub>	Merck
2-Mercaptoethanol		Sigma
Methanol	MeOH	Roth
N-Methylmorpholin	NMM	Merck
Milchpulver		Roth
Natriumacetat	NaAc	Roth
Natriumazid	NaN <sub>3</sub>	Roth
Natriumcarbonat (wasserfrei)		Fluka
Natriumchlorid	NaCl	Roth
Natriumdesoxycholat	NaDOC	Amresco
Natriumdodecylsulfat	SDS	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Natriumhydroxid	NaOH	Roth
Nickel(II)-sulfat - Hexahydrat	NiSO <sub>4</sub>	AppliChem
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; 10 - 250 kDa	Marker	Fisher
Pepton aus Casein		Roth
Phosphorsäure (85 %)		Merck
Piperidin		Merck
Protease Inhibitor Cocktail; EDTA-frei		Roche
Rink Amide AM Resin; 0.69 mmol/g Substitution	Harz	Merck
Salpetersäure (67 %; TraceCERT®)	HNO <sub>3</sub>	Sigma
Salzsäure (37 %)	HCl	Merck

Chemikalien	Abkürzung	Hersteller
Silbernitrat		Roth
Tetracyclin - Hydrochlorid		AppliChem
Thiamin - Hydrochlorid	ThiaminHCl	Duchefa
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin	TEMED	Roth
Trichloressigsäure	TCA	Merck
Triethylsilan	TES	Merck
Trifluoressigsäure	TFA	Merck
Triisopropylsilan	TIS	Merck
Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin - Hydrochlorid	TECP	Merck
Unstained Protein Molecular Weight Marker; 14.4 - 116 kDa	Marker	Fisher
Zinksulfat - Heptahydrat	ZnSO <sub>4</sub>	Roth

## 2.2. Zusammensetzung verwendeter Stoffgemische

**Tabelle 2.2- I: Zusammensetzung verwendeter Stoffgemische**

Substanz / Puffer / Gemische	Zusammensetzung
<b>Agarosegelelektrophorese</b>	
TAE-Puffer	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8.3; RT
Agarosegel	1 % Agarose; 0.2 µg/mL Ethidiumbromid; in TAE-Puffer
<b>Proteinproduktion in <i>E. coli</i></b>	
LB-Medium	5 g/L Hefeextrakt; 5 g/L NaCl; 10 g/L Pepton; in Leitungswasser
LB-Agar	15 g/L Agar; in LB-Medium
SOC-Medium	20 g/L Pepton; 5 g/L Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glucose; in Leitungswasser
<b>Minimalmedium</b>	
M9-Medium	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 24.6 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 mM NaCl; 55 mM NH <sub>4</sub> Cl; 8 g/L Glucose; 0.3 mM ThiaminHCl; 5 mM Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 2 mL Spurenelementmix (pro Liter M9-Medium); pH 7.0; RT
Spurenelementmix	60 mM EDTA; 62 mM FeCl <sub>3</sub> ; 5 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0.9 mM CoCl <sub>2</sub> ; 0.6 mM ZnSO <sub>4</sub> ; 0.4 mM CuSO <sub>4</sub> ; 0.7 mM MnSO <sub>4</sub>
Glucose-Stock	40 % Glucose
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Stock	1 M Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Thiaminsulfat-Stock	0.6 M ThiaminHCl
<b>Antibiotika</b>	
Ampicillin	100 mg/mL in H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	34 mg/mL in Ethanol (vergällt)
Tetracyclin	12.5 mg/mL in Ethanol (vergällt)
<b>Proteinreinigung</b>	
Zellaufschlusspuffer	25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 150 mM NaCl; pH 7.5; RT
Dialysepuffer Nukleinsäurehydrolyse	25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 150 mM NaCl; pH 7.5; RT
<b>IMAC Puffer</b>	
Laufpuffer IMAC	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 7.5; RT
Elutionspuffer IMAC	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH 7.5; RT
Stripping Puffer IMAC	50 mM Tris; 500 mM NaCl; 50 mM EDTA; pH 7.4
Beladungspuffer	100 mM NiSO <sub>4</sub>
Imidazol-Stock	3 M Imidazol; pH 7.5; RT
Dialysepuffer Thrombinspaltung	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 150 mM NaCl; pH 7.5; RT
EDTA-Dialysepuffer	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; pH 7.5; RT
Laufpuffer SEC	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 150 mM NaCl; pH 7.0; 20 °C

<b>Substanz / Puffer / Gemische</b>	<b>Zusammensetzung</b>
NMR-Messpuffer	25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0.05 % Natriumazid pH 7.0; 20 °C
PBS-Puffer	8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 1.2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7.4; RT
<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>	
4x Sammelgel-Puffer	0.5 M Tris; 0.8 % SDS; pH 6.8; RT
4x Trenngel-Puffer	1.5 M Tris; 0.8 % SDS; pH 8.8; RT
Denaturierungspuffer	2.7 M GdmSCN; 50 mM Tris; pH 7.0; 20 °C
5x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris; 5 % SDS; 50 % Glycerin; 0.0065 % Bromphenolblau; pH 8.0; (ggf. 0.5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol zur Reduktion)
5x SDS-PAGE Laufpuffer	125 mM Tris; 1.25 M Glycin; 17.5 mM SDS; pH 8.3
Sammelgel; 6 %; für 3 Gele	1.2 mL 30 % Acrylamid / 0.8 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 1.5 mL 4x Sammelgel-Puffer; 3.3 mL H <sub>2</sub> O; 6 µL TEMED; 40 µL 20 % APS
Trenngel; 18 %; für 3 Gele	6 mL 30 % Acrylamid / 0.8 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 2.5 mL 4x Trenngel-Puffer; 1.5 mL H <sub>2</sub> O; 8 µL TEMED; 60 µL 20 % APS
<b>Fairbanks-Färbelösung</b>	
Lösung A	25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0.05 % Coomassie-Brillant-Blau G-250
Lösung B	10 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0.005 % Coomassie-Brillant-Blau G-250
Lösung C	10 % (v/v) Essigsäure; 0.002 % Coomassie-Brillant-Blau G-250
Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure
<b>Western-Blot</b>	
Western-Blot Transferpuffer	20 mM Tris; 150 mM Glycin; 0.02 % SDS; 20 % (v/v) Methanol
TBS-Puffer	20 mM Tris; 140 mM NaCl; pH 7.6
Blockierungspuffer	3 % Milchpulver; in TBS-Puffer
<b>Redoxpotentialmessung</b>	
PBS-Puffer	8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 1.2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7.0; 20 bzw. 30 °C; entgast
EDTA-Stock	500 mM EDTA; pH 7.0; RT
GSH-Stock	500 mM GSH; ≈ 560 mM NaOH; pH 7.0; RT; in PBS; entgast
GSSG-Stock	50 mM GSSG; ≈ 110 mM NaOH; pH 7.0; RT; in PBS; entgast
DTT <sub>OX</sub> - bzw. DTT <sub>RED</sub> -Stock	150 mM DTT; pH 7.0; RT; in PBS; entgast
HCl-Stock	200 mM HCl; 20 bzw. 30 °C; in Wasser
<b>Konzentrationsbestimmung per Fluoreszenz-Spektroskopie</b>	
Phosphat-Puffer	25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7.0; RT; entgast
GdmSCN-Stock	5.8 M GdmSCN; 50 mM Tris; pH 7.0; 20 °C
TCEP-Stock	0.1 M TCEP; 50 mM Tris; ≈ 275 mM NaOH; 2.7 M GdmSCN; pH 7.0; 20 °C
EDTA-Stock	500 mM EDTA; NaOH (Molar nicht definiert); pH 7.0; RT
<b>Denaturierungsübergang und Reversibilität per Fluoreszenz-Spektroskopie</b>	
Tris-Puffer	50 mM Tris; pH 7.0; 20 bzw. 30 °C; entgast
GdmSCN-Stock	5.8 M GdmSCN; 50 mM Tris; pH 7.0; 20 bzw. 30 °C
GdmCl-Stock	8.6 M GdmCl; 50 mM Tris; pH 7.0; 20 °C
TCEP-Stock	0.2 M TCEP; 50 mM Tris; ≈ 600 mM NaOH; pH 7.0; 20 bzw. 30 °C
TCEP-Ersatz-Stock	50 mM Tris; 550 mM NaCl; pH 7.0; 20 bzw. 30 °C
EDTA-Stock	500 mM EDTA; pH 7.0; RT
<b>Denaturierungsübergang und Sekundärstrukturbestimmung per Circular dichroismus-Spektroskopie</b>	
Phosphat-Puffer (für Proteine)	25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7.0; RT; entgast
Phosphat-Puffer (für Peptide)	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7.0; RT; entgast
GdmCl-Stock	8.6 M GdmCl; 50 mM Tris; pH 7.0; 20 °C
TCEP-Stock	0.2 M TCEP; 50 mM Tris; ≈ 600 mM NaOH; pH 7.0; 20 °C

Substanz / Puffer / Gemische	Zusammensetzung
EDTA-Stock	500 mM EDTA; pH 7.0; RT
<b>pK<sub>a</sub>-Bestimmung per Stopped-Flow-Absorptions-Spektroskopie</b>	
Natriumchlorid-Lösung	200 mM NaCl; ungepuffert; entgast
DTNB-Stock	2 mM DTNB; 50 mM NaAc; pH 7.0; 20 °C; entgast
Komplexpuffer	10 mM Borat; 10 mM Citrat; 10 mM Phosphat; 200 mM NaCl; pH variabel; 20 °C; entgast

### 2.3. Verwendete Enzyme, Enzymzusätze, Antikörper und Kits

Tabelle 2.3- I: Verwendete Enzyme, Enzymzusätze, Antikörper und Kits

Enzym / -zusatz / Antikörper / Kits	Spezifikation	Hersteller
<b>Enzym</b>		
BamHI	20 000 U/mL	NEB
Benzonase®	250 U/μL	Merck
Dpn1	10 U/μL	Fisher
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	1 U/μL	Thermo
Lysozym	30 kU/mg	Merck
NdeI	20 000 U/mL	NEB
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	5 U/μL	Fisher
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	2.5 U/μL	Fisher
Thrombin	50 U/mg	Merck
<b>Enzymzusätze</b>		
Chemolumineszenz-Detektion-Reagenz		GE
dNTP-Mix	10 mM	Fisher
Magnesiumchlorid	25 mM	Fisher
Magnesiumsulfat	25 mM	Fisher
<i>Pfu</i> -Puffer	10x	Fisher
<i>Taq</i> -Puffer	10x	Fisher
<b>Antikörper</b>		
primär Anti-His	Ursprung: Maus	Qiagen
sekundär anti-Maus IgG-HRP	Ursprung: Ziege	Santa Cruz
<b>Kits</b>		
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit		Peqlab
peqGOLD™ Gel Extraction Kit		Peqlab

### 2.4. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 2.4- I: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	DNA Methylierung	Resistenz	Hersteller
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup> ΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]	methyliert	Tetracyclin	Agilent
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) plysS	F' <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pLysSpRARE(CAM <sup>R</sup> )	nicht methyliert	Chloramphenicol	Merck

**Tabelle 2.4- II: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Expressionssystem	Sonstiges	Resistenz	Hersteller
pPCRScrip-M7	/	/	Ampicillin	Thermo
pET-15b (Sequenz, siehe Anhang 7.2)	T7	N-terminaler His <sub>6</sub> -tag; Thrombin- schnittstelle	Ampicillin	Merck

## 2.5. Geräte und Zubehör

**Tabelle 2.5- I: Liste der verwendeten Geräte und Zubehör**

Geräte / Zubehör	Hersteller
<b>Chromatographie</b>	
ÄKTAexplorer™ / ÄKTApurifier™	GE
Fraction Collector Frac-900 / 950	GE
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75; präparativ; 120 mL CV	GE
Superdex™ 75; analytisch; 24 mL CV	GE
HisTrap™ HP; FF; 1 mL und 5 mL CV	GE
Superloop™: 10 mL; 50 mL	GE
Probenschleife: 250 µL; 500 µL; 1 mL	
Software: Unicorn™ Control 3.0	GE
<b>Gelelektrophorese</b>	
Spannungsquelle: EPS 200 / 600	GE
Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel (horizontal)	GE
Mighty Small II SE250/260 (22ertical)	GE
Software: AIDA Image Analyzer 2.0 beta	Raytest
UV-Belichter Gel iX20 Imager	Intas
Amersham ECLTM TE 77 Semi-Dry Transfer Unit	GE
Autoradiographie-Kassette	GE
Chemolumineszenz-Film Amersham Hyperfilm ECLTM	GE
Nitrozellulose Transfermembran Whatman® Protran®	Whatman
<b>HPLC-System</b>	
Jupiter 300; 5 micron; C4; 300 Å; 250 · 4 mm; 60 mm	Phenomenex
LiChrospher® 100 RP-18; 5 micron; Hibar® RT 250-4	Merck
Chromolith® Prep RP-18e; 3 micron; 100 · 25 mm	Merck
Vorsäulen SecurityGuard™	Phenomenex
HPLC-Pumpe P580 und UV/Vis-Detektor UVD 340S	Thermo
Software: Chromeleon 4.23	Thermo
HPLC Dionex™ UltiMate™ 3000	Thermo
Software: Chromeleon 7.1	Thermo
BetaBasic C4; 3 micron; 150 Å; 50 · 1 mm	Thermo
BetaBasic C18; 3 micron; 150 Å; 100 · 2.1 mm	Thermo
Agilent 1200 Cap	Agilent
Software: Xcalibur™ 3.0	Thermo
<b>Molekularbiologische Methoden</b>	
Mastercycler® Gradient (PCR Thermocycler)	Eppendorf
Elektroporationsküvetten (2 mm)	Peqlab
Gene Pulser® II (Elektroporatin)	Bio-Rad
Inkubator SM-30	Bühler
Inkubator BS-T	Braun
<b>Spektroskopie</b>	
<b>Absorption-Spektroskopie</b>	

Geräte / Zubehör	Hersteller
Ultrospec™ 4000 UV/Visible Spectrophotometer	GE
Software: SWIFT II-METHOD	GE
Küvette: Semi-Mikro; 114-QS; 10 mm	Hellma
Küvette: Plastibrand PMMA; 2.5 mL makro	Brand
NanoPhotometer™	Implen
Küvette: UV/Vis-Submikroliter-Zelle	Implen
<b>Circulardichroismus-Spektroskopie</b>	
Jasco J-810 mit Peltierelement PTC-423S	Jasco
Software: SpectraManager 1.53.01	Jasco
Küvette: 106-QS; 0.1 mm; 0.2 mm; 0.5 mm	Hellma
Küvette: 110-QS; 1 mm; 2 mm	Hellma
<b>Fluoreszenz-Spektroskopie</b>	
Spektralfluorimeter FluoroMax®-4	Horiba
Küvette: 119.004F-QS; 10 mm; rührbar	Hellma
Küvette: Ultra-Mikro; 105.250-QS; 10 mm	Hellma
Software: FluorEssence™ 3.5	Horiba
<b>NMR-Spektroskopie</b>	
NMR-Spektrometer AvanceIII 600 MHz und 800 MHz	Bruker
Software: NMRPipe; NMRView; Talos+; CSI3.0	
<b>Stopped-Flow-Absorptions-Spektroskopie</b>	
SX-20 Stopped-Flow Spectrometer	Applied Photophysics
Software: Pro-Data SX 2.0.3	Applied Photophysics
Hamilton Spritzen: 250 µL; 2.5 mL	Hamilton
NESLAB RTE-7 (Temperiereinheit)	Thermo
<b>Atomspektroskopie</b>	
ESI-sampler SC-2	Elemental Scientific
X-Series II ICP-MS	Thermo
<b>Zentrifugation</b>	
Analytische Ultrazentrifuge ProteomeLab™ XL-I	Beckman
AUZ Messzellen Doppelsektorzellen	Beckman
AUZ Rotor An-50 Ti	Beckman
Software: Sedfit	NHI
Avanti™ J-20; J-25; J-30 I	Beckman
Zentrifugationsbecher	Beckman
Rotor JA-20; JA-20.50; JA-30.50 Ti; JLA-16.250	Beckman
TLA-100.3 Rotor (100 000 rpm, 541 000 x g)	Beckman
SpeedVac RC10.10 mit Kühlfalle RCT 60	Jouan
Biofuge fresco / pico	Heraeus
Amicon® Ultra Centrifugal Filters; 4 mL; 3 MWCO	Merck
<b>Sonstige Geräte / Zubehör</b>	
Dialyseschläuche (3.5 kDa MWCO; 18 und 45 mm)	Spectrum Laboratories Inc
Dialyseschlauchklammern	Spectrum Laboratories Inc
Duran® Filtriergerät	Duran
Drehschieberpumpe	Vacuubrand
Einwegpipetten	TPP
Einwegspritzen - Luer Lock (2.5; 5; 10; 25; 50 mL)	Terumo
Erlenmeyer-Kolben (25; 50; 200; 500 mL)	Brand
Eppendorf Research® Kolbenhubpipettensatz	Eppendorf
Exsikkator	Duran
Falcon-Röhrchen	TPP
Feinanalysenwaage KB BA 100	Sartorius
Filternutschen (4; 50 mL); Porosität 1-5	Duran
Glasflaschen (25; 50; 250; 500; 1 000; 2 000 mL)	Duran
Glucose Teststäbchen	M & N
Haake K20	Thermo
Kryoröhrchen (1.8 mL)	Sarstedt

<b>Geräte / Zubehör</b>	<b>Hersteller</b>
Luer Lock Spritzen (1; 3; 10 mL)	Becton
Magnetrührer MR Hei-End & PT 1000	Heidolph
Massenspektrometer LTQ-Orbitrap XL	Thermo
Massenspektrometrie Agilent 1200 Cap	Agilent
Messbecher (100; 500; 1 000; 2 000; 5 000 mL)	Brand
Messzylinder (100; 500; 1 000; 2 000; 5 000 mL)	Brand
Micron Lab 40 (Hochdruckhomogenisator)	APV
Pasteurpipetten	Hirschmann
Peptidsynthesizer 433A	Applied Biosystems
pH-Elektrode SenTixR 81	WTW
pH-Elektrode InLab Micro	Mettler-Toledo
pH-Indikatorstäbchen (pH 0 - 14)	Merck
pH-Meter pH526	WTW
Pipettenspitzen (10; 200; 1 000; 5 000 µL)	Eppendorf
Pumpe P1	GE
Purelab Plus UV/UF	USF
Refraktometer	Carl Zeiss
Reaktionsgefäße (500; 1 500; 2 000 µL)	Eppendorf
Reaktionsgefäße PCR 200 µL	Roth
Rundfiltermembran (0.4 µm)	Merck
Rundkolben (50 mL; 200 mL)	Duran
Schikanekolben (1 000; 5 000 mL)	Technische Glaswerke
Spritzenfilter (0.22 µm und 0.45 µm)	TPP
Spritzenkanülen	Braun
Taumler Polymax 1 040	Heidolph
Thermomixer <i>compact / comfort</i>	Eppendorf AG
Varioklav® 500E	H + P Labortechnik
Vortex-Genie 2™	Scientific Industries
Waage; Typ BP 2100S / 4100S	Sartorius
Zellkulturschalen	TPP
<b>Sonstige Software</b>	
PrimerX	Bioinformatics Org.
Pymol v0.99	Schrödinger
SerialCloner 2.5	Serial Basics
Sigma Plot 11.0	Systat Software Inc.
Microsoft Office 2010	Microsoft

### 3. Methoden

Im Folgenden werden die Rahmenbedingungen, der in dieser Arbeit verwendeten Methoden, aufgeführt. Verwendete Lösungen und Geräte werden nicht immer explizit genannt, da diese in Kapitel 2 bereits gelistet sind. Insofern nicht anders angegeben, wurden bei allen Methoden autoklavierte oder filtrierte ( $\leq 0.45 \mu\text{m}$  Filter) Lösungen verwendet. Desweiteren sind Medien und Kulturplatten mit dem bakterienstamm spezifischen Antibiotika (Tabelle 2.4- I und Tabelle 2.4- II) versehen, ohne dass dies erneut genannt wird. Zum Teil werden kleinere Variationen vom experimentellen Aufbau im Methodenteil nicht separat abgehandelt (z.B. Untersuchung der Salzabhängigkeit des Redoxpotentials 4.3.2). Ist dies der Fall, so werden im Kapitel 4 (Ergebnisse) Unterschiede im Versuchsaufbau benannt.

#### 3.1. Molekularbiologische Methoden

Das ursprüngliche Plasmid mit dem M7-Wildtyp (pPCRScrip-M7) wurde von der AG Pfeifer (ehemalig MLU) zur Verfügung gestellt. Das M7-Wildtyp Gen wurde zunächst in den pET15b Vektor kloniert (siehe 3.1.1) um eine N-terminale His-*tag*-Fusion am Zielprotein zu erhalten. Ausgehend vom M7-pET15b-Konstrukt wurden mehrere Varianten (siehe 4.1) über Mutagenese (siehe 3.1.2) erzeugt, die die Grundlagen für die biophysikalische Charakterisierung stellen.

Varianten M7<sub>Di23-26</sub> und die Einzelcysteinmutanten von M7<sub>Di26</sub> wurden durch W. Hannemann (2013)<sup>109</sup> und (2017)<sup>110</sup> kloniert. F. Nicolaus (2015)<sup>111</sup> generierte Variante M7<sub>Ti26</sub>.

##### 3.1.1. Restriktionsverdau und Ligation

Sowohl das M7-Wildtyp Plasmid (pPCRScrip-M7) als auch der Zielvektor pET15b wurden im Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI geschnitten (37 °C; 30 min). Eingesetzt wurden 1  $\mu\text{g}$  Plasmid bzw. Vektor mit je 5 Units Restriktionsenzym in einem 40  $\mu\text{L}$  Ansatz (nach Herstellerangaben). Der geschnittene pET15b Vektor wurde zusätzlich direkt im Restriktionsansatz durch die Alkalische Phosphatase dephosphoryliert (3 Units im 40  $\mu\text{L}$  Ansatz). Die Alkalische Phosphatase wurde nach der Inkubation inaktiviert (80 °C; 5 min) und die Ansätze abschließend über Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose; 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ethidiumbromid; 100 V für 45 min) aufgetrennt. Die Restriktionsprodukte konnten per Gel-Extraktion isoliert (peqGOLD Gel Extraction Kit) und die Konzentration per Nano-Spektrophotometer (Absorption  $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) bestimmt werden.

In der Ligation wurden der geschnittene dephosphoryliert pET15b Vektor (20 ng) zusammen mit dem geschnittenen M7-Zielgen (*insert*) über Nacht inkubiert (4 °C). Hier wurden 40 Units Ligase im 10  $\mu\text{L}$  Ansatz bei verschiedene Verhältnisse zwischen *insert* zu Vektor eingesetzt: **i)** 3:1; **ii)** 7:1; **iii)** 21:1. Nach der Ligation wurde der Ansatz in den Klonierungsstamm *E. coli* XL1-Blue transformiert (siehe 3.1.5). Positive Klone wurden über Kolonie-PCR (siehe 3.1.3) identifiziert. Deren M7-pET15b Plasmid wurde mittels GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit nach Herstellerangaben isoliert und die Konzentration per Nano-Spektrophotometer (Absorption  $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) bestimmt. Die positiven Klone der Kolonie-PCR mussten über Sequenzierung (Eurofins) bestätigt werden. Das M7-pET15b Plasmid war der Ausgangspunkt für die Mutagenese mittels Polymerase-Kettenreaktion (siehe 3.1.2.).

### 3.1.2. Mutagenese per Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Substitution und Insertion von DNA-Sequenzen wurde modifiziert nach der QuikChange-Methode von Agilent eingefügt. Hier werden über DNA-Primer die Mutationen in das Zielgen oder den Vektor eingebaut. Der Aufbau eines Primers der Länge  $N$  erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 81.5 + 0.41 \cdot (\%GC) - \left(\frac{675}{N}\right) - \%mismatch \quad 3-1$$

Hierbei ist  $T_m$  die Schmelztemperatur des Primers, die bei  $\geq 78$  °C liegen sollte. %GC ist der Gehalt an den Nukleinbasen Guanin und Cytosin des Primers und %mismatch gibt den Anteil an nicht-paarenden Nukleotiden zwischen Primer und Zielsequenz wieder. Die vollständige DNA Sequenz vom M7(wt) (Anhang 7.2) und die Aminosäure Sequenzen der verwendeten Varianten sind im Anhang (Anhang 7.3) hinterlegt. Die erzeugten Primer waren bis zu 76 Nukleotide lang. Tabelle 3.1.1- I zeigt den prinzipiellen Ansatz für die Mutagenese. Das Protokoll für die PCR ist in Tabelle 3.1.1- II aufgeführt.

**Tabelle 3.1.1- I: Ansatz PCR-Mutagenese**

Stock	Konzentration im PCR-Ansatz
MgSO <sub>4</sub>	3 mM
dNTPs	0.2 mM
Primer	100 ng
5x Reaktionspuffer	1x
Template / Plasmid	10 - 50 ng
<i>Pfu</i> -Polymerase	5 U
Wasser	restliche Volumen auf 50 µL

**Tabelle 3.1.1- II: Ablauf PCR-Mutagenese**

Anzahl	Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1	initiale Denaturierung	95	2
2 - 18	Denaturierung	95	0.5
	Hybridisierung	55	1
	Elongation	72	12
19	finale Elongation	72	10

Die Template DNA im Mutagenese-Ansatz wurde im Anschluss an die PCR durch DpnI hydrolysiert (15 U DpnI pro 50 µL Ansatz; 1 h; 37 °C). DpnI wurde daraufhin im Ansatz inaktiviert (80 °C; 20 min). Der Ansatz wurde abschließend über Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose; 0.2 µg/mL Ethidiumbromid; 100 V für 45 min) aufgetrennt. Das Mutageneseprodukt wurde per Gel-Extraktion isoliert (peqGOLD Gel Extraction Kit) und die Konzentration per Nano-Spektrophotometer (Absorption  $\lambda = 260$  nm) bestimmt. Das erhaltene Plasmid wurde in den Klonierungsstamm *E. coli* XL1-Blue transformiert (siehe 3.1.5). Positive Klone wurden über Kolonie-PCR (siehe 3.1.3) identifiziert, deren Plasmid mittels GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit nach Herstellerangaben isoliert und die Konzentration per Nano-Spektrophotometer (Absorption  $\lambda = 260$  nm) bestimmt. Die positiven Klone der Kolonie-PCR mussten über Sequenzierung (Eurofins) bestätigt werden. Die Plasmide wurden abschließend bei -20 °C gelagert.

### 3.1.3. Kolonie-PCR

Vor der Sequenzierung (Eurofins) einzelner Kolonien wurde der Erfolg von Ligation und Mutagenese zuerst per Kolonie-PCR überprüft. 10 bis 20 Einzelkolonien aus einer Transformation wurden jeweils

in 50  $\mu\text{L}$  Wasser suspendiert. Es folgte Einfrieren bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  (20 min) und anschließendes Erhitzen auf  $95\text{ }^\circ\text{C}$  (5 min). Aus dieser Lösung wurde 1  $\mu\text{L}$  als Template in einem PCR Ansatz (Tabelle 3.1.1- I) mit T7-Primern und *taq*-Polymerase eingesetzt (hier:  $\text{MgCl}_2$  anstelle von  $\text{MgSO}_4$ ). Der PCR-Ablauf ist gleich dem in Tabelle 3.1.1- II mit dem Unterschied, dass die Hybridsierung bei  $60\text{ }^\circ\text{C}$  (1 min) und die Elongation bei  $68\text{ }^\circ\text{C}$  (1.5 min) stattfanden. Klone mit der gewünschten Insertion wurden über Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose; 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ethidiumbromid; 100 V für 45 min) identifiziert.

### 3.1.4. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Elektrokompetente Zellen werden für die Transformation mittels Elektroporation (siehe 3.1.5) benötigt. Die *E. coli* Zellen werden hierfür in einer Vorkultur (5 - 15 mL) in LB Medium mit entsprechendem Antibiotika über Nacht ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ; 200 rpm) inkubiert. Aus der Vorkultur ( $\text{OD}_{600} \approx 3 - 4$ ) wird die Hauptkultur (200 mL) mit einer  $\text{OD}_{600} \approx 0.02$  inokuliert und inkubiert ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ; 200 rpm). Bei Erreichen einer  $\text{OD}_{600} \approx 0.3 - 0.4$  wird die Hauptkultur samt Kolben auf Eis bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  im Kühlraum für 30 min gelagert. Hiernach wird die Hauptkultur zentrifugiert (15 min; 3 800 x g;  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) und der Überstand verworfen. Es folgen 3 Waschschriffe (**1 - 3**) für die Zellen mit 10 % (w/v) Glycerin Lösung ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) um eine möglichst hohe Zelldichte ohne Mediumsrückstände zu erhalten. Ein einzelner Waschschriff beinhaltet die Suspension der Zellpellets in der Glycerin-Lösung und die anschließende Zentrifugation (10 min; 3 800 x g;  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wird stets verworfen. Es wurde mit folgenden Volumen Glycerin-Lösung gewaschen: **1.** 200 mL; **2.** 100 mL; **3.** 20 mL. Abschließend wird das Zellpellet in 200  $\mu\text{L}$  10 % (w/v) Glycerin gelöst und zu 40  $\mu\text{L}$  aliquotiert, in flüssigen  $\text{N}_2$  eingefroren und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Aus 200 mL Hauptkultur erhält man ca. 10 - 15 Aliquotes.

### 3.1.5. Transformation per Elektroporation

Für die Transformation des Zielplasmids in einen entsprechend elektrokompetent *E. coli* Stamm wird ein Aliquote (40  $\mu\text{L}$ ) der elektrokompetenten Zellen (siehe 3.1.4) mit 0.5 - 1.0  $\mu\text{L}$  Plasmid ( $\approx 60 - 100\text{ ng}/\mu\text{L}$ ) versetzt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wird bei einer Spannung von 1.8 kV (Elektrodenabstand 2 mm), 200  $\Omega$  Widerstand und einer Kapazität von 25  $\mu\text{F}$  in der Elektroporationseinheit durchgeführt. Im Anschluss werden die transformierten Zellen sofort in 1 mL SOC-Medium ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ) aufgenommen und 45 min inkubiert ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ; 600 rpm). 20 und 200  $\mu\text{L}$  wurden jeweils auf Agarplatten über Nacht inkubiert ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ). Resultierende Einzelkolonien wurden z.B. in der rekombinanten Proteinproduktion (siehe 3.2.3) eingesetzt.

## 3.2. Proteinpräparation

### 3.2.1. *E. coli* Anpassung an M9-Minimalmedium

Die Isotopen-Markierung von Proteinen für die NMR-Spektroskopie bedarf der rekombinanten Proteinsynthese in Minimalmedium. Dafür ist es nötig die Zellen auf das Wachstum im Minimalmedium zu adaptieren. Dies geschieht in einer stufenweisen Absenkung von Vollmedium (LB-Medium) hin zu reinem Minimalmedium (M9-Medium; Tabelle 2.2- I). Die Anpassung fand im *E. coli* Stamm Rosetta (DE3) pLysS. Alle Kulturen in dieser Methode wurden in 20 mL Schüttelkolben angelegt ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ; 200 rpm) und in 1:100 Verdünnung in die nachfolgende Kultur passagiert. Einzelkolonien aus der Transformation (siehe 3.1.5) wurden in LB-Medium passagiert und für 8 h

inkubiert. Daraufhin erfolgte die Anpassung an M9-Medium. Hierfür wurden die Zellen zuerst in LB-Medium mit 50 % M9-Anteil über Nacht inkubiert (Nachtkultur). Es folgte für jeden Anpassungsschritt die Passage in Medium mit dem gleichen prozentualen Anteil M9 und die Inkubation bis zur  $OD_{600} \approx 1 - 2$  am Tag (Tagkultur), woraufhin die Passage in die nächsthöhere M9-Konzentration erfolgte (Nachtkultur). Die prozentualen Anteile vom M9 Medium wurden schrittweise von 0 auf 50, 90, 95, 98, 99, 99.5 bis 100 % erhöht. Vollständig an Minimalmedium adaptierte Zellen wurden kryokonserviert (siehe 3.2.2) und die Sequenz (Eurofins) geprüft.

### 3.2.2. Kryokonservierung von Zellen

An M9-Minimalmedium angepasst Zellen (siehe 3.2.1) wurden zur Lagerung kryokonserviert. Hierfür wurde eine 10 mL-Vorkultur der Zellen in M9-Medium bis zu einer  $OD_{600} \approx 2 - 3$  inkubiert (37 °C; 200 rpm). Hieraus wurde die Hauptkultur (100 mL) 1:100 inokuliert und bis zur  $OD_{600} \approx 2 - 3$  inkubiert (37 °C; 200 rpm). Die Kultur wurde zentrifugiert und das Zellpellet in 10 mL 30 % (w/v) Glycerin-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert (á 1 mL), in flüssigen  $N_2$  eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.3. Rekombinante Proteinproduktion

Die rekombinante Herstellung der Zielproteine erfolgte im *E. coli* Expressionsstamm Rosetta (DE3) pLysS. Wie unter 3.1.5 beschrieben, wurden Einzelkolonien nach Elektroporation erzeugt. Mit einer Einzelkolonie bzw. aus einer Kryokultur (siehe 3.2.2) wurde eine 10 mL-Vorkultur (LB- bzw. M9-Minimalmedium) inokuliert und über Nacht inkubiert (37 °C; 200 rpm). Die Vorkultur wurde zur Inokulation (1:100) einer 200 mL-Kultur genutzt. Diese wurde bis zu einer  $OD_{600} \approx 0.5$  inkubiert (37 °C; 200 rpm). Aus der 200 mL-Kultur wurde die 1 L-Hauptkultur inokuliert ( $OD_{600} \approx 0.02$ ) und bis zur  $OD_{600} \approx 1$  (LB-Medium) bzw.  $\approx 1.5$  (M9-Medium) inkubiert (37 °C; 90 rpm). Die Proteinproduktion in der Hauptkultur in LB- bzw. M9-Minimalmedium werden im Folgenden gesondert betrachtet. **A)** Im Falle einer LB-Kultur wurde bei einer  $OD_{600} \approx 1$  mit 1 mM IPTG die Proteinproduktion induziert und für 4 h (37 °C; 90 rpm) oder über Nacht (20 °C; 90 rpm) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (20 min; 4 °C; 4 000 x g). Das Zellpellet mit dem Zielprotein wurde in flüssigen  $N_2$  eingefroren und bei -80 °C gelagert. **B)** Das Ziel der rekombinanten Proteinproduktion in Minimalmedium ist die Proteinmarkierung durch  $^{15}N$ - und  $^{13}C$ -Isotopen. Um kostengünstig zu produzieren durfte die rekombinante Proteinproduktion nur mit einem Minimum an  $^{13}C$ -Glucose (6 g/L) durchgeführt werden. Daher wurde nach Erreichen von  $OD_{600} \approx 1.5$  der Hauptkultur ein Mediumswechsel von nicht-markierten in markiertes Medium durchgeführt. Hierfür wurde der gesamte Ansatz zentrifugiert (15 min; 4 °C; 4 000 x g), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 L markierten M9-Medium (37 °C) gelöst und inkubiert (37 °C; 90 rpm). Nach 10 min Inkubation wurde die Proteinproduktion mit 1 mM IPTG induziert. Die Inkubation (37 °C; 90 rpm) lief über  $\approx 5$  h bis zum weitgehendsten Verbrauch der  $^{13}C$ -Glucose (< 0.5 g/L). Die Glucose Konzentration wurde über Glucose Teststreifen (Glucoseoxidase-Peroxidase-Chromogen Reaktion) ermittelt. Der pH der Kultur, über pH-Indikatorstreifen geprüft, wurde durch manuelle Zugabe von 1 M NaOH während der Inkubation zwischen pH 6.5 - 7.5 gehalten. Am Ende der Inkubation ( $^{13}C$ -Glucose < 0.5 g/L) erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (20 min; 4 °C; 4 000 x g). Das Zellpellet mit dem Zielprotein wurde in flüssigen  $N_2$  eingefroren und bei -80 °C bis zur Proteinpräparation (siehe folgende Kapitel) gelagert.

### 3.2.4. Zellaufschluss

Biomasse (BFM) aus der rekombinanten Proteinsynthese (siehe 3.2.3) wurde zügig bei RT aufgetaut und im Aufschlusspuffer (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl; pH 7.5; RT) mittels 5 mL-Pipette suspendiert. Dem Ansatz wurde eine halbe Proteaseinhibitortablette pro 20 g BFM hinzugefügt. Die Zellyse wurde mit der Abfolge von **i)** Lysozym-Inkubation (1.5 mg pro 1 g BFM; 30 min; 10 rpm; RT) und **ii)** Hochdruckdispersion erreicht. Bei der Hochdruckdispersion wurden vier Passagen bei  $\approx$  1 000 bar und 10 °C durchlaufen. Anschließend wurde der Ansatz 1 zu 1 in Aufschlusspuffer verdünnt und zentrifugiert (75 000 x g; 20 °C; 45 min). Das Pellet konnte verworfen werden. Der Überstand wurde für 20 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei anfallenden Hitzepräzipitate wurden pelletiert (75 000 x g; 20 °C; 45 min), das Pellet anschließend verworfen und im Überstand die Nukleinsäuren durch Benzonase hydrolysiert (350 U pro 40 mL Überstand; 2 h; 10 rpm; RT). Dafür musste der Ansatz mit 2 mM MgCl<sub>2</sub> supplementiert und der pH auf 7.5 bis 8.0 mit NaOH justiert werden. Gegebenenfalls kann die Nukleinsäurespaltung in einer 2 L-Dialyse (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 150 mM NaCl; pH 7.5; RT) über Nacht (RT) durchgeführt werden. Dialyseschläuche wurden nach Herstellerangaben vorbereitet.

### 3.2.5. Proteinreinigung über chromatografische Methoden

Der Nukleinsäurespaltung (siehe 3.2.4) schlossen sich die chromatografischen Reinigungsstufen an, beginnend mit der IMAC um das Zielprotein auf Grund seines N-terminalen Hexahistidin-*tags* zu isolieren und zu konzentrieren. Hierfür wurde der Ansatz zusätzlich mit 20 mM Imidazol und 150 mM NaCl versetzt und über einen 0.45  $\mu$ m-Spritzenfilter filtriert. Zur präparativen Reinigung bei 20 °C wurde eine 5 mL (CV) HisTrap verwendet, die in Laufpuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 7.5; RT) äquilibriert war. Das Beladen der Säule mit dem Ansatz fand bei 2 mL/min statt. Die Säule wurde hiernach mit 30 CV Laufpuffer (5 mL/min) gewaschen. Die Elution mit Elutionspuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH 7.5; RT) erfolgte stufenweise in drei Abschnitten von **i)** 9 % ( $\triangleq$  63 mM Imidazol), isokratisch über 20 CV; **ii)** 65 % ( $\triangleq$  330 mM Imidazol) isokratisch über 6 CV; **iii)** 100 % ( $\triangleq$  500 mM Imidazol) isokratisch über 6 CV. Der Fluss betrug bei der Elution 3 mL/min. Detektiert wurde das Zielprotein über die Absorption bei 280 nm. Um den His-*tag* zu entfernen wurde die Wertfraktion (6 - 12 mL) mit 25 Units Thrombin pro 1 AU Absorption im Äkta-Detektor (280 nm; 0.2 cm Flusszelle) versetzt. Die His-*tag*-Abspaltung wurde in der Dialyse gegen dreimal 1.5 L Aufschlusspuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl; pH 7.5; RT) für je 8 h durchgeführt. Nach der Dialyse erfolgte die zweite IMAC um nicht gespaltenes Protein abzutrennen. Die Puffer der 2. IMAC entsprach der 1. IMAC. Der Ansatz wurde mit 40 mM Imidazol versetzt und 30 min zentrifugiert (13 000 rpm; 24 °C). Der Überstand wurde auf zwei gekoppelte 1 mL (CV) HisTraps aufgetragen (1 mL/min), die mit 4 % Elutionspuffer ( $\triangleq$  40 mM Imidazol) äquilibriert wurden. Der Durchfluss entsprach der Wertfraktion, die mit 5 mM DTT (600 mM Stock) für 2 h bei RT reduziert wurde, um mögliche Disulfidbrücken aufzubrechen. Der Ansatz wurde anschließend gegen dreimal 1.5 L 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; pH 7.5 für je 12 h bei RT dialysiert. Abschließend erfolgt die Separation vom monomeren und dimeren Zielprotein über Gelfiltration (SEC Superdex-75 16/60, 120 mL CV). Dafür wurde der Ansatz 30 min zentrifugiert (13 000 rpm; 24 °C). Es wurden maximal 6 mL auf die SEC pro Lauf aufgetragen. Die Gelfiltration fand im SEC-Laufpuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl; pH 7.0; RT) mit 0.7 mL/min Fluss statt. Die Wertfraktionen wurden über SDS-PAGE analysiert (siehe 3.2.7.1), vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.6. Proteinkonzentrierung mittels Zentrifugalkonzentratoren

Um Proteinkonzentrationen von bis zu 1.2 mM zu erreichen, wurden Amicon® Ultra Filtereinheiten (4 mL; 3 kDa) nach einem modifizierten Herstellerprotokoll verwendet. Alle Schritte wurden bei 3 000 x g und RT durchgeführt. Während der Nutzung darf die Amicon Membran, einmal befeuchtet, nicht trocken laufen. Zuerst wurde das Amicon mit 15 mL Wasser und dann mit 15 mL entsprechendem Puffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde stets nur kurze Zeitintervalle zentrifugiert (2 bis 5 min). Zwischen den Zentrifugationsschritten wurde die Proteinlösung im Amicon sanft mit einer 1 mL-Pipette durchmischt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (ca. 1.3 mL Restvolumen) wurde ohne erneutes Durchmischen die Probe entnommen. Nach der Konzentrierung mittels Amicon muss der Oligomerisierungsgrad der Proteinprobe überprüft werden (siehe 3.2.7.4).

### 3.2.7. Analyse von Proteinreinheit und -integrität

#### 3.2.7.1. Diskontinuierliche SDS-PAGE und Coomassiefärbung

Die Proteine in dieser Arbeit weisen eine hohe chemische und thermische Stabilität auf (siehe 4.3.3). Das herkömmliche Vorgehen in der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese) würden durch unvollständige Denaturierung zu undefinierten Proteinbanden führen. Daher mussten Proteinproben gesondert denaturiert werden. Zur ausreichenden Konzentrierung wurden Proteinproben zuerst NaDOC/TCA gefällt<sup>112</sup>. Die zu fällende Proteinprobe wurde mit Wasser auf 1 mL aufgefüllt, mit 10 µL 10 % NaDOC versetzt und gemischt. Die Fällung folgte mit 200 µL 50 % TCA unter gründlichem Mischen. Die Probe inkubierte für 10 min (RT) und wurde anschließend zentrifugiert (13 000 rpm; 30 min; 20 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL 100 % Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert (13 000 rpm; 30 min; 20 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet (RT). Zur Denaturierung wurde das Pellet in 10 µL GdmSCN (2.7 M GdmSCN; 50 mM Tris; pH 7.0; 20 °C) aufgenommen und über Nacht inkubiert (RT). Der Ansatz wurde folgend mit 990 µL 1x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min inkubiert (60 °C; 1 400 rpm). Die Proben konnten dann direkt auf das SDS-Gel aufgetragen werden. In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE<sup>113</sup> mit 6-%igem Sammel- und 16-%igem Trenngel verwendet (Tabelle 2.2- I). Die Proteinauftrennung in der SDS-PAGE erfolgte in 40 min bei 35 mA/pro Gel; 400 mV; 20 °C. Detektiert wurden die Proteine entweder über Coomassiefärbung oder über Western Blot (siehe 3.2.7.2). Zur Coomassiefärbung wurde das Gel stufenweise mit geringer werdenden Coomassie-Konzentrationen (Fairbankslösung A, B und zuletzt C) für je 20 min (RT) inkubiert. Unspezifische Färbung wurde mittels 10 % (v/v) Essigsäure entfernt.

#### 3.2.7.2. Western Blot

Zur Überprüfung der Effizienz der His-tag-Hydrolyse durch Thrombin, sowie zur Temperaturbestimmung für die Hitzedenaturierung (siehe 3.2.4) wurde die Immundetektion über Western Blot angewendet. Hierfür wurden, modifiziert nach Towbin *et al.* (1979)<sup>114</sup>, die Proteine aus dem Gel der SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfer wurde in einer Semi-Dry-Apparatur entsprechend Herstellerangaben bei einer Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup> Membran für 45 min durchgeführt. Zuerst wurde das Gel aus der SDS-PAGE mit Wasser gespült und in Western Blot-Transferpuffer (Tabelle 2.2- I) 30 s inkubiert (RT). Für den Western Blot wurden Membran und Gel in einem senkrechten Aufbau von je zwei Lagen Whatman®-Papier ober- und unterhalb eingespannt und mit Transferpuffer feucht gehalten. Nach der Elektrophorese wurden

unspezifischen Bindungsstellen der Membran mit 3 % Milchpulver in TBS-Puffer über Nacht (4 °C; 10 rpm) blockiert. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-Puffer gewaschen (10 mL; 5 min; RT; 10 rpm) und daraufhin mit dem primären anti-His Antikörper (10 mL; 1:1 000 in 1 % Milchpulver in TBS) inkubiert (2 h; RT; 10 rpm). Es folgten drei Blockierungen mit 5 % Milchpulver in TBS-Puffer (10 mL; 5 min; RT; 10 rpm) und drei Waschschrte mit TBS-Puffer (10 mL; 5 min; RT; 10 rpm) um die Membran anschließend mit dem sekundären Antikörper (10 mL; 1:1 000 in 1 % Milchpulver in TBS) zu inkubieren (2 h; RT; 10 rpm). Nach drei abschließenden Blockierungen mit 5 % Milchpulver in TBS-Puffer (10 mL; 5 min; RT; 10 rpm) und drei Waschschrte mit TBS-Puffer (10 mL; 5 min; RT; 10 rpm) wurde die Membran mit Zellstoff flüchtig getrocknet und mit 1 mL eines kommerziellen Chemolumineszenz-Detektion-Reagenz aus Luminol und Peroxid (siehe 2.1) inkubiert (10 min; RT). Überschüssige Detektionslösung wurde mit Zellstoff entfernt. Der sekundäre Antikörper ist mit der Meerrettich-Peroxidase konjugiert, diese katalysiert die Chemolumineszenzreaktion vom Luminol mit Peroxiden. Diese Reaktion wurde auf einem Chemolumineszenz-Film festgehalten, der ca. 5 min in einer Autoradiographie-Kassette mit der Membran inkubiert wurde. Die belichteten Bereiche wurden mit Entwickler in einer Dunkelkammer visualisiert. Mittels Wasser wurde die Film-Entwicklung abgestoppt und durch Fixierer der Film lichtbeständig gemacht.

### 3.2.7.3. Fluoreszenzspektroskopie

Die M7-Varianten in dieser Arbeit besitzen lediglich ein Tyrosin als aromatische Aminosäure. Dies kann man sich zu Nutze machen, um Fremdproteine mit Tryptophan zu detektieren. Die Tryptophanfluoreszenz weist sowohl eine höhere Quantenausbeute, als auch eine bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums gegenüber Tyrosin auf. Daher lassen sich tryptophanhaltige Proteine gegenüber M7-Varianten sensitiv nachweisen.

Die Fluoreszenzmessung fand in einer Ultra-Mikro-Küvette statt. Es wurden die Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 274 nm (Tyr) und 295 nm (selektiv Trp) mit folgenden Parametern aufgenommen: RT; Spalten 3 nm (Anregung) und 5 nm (Emission); Datenintegration 0.1 s; Emissionsspektrum von 290 - 400 nm für 274 nm Anregung bzw. 310 - 400 nm für 295 nm Anregung. Alle Fluoreszenzmessungen wurden um das Referenzsignal (Intensitätsschwankungen der Xenon-Lampe) korrigiert.

### 3.2.7.4. Bestimmung des Protein-Oligomerisierungsgrad

Nach längerer Lagerung (Monate bis Jahre), Dialysen bei RT (bis 14 Tage) und Amicon-Proteinkonzentrierung (siehe 3.2.6) wurde die Integrität des Monomer- bzw. Dimerzustands über analytische SEC (siehe 3.2.7.4.1) und analytische Ultrazentrifugation (siehe 3.2.7.4.2) überprüft.

#### 3.2.7.4.1. Analytische Größenausschlusschromatografie (SEC)

Für die analytische SEC wurde eine 24 mL Superdex S75 Säule gewählt. Die SEC wurde im entsprechenden Probenpuffer äquilibriert und mit 0.5 mL/min Fluss bei 4 °C betrieben. Es wurden maximal 0.2 mL Probe aufgetragen, die bei 230 und 280 nm (Absorptionswellenlänge; 1 cm Flusszelle) detektiert wurde. Als Referenzen für die Elutionsvolumina dienten für den monomeren Zustand M7(wt) Protein und frisch präpariertes M7<sub>D23</sub> Dimer.

#### 3.2.7.4.2. Analytische Ultrazentrifugation

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) wurden in dieser Arbeit die zeitliche Stabilität des Oligomerisierungszustands überprüft, sowie die apparente Molekülmasse bestimmt<sup>115</sup>. Dies geschah in Sedimentationsgeschwindigkeits- und -gleichgewichtsexperimenten, die von PD Dr. H. Lilie (Institut für Proteinbiochemie; MLU Halle-Wittenberg) gemessen und mittels Sedfit ausgewertet wurden. In Doppelsektorzellen für Analyt und Pufferreferenz wurde mit 0.3 g/L Proteinprobe, bei 230 nm und 20 °C gemessen. Aus Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen (40 000 rpm für 4 h) konnte der Sedimentationskoeffizient bestimmt werden, der Informationen über Partikelgröße und Oligomerisierungszustand liefert. In Sedimentationsgleichgewichtsläufen (18 000 rpm über 42 bis 90 h) wurde die apparente Molekülmasse ermittelt, die ebenfalls Aussagen über den Oligomerisierungszustand zulässt.

Messpuffer: PBS oder 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.0; 20 °C

#### 3.2.7.5. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde in dieser Arbeit genutzt um möglichst exakte Massen von Proteinen und Peptiden aus den Redoxansätzen zu bestimmen und um den Reinheitsgrad von Protein- und Peptidpräparationen abzuschätzen. Die Analyse der Redoxansätze und der Peptidproben verlief im Allgemeinen über HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie. Hierbei wurden Proteine auf über rpHPLC auf einer C4-Säule und Peptidproben über eine C18-Säule aufgetrennt. Die Chromatografie (50 µL Probe; 0.1 % Methansäure) wurde über einen Acetonitril-Gradienten von 2 bis 57.5 % (v/v) in Wasser über 40 min (0.1 % Methansäure; Fluss 50 µL/min) bewerkstelligt (Absorption bei 214 nm). An die Chromatografie gekoppelt erfolgte die Ionisierung mittels Elektrospray (ESI-Quelle) im Massenspektrometer (4.5 kV; 275 °C; Sweep-Gas 25 L/min). Die Massenspektren wurden mit dem Orbitrap-Analysator per nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie aufgenommen.

Proteinproben deren Reinheit lediglich überprüft werden sollte, wurden, wie zuvor beschrieben, analysiert, allerdings ohne rpHPLC-Schritt. Die Proben wurden entsalzt und in ein leichtflüchtiges Lösungsmittel überführt. Über ESI erfolgte die Ionisierung und die Analyse in der Orbitrap. Sowohl die massenspektrometrischen Messungen als auch deren Auswertungen wurden von Dr. C. Ihling (Institut für Pharmazie; MLU Halle-Wittenberg) mit Xcalibur<sup>TM</sup> 3.0 durchgeführt.

#### 3.2.7.6. Atomspektroskopie (ICP-MS)

Gereinigtes Protein wurde auf seine Zusammensetzung an Metallionen überprüft. Das Protein wurde hierfür mittels SpeedVac vakuumgetrocknet, in konzentrierter 67 % HNO<sub>3</sub> suspendiert und bei 70 °C für 2 h mineralisiert. Als Blank fungierte der Proteinprobenpuffer. Die Proben wurden anschließend mit 67 % HNO<sub>3</sub> auf 2 % (w/v) verdünnt. Indium wurde als interner Standard hinzugefügt (10 ppb). Die Elementzusammensetzung wurde über Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) untersucht. Ionisiert wurde mittels ESI und analysiert durch eine X-Series II ICP-MS Apparatur. Eine externe Kalibrierkurve wurde mit ICP-multi-element standard solution XVI in 2 % (v/v) HNO<sub>3</sub> aufgenommen. Für den Blank wurde Qualitäts- und Quantitätsgrenzen nach DIN32645 TMM gewählt. Die Ergebnisse in ppb wurden auf Atome pro Proteinmolekül umgerechnet. Die Messungen wurden von Dr. M. Herzberger (AG Nies; Institut für Biologie und Mikrobiologie; MLU) durchgeführt.

### 3.3. Bestimmung von Konzentrationen

#### 3.3.1. Refraktometrie von Guanidinium-Lösungen

Konzentrationen von Guanidiniumchlorid- und Guanidiniumthiocyanat-Lösungen wurden über den Brechungsindex der Lösung refraktrometrisch bestimmt. Es wurden nur die Stock-Lösungen in einer 5-fach Bestimmung vermessen. Die Messung wurde bei 20 °C (Temperatur gilt für Analyt und Refraktometer) durchgeführt. Aus den erhaltenen Brechungsindices konnte die molare Konzentration mit folgenden Gleichungen 3-II und 3-III berechnet werden. Für Guanidiniumthiocyanat-Lösungen nach Takase *et al.* (1974)<sup>116</sup> mit dem Brechungsindex des Analyten ( $n$ ) und der Konzentration ( $c$ ) in Molar:

$$n = 1.3327 + 0.02475 \cdot c \quad 3-II$$

Für Guanidiniumchlorid-Lösungen nach Nozaki (1972)<sup>117</sup> mit der Differenz der Brechungsindices aus Analyt und entsprechenden Puffer ( $\Delta N$ ) und der Konzentration ( $c$ ) in Molar:

$$c = 57.147 \cdot \Delta N + 38.68 \cdot (\Delta N)^2 - 91.6 \cdot (\Delta N)^3 \quad 3-III$$

#### 3.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration vom Protein M7(wt) wurde mittels Absorption bei 280 nm photometrisch bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von M7(wt) ( $\epsilon_{280\text{nm}} = 1\,227\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) wurde nach Gill and von Hippel (1989)<sup>118</sup> durch M. Böhme (2011)<sup>119</sup> bestimmt. Die Konzentrationsberechnung erfolgt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E_{\lambda} = -\lg \left( \frac{I_1}{I_0} \right) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad 3-IV$$

Dabei ist  $E_{\lambda}$  die Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$ ;  $I_0$  die Intensität des eingestrahnten und  $I_1$  die Intensität des transmittierten Lichts;  $c$  die molare Konzentration des absorbierenden Stoffes und  $\epsilon$  sein molarer Extinktionskoeffizient (in  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ); sowie  $d$  die Schichtdicke der Küvette (in cm).

Die Redoxvarianten von M7 zeigten zusätzliche Absorption im relevanten Bereich um 280 nm, womit die photometrische Konzentrationsbestimmung nicht anwendbar war (thematisiert unter 4.2.2). Stattdessen wurde die Konzentration anhand der intrinsischen Tyrosinfluoreszenz bestimmt. Eine Tyrosinfluoreszenz-Kalibriergerade (0 bis 20  $\mu\text{M}$ ) wurde mit M7(wt) angefertigt, dessen Stock-Konzentration photometrisch sauber bestimmt werden konnte (in 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7.0; RT). Die Fluoreszenz wurde unter reduzierend, denaturierenden Bedingungen gemessen. Die Proteinproben (M7(wt) und zu bestimmende M7-Variante) wurden über Nacht denaturiert (2.7 M GdmSCN; 50 mM Tris; pH 7.0; 20 °C) und 2 h vor der Messung mit 2 mM TCEP versetzt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 20 °C in einer Halbmikro-Küvette mit folgenden Parametern: Anregungswellenlänge 274 nm; Emissionswellenlänge 305 nm; Spalten 3 nm (Anregung) und 5 nm (Emission); Messdauer 15 s; Inkrement 0.1 s; Datenintegration 0.1 s. Die relative Fluoreszenz wurde als Kinetik aufgezeichnet (15 s) deren Messpunkte gemittelt wurden. Eine Versuchsreihe unterlag mindestens einer Doppelbestimmung ( $n \geq 2$ ). Jede Probe hatte ein Volumen von 1.3 mL. Hiervon wurden 240  $\mu\text{L}$  zur Benetzung der Küvette genutzt und anschließend verworfen. Die eigentliche Messung wurde mit 1.0 mL derselben Probe durchgeführt. Die Probe wurde 7 min im Fluorimeter inkubiert (20 °C) um Temperaturschwankungen zu minimieren. Konzentrationsreihen wurden von

der niedrigsten Konzentration aufsteigend gemessen, dabei wurde die Küvette nicht vollständig gereinigt, sondern nur ausgeschüttelt. Die Kalibriergerade vom M7(wt) wurde linear gefittet:

$$F = m \cdot c + n \quad 3\text{-V}$$

Hierbei ist  $F$  die gemessene relative Fluoreszenz (in FU),  $c$  die Konzentration an Protein,  $m$  der Anstieg der linearen Regression und  $n$  der Schnittpunkt mit der y-Achse (relative Fluoreszenz). Mittels Kalibriergerade konnte die Konzentration der M7-Varianten aus deren relativer Fluoreszenz bestimmt werden.

### 3.4. Peptidsynthese und -präparation

#### 3.4.1. Spritzenfestphasensynthese

Die manuelle Peptidsynthese wurde in einer 10 mL-Spritze durchgeführt. Verwendet wurde Fmoc-geschütztes Rink Amide AM Harz, das nach Peptidabspaltung einen amidierten Peptid-C-Terminus liefert. Desweiteren wurden für die Synthese Aminosäuren gewählt deren Seitenketten Schutzgruppen enthielten, die durch TFA spaltbar waren. Die Peptidsynthese erfolgte mit 100  $\mu$ mol Harz, das zu Beginn 20 min in DMF quellen musste. Alle Schritte der Synthese wurden bei Raumtemperatur und 600 rpm durchgeführt. Das Flüssigkeitsvolumen in der Spritze betrug dabei stets 6 mL. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Harz, zur Aktivierung dessen, erfolgte in drei Zyklen, die aus folgenden 7-minütigen Schritten bestanden: **i)** dreimal waschen mit DMF; **ii)** Fmoc-Abspaltung mit 20 % Piperidin in DMF. Abschließend wurde **iii)** dreimal 10 min mit DMF gewaschen. Die Kopplungsreaktion erfolgte mit 4 Äquivalenten Aminosäure, 3.6 Äquivalenten des Aktivators TBTU und 8 Äquivalenten der Base DiPEA in DMF für 1.5 bis 2 h. Danach wurde, wie beschrieben, die Fmoc-Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten und die nächste Kopplung erfolgte. Der N-Terminus des Peptids wurde nach der letzten Kopplung acetyliert. Das Acetylierungsreagenz bestand aus 10 % Acetanhydrid; 10 % DiPEA; 80 % DMF. Die Acetylierung erfolgte in drei Zyklen, die aus folgenden Schritten bestanden: **i)** dreimal 7 min waschen mit DMF; **ii)** 10 min Inkubation mit Acetylierungsreagenz. Abschließend wurde **iii)** dreimal 7 min mit DMF gewaschen. Um das Harz zu trocknen, musste es für je 5 min **i)** dreimal mit DCM und **ii)** dreimal mit Ether gewaschen werden. Das Harz konnte daraufhin im Vakuum getrocknet werden. Die Abspaltung des Peptids vom Harz und der Seitenketten-Schutzgruppen erfolgte im Spaltungsreagenz (90 % TFA; 5 % TIS; 5 % Wasser) für 2 h. Über die Fritte der Spritze wurde das Harz abgetrennt und die Peptidlösung 1:1 mit DCM verdünnt und in einem 200 mL-Rundkolben gegeben. Das Gemisch wurde im Rotationsverdampfer weitgehend abgedampft, bis eine viskose Flüssigkeit ( $\approx$  4 mL) verblieb. Diese wurde mit 150 mL Ether versetzt und 15 min bei 4 °C inkubiert, wobei das Peptid präzipitiert. Das Präzipitat wird über eine Filternutsche gesammelt und dreimal mit 10 mL Ether gewaschen. Abschließend wird das Peptid im Exsikkator über Nacht getrocknet. Das fertige Peptid lag als weißes Pulver vor, dessen Reinheit mittels rpHPLC (siehe 3.5.1.2) und Massenspektrometrie (siehe 3.2.7.5) verifiziert wurde. Die Cysteine der CXXC-Peptide lagen im Endprodukt vollständig reduziert vor.

#### 3.4.2. Automatisierte Peptidsynthese

Die automatisierte Peptidsynthese am 433A Peptidsynthesizer wurde nach Standardprotokoll des Herstellers (Applied Biosystems™) bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei sich die Teilschritte zur

manuellen Peptidsynthese (siehe 3.4.1) nicht unterscheiden. Es wurden 100  $\mu\text{mol}$  Rink Amide AM Harz verwendet, die in folgenden Kopplungsansatz ( $V = 3\ 350\ \mu\text{L}$ ) prozessiert wurden:

**Tabelle 3.4.2- I: Kopplungsansatz automatisierten Peptidsynthese**

Komponente	Stock	n Ansatz ( $\mu\text{mol}$ )	V ( $\mu\text{L}$ )
Harz	/	100	/
Aminosäure	0.5 M (in DMF)	525	1 050
Aktivator (HBTU)	0.6 M (in DMF)	600	1 000
Base (DiPEA)	20 % $\triangleq$ 1.21 M	1 010	835
Lösungsmittel (NMP)	100 %	/	auf 3 350

Kopplungsreaktionen mit Cysteinen wurden gesondert mit 5 Äquivalenten Base (505  $\mu\text{mol}$ ) durchgeführt, um auftretende Diastereomere des Cysteins bei der Kopplung zu minimieren<sup>120</sup>. Zur Ausbeutesteigerung erfolgte die Cysteinkopplung als Doppelkopplung, d.h. es wurden zwei Kopplungsschritte hintereinander durchgeführt. Für die zweite Kopplung wurden Cystein- (263  $\mu\text{mol}$ ) und DiPEA-Anteil (253  $\mu\text{mol}$ ) halbiert. Das Reaktionsvolumen für die Cysteinkopplung betrug 3 350  $\mu\text{L}$ , das mit NMP aufgefüllt wurde. Um nicht-gekoppelten Peptide an den weiteren Kopplungen zu hindern, wurde nach der Doppelkopplung des Cysteins ein Acetylierungsschritt durchgeführt. Acetyliert wurde in 10 % Acetanhydrid; 10 % DiPEA; 80 % DMF nach Herstellerprotokoll. Nach Abschluss der Peptidsynthese wurde das Peptid im Exsikkator oder in der Lyophilie getrocknet. Das fertige Peptid lag als weißes Pulver vor, dessen Reinheit mittels rpHPLC (siehe 3.5.1.2) und Massenspektrometrie (siehe 3.2.7.5) verifiziert wurde. Falls nötig, z.B. bei Verunreinigungen, konnten Peptide präparativ über rpHPC gereinigt werden. Hierbei werden  $\approx 20\ \text{mg}$  Peptid in 100  $\mu\text{L}$  TFA gelöst. Diese Lösung wurde in 7.5 mL 5 % ACN (v/v) mit 0.1 % TFA verdünnt, auf die präparative C18-Säule geladen und im ACN Gradient von 5 bis 100 % in 60 min (0.1 % TFA; Fluss 8 mL/min) separiert. Das Zielpeptid wurde in den Elutionsfraktionen über Massenspektrometrie (siehe 3.2.7.5) identifiziert und mittels Lyophilie getrocknet. Gelagert wurde das Peptid bei 4 °C. Wie auch bei der manuellen Peptidsynthese lagen die Cysteine nach der Peptidpräparation vollständig reduziert vor.

### 3.5. Biophysikalische Charakterisierung

Alle Proteinproben wurden vor ihrer Verwendung gegen den entsprechenden Messpuffer (dreimal 1.5 L für je 8 h) dialysiert. Gewollter Nebeneffekt der Dialyse ist die komplette Oxidation der Cysteine-Reste durch Luftsauerstoff. Dabei bilden sich ausschließlich intramolekulare Disulfidbrücken in der CXXC-Sequenz, wie über rpHPLC bestätigt werden konnte. Wurde reduziertes Protein im Versuch benötigt, so wurde das Protein mit 10 mM DTT inkubiert (2 h; pH 7.0; RT) und anschließend gegen den entsprechenden entgasten Messpuffer ohne DTT dialysiert (dreimal 1.5 L für je 8 h; RT). Um eine erneute Oxidation des Proteins zu verhindern, wurde unter Stickstoff-Zustrom dialysiert. Verwendete Peptide liegen nach der Peptidsynthese (siehe 3.4) stets reduziert vor und müssen nicht zusätzlich reduziert werden. Vollständig oxidiertes Peptid erhielt man aus der Inkubation mit 1 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 h; RT). Der Oxidationsstatus von Proteinen und Peptiden wurde mittels rpHPLC überprüft (siehe 3.5.1). Standardmäßig wurden alle Proben für Experimente  $\geq 30\ \text{min}$  zentrifugiert (13 000 rpm) und nur der Überstand verwendet. Alle Proben, die reduziert wurden oder werden, sind stets mit  $\text{N}_2$  überschichtet wurden. Desweiteren wurden für Versuche bei denen der Oxidationsstatus relevant ist, alle Puffer entgast.

### 3.5.1. Messung von Redoxpotentialen der CXXC-Varianten

Das Redoxpotential beschreibt die Tendenz eines Moleküls reduziert bzw. oxidiert zu werden. Das in dieser Arbeit zu untersuchende Redoxpotential beruht auf zwei Cysteinen die innerhalb eines Moleküls oxidiert (Disulfidbrücke) oder reduziert (Dithiol) vorliegen können. Dabei dienen die Redoxpotentiale der Interpretation der Wechselbeziehung zwischen M7-Struktur und den physikochemischen Eigenschaften der CXXC-Sequenz. Mittels einer Titration der Analyten (M7-Varianten oder CXXC-Peptide) mit einem zweiten definierten Redoxpaar (2GSH/GSSG oder  $\text{DTT}_{\text{RED}}/\text{DTT}_{\text{OX}}$ ) wird das Redoxpotential gemessen. Das zweite Redoxpaar besitzt mindestens ein Thiol und ist hinsichtlich seiner Konzentration und seinem Redoxpotential ( $E^\circ$ ) definiert. Die Bestimmung der Redoxpotentiale setzt die Quantifizierung aller beteiligten Redoxspezies voraus. Das Vorgehen zur Bestimmung der Redoxpotentiale wird in den folgenden Kapiteln behandelt.

#### 3.5.1.1. Redoxpotentialbestimmung von Proteinen

##### 3.5.1.1.1. Zusammenstellung des Redoxansatzes

Vor dem Mischen des Redoxansatzes wurde die Proteinprobe dreimal gegen 1.5 L PBS für je 12 h (RT) dialysiert und darauf folgend zentrifugiert (13 000 rpm; 30 min; 24 °C). Im Zeitraum der Dialyse erhält man vollständig oxidiertes Protein als Ausgangslösung. Für Proteinredoxtests wurde oxidiertes (GSSG) und reduziertes (GSH) Glutathion, sowie oxidiertes und reduziertes DTT verwendet. Es ist wichtig zu beachten, dass Glutathion die Lösungen ansäuert, weshalb gegentitriert werden muss. Hingegen hat DTT keinen relevanten Einfluss auf den pH-Wert.

Eine Redoxtitration bestand aus mehreren Messpunkten ( $n > 10$ ) mit unterschiedlichen Verhältnissen an GSH zu GSSG bzw.  $\text{DTT}_{\text{RED}}$  zu  $\text{DTT}_{\text{OX}}$ . Ein Redoxansatz (Beispiel in Tabelle 3.5.1- I) hatte ein Volumen von 1 mL und setzte sich wie folgt zusammen: 11  $\mu\text{M}$  Protein; 1 mM EDTA; 20 mM Glutathion (GSH + GSSG); in entgastem PBS; pH 7.0; 30 °C. Der Protein-Stock wurde nicht entgast. Die Quantifizierung der Glutathion- bzw. DTT-Redoxspezies wird unter 3.5.1.1.3 bzw. 3.5.1.2 beschrieben. Redoxansätze wurden mit Stickstoff überschichtet und für mindestens 12 h bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Der pH wurde Testweise von Einzelproben mittels pH Elektrode (InLab Micro) überprüft. Zum Ende der Inkubation wurde der Ansatz auf ca. pH 2.5 durch 1/10 Volumen 200 mM HCl (30 °C) gequenched. Die Ansätze wurden zentrifugiert (13 000 rpm; 30 min; 24 °C) um sie darauffolgend über rpHPLC zu quantifizieren (siehe 3.5.1.1.2).

**Tabelle 3.5.1- I: Redoxansatz ( $E_{(2\text{GSH}/\text{GSSG})} = -200 \text{ mV}$ )**

Stock	Konzentration im Ansatz
Protein	11 $\mu\text{M}$
GSH	15 mM
GSSG	5 mM
EDTA	1 mM
PBS-Puffer	restliche Volumen auf 1.0 mL

##### 3.5.1.1.2. Quantifizierung der Proteinredoxspezies

Die Quantifizierung der Proteinredoxspezies erfolgte durch rpHPLC auf einer C4-Säule. Die Laufmittel der rpHPLC waren A (Wasser; 0.1 % (v/v) TFA) und B (ACN; 0.1 % (v/v) TFA). Die Säule wurde mit einem Fluss von 1 mL/min (30 °C) betrieben und war mit 2 % B äquilibriert. Gemessen wurde die Absorption bei 220 nm. Es wurde 1 mL vom Redoxansatz zum Zeitpunkt 0 min aufgetragen. Für die

hier verwendete semi-präparative Säule entspricht 1 mL einem sehr großen Probenvolumen, wodurch die Säule deäquilibriert werden kann. In diesem Fall wurde die Trennung der Redoxspezies aber nicht entscheidend gestört. Die Trennung erfolgte im Gradienten:

0 – 15 min	2 % B (isokratisch)
15 – 25 min	2 – 35 % B
25 – 55 min	35 – 60 % B
55 – 60 min	60 – 95 % B
60 – 65 min	95 % B (isokratisch)
65 – 66 min	95 – 2 % B
66 – 75 min	2 % B (isokratisch)

Zur Quantifizierung der Redoxspezies wurden die Peakintegrale (Programm: Chromeleon) der beiden Redoxspezies bestimmt (Beispiel für eine Trennung der Redoxspezies im Anhang 7.5). Ähnlich dem DsbA(wt)<sup>121</sup> besaßen die oxidierte und reduzierte Spezies bei 220 nm praktisch den gleichen Extinktionskoeffizienten und wurden als identisch angesehen (Daten nicht gezeigt). Damit genügte es die Verhältnisse der relativen Peakflächen für die Quantifizierung zu bestimmen.

### 3.5.1.1.3. Quantifizierung von Glutathion (GSH und GSSG)

Die Stocklösungen von GSH und GSSG wurden auf unterschiedliche Weise quantifiziert. Glutathionkonzentrationen wurden nicht in den einzelnen Redoxansätzen bestimmt, da hierfür kein brauchbarer Assay gefunden bzw. etabliert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Reduziertes Glutathion (GSH) wurde nach dem Verfahren von Ellman (1959)<sup>122</sup> quantifiziert. Ellman's Reagenz (DTNB) reagiert stöchiometrisch mit Sulfhydrylgruppen und das Reaktionsprodukt, das TNB-Anion, lässt sich photometrisch über die Absorption bei 412 nm quantifizieren ( $\epsilon_{412} = 14\,140\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; pH 8.0; RT)<sup>123</sup>. Der Messansatz (1 mL) bestand aus:

**Tabelle 3.5.1- II: Ansatz GSH-Quantifizierung**

Stock	Volumen im Ansatz ( $\mu\text{L}$ )
1 M Tris; pH 8.0	100
2 mM DTNB; in 50 mM NaAc	50
Analyt (GSH)	10
Wasser	840

DTNB lag im Ansatz ungefähr im 10-fachen Überschuss gegenüber dem Analyten vor, um eine quantitative Reaktion zu gewährleisten<sup>124</sup>. Der Ansatz wurde 15 min im Dunkeln (RT) inkubiert und anschließend die Absorption bei 412 nm gemessen. Die GSH-Konzentrationsberechnung erfolgte in einer Mehrfachbestimmungen ( $n \geq 6$ ) nach Lambert-Beerschen Gesetz (siehe 3.3.2).

Oxidiertes Glutathion (GSSG) wurde sowohl in der GSSG-Stock-Lösung als auch im GSH-Stock bestimmt. GSSG wurde modifiziert nach Yilmaz *et al.* (2009)<sup>125</sup> über rpHPLC detektiert (C18 LiChrospher®; Absorption bei 220 nm; 30 °C) und das Integral (Chromeleon) bestimmt. Es handelte sich um eine isokratische Trennung mit 2 % ACN; 98 % Wasser; 0.1 % (v/v) TFA bei einem Fluss von 1 mL/min über 22 min. GSSG Proben lagen in PBS; 1/10 Volumen 200 mM HCl vor. Über das Integral  $x$  (in mAU·min) konnte die Stoffmenge an GSSG ( $n_{\text{GSSG}}$  in nmol) im aufgetragenen Volumen mit der Kalibriergeraden nach Gleichung 3-VI berechnet werden. Die Kalibriergerade beruht auf der Einwaage von kommerziell erhältlichen GSSG.

$$n_{\text{GSSG}} = 2.759x + 0.684 \quad 3\text{-VI}$$

#### 3.5.1.1.4. Berechnung des Redoxpotentials

Durch die Quantifizierung aller beteiligten Redoxspezies ist es möglich aus einer Redoxtitration das Redoxpotential der Proteine ( $E^{\circ}_{\text{Analyt}}$ ) über die Nernst-Gleichung (3-VII) zu berechnen:

$$E^{\circ}_{\text{Analyt}} = -E^{\circ}_{\text{RP}} + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \log K \quad 3\text{-VII}$$

$$K = \frac{\text{GSH}^2 \cdot M7_{\text{OX}}}{\text{GSSG} \cdot M7_{\text{RED}}} \quad 3\text{-VIII}$$

$$K = \frac{\text{DTT}_{\text{RED}} \cdot M7_{\text{OX}}}{\text{DTT}_{\text{OX}} \cdot M7_{\text{RED}}} \quad 3\text{-IX}$$

Bei  $E^{\circ}_{\text{RP}}$  handelt es sich um das Redoxpotential ( $E^{\circ}$ ) des zweiten Redoxpaares. Im Falle von Glutathion wird allgemein in der Literatur ein  $E^{\circ}$  von  $-240 \text{ mV}^{126}$  (pH 7.0) verwendet (allerdings bei  $40^{\circ}\text{C}$  bestimmt). Für DTT wurde  $E^{\circ}$  in dieser Arbeit im Gleichgewicht mit Glutathion bestimmt (siehe Ende dieses Kapitels).  $E^{\circ}$  für DTT liegt bei  $-317 \text{ mV}$  (pH 7.0).  $R$  ist die Gas- ( $8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) und  $F$  die Faradaykonstante ( $96487 \text{ J}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $T$  die Temperatur (in Kelvin) und  $z$  beschreibt die ausgetauschten Elektronen in der Redoxreaktion ( $n = 2$ ).

$$y = \frac{x}{x + K} \quad 3\text{-X}$$

Die Ermittlung der Gleichgewichtskonstante ( $K$ ) aus der Redoxtitration erfolgte nach Hawkins *et al.* (1991)<sup>127</sup> durch den Fit nach Gleichung 3-X. Die Herleitung des Fits wird im Anhang aufgeführt (Anhang 7.1). Hierbei ist  $y$  die Fraktion der reduzierten Spezies des Analyten (CXXC-Varianten) bei einem bestimmten Verhältnis ( $x$ ) des zweiten Redoxpaares ( $2\text{GSH}/\text{GSSG}$  bzw.  $\text{DTT}_{\text{RED}}/\text{DTT}_{\text{OX}}$ ).

Da die Glutathionkomponenten nicht direkt im Reaktionsansatz, sondern in den Stocks gemessen wurden, wurden folgende Näherungen verwendet: Die  $\text{GSH}$ -Konzentration (in Molar) ergab sich aus der Stockkonzentration (siehe 3.5.1.1.3) abzüglich der  $\text{GSH}$ -Menge, die bei der Reduktion des Proteins (liegt zu Beginn der Reaktion vollständig oxidiert vor) zu  $\text{GSSG}$  umgewandelt wird. Die  $\text{GSSG}$ -Konzentration (in Molar) ergibt sich aus der Stockkonzentration und zusätzlich aus dem  $\text{GSSG}$ -Anteil des  $\text{GSH}$ -Stocks (siehe 3.5.1.1.3) und dem  $\text{GSSG}$ , das bei der Proteinreduktion gebildet wird. Für  $M7_{\text{OX}}$  und  $M7_{\text{RED}}$  wurden direkt die Integrale aus der Quantifizierung eingesetzt (siehe 3.5.1.1.2).

Aufgrund der Uneinigkeit über das Standardredoxpotential von DTT in der Literatur von  $-312$  bis  $-332 \text{ mV}^{128-131}$  war es nötig das Redoxpotential von DTT unter den Messbedingungen dieser Arbeit zu ermitteln. Dies geschah im Gleichgewicht mit Glutathion und ergab  $E^{\circ}$  von  $-317 \text{ mV}$  (pH 7.0) für DTT. Die Quantifizierung der Redoxspezies von DTT erfolgte über rpHPLC (siehe 3.5.1.2). Die Normierung auf das Redoxpotential von Glutathion ( $E^{\circ} = -240 \text{ mV}$ ) ermöglicht den direkten Vergleich zwischen Redoxpotentialen, die im Gleichgewicht mit Glutathion oder mit DTT bestimmt wurden.

### 3.5.1.2. Redoxpotentialbestimmung von CXXC-Peptiden mittels DTT

Die Redoxpotentiale der Redoxpeptide wurde, wie auch bei den Proteinen im Gleichgewicht mit einem zweiten Redoxpaar bestimmt (Gleichung 3-IX). Hier mit oxidierten und reduzierten DTT. Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante ( $K$ ) erfolgte ebenfalls durch Gleichung 3-X. Im Ansatz lag das CXXC-Peptid zu Beginn reduziert vor. Ein Redoxansatz hatte ein Volumen von 0.5 mL und setzte sich wie folgt zusammen: 250  $\mu$ M Peptid (reduziert); 1 mM EDTA; 50 mM DTT<sub>OX</sub>; DTT<sub>RED</sub> (0 - 2 mM); in PBS; pH 7.0. Die Stocklösungen (Tabelle 2.2- I) lagen entgast vor und die Redoxansätze wurden mit Stickstoff überschichtet. Der Ansatz wurde für 2 h bei 30 °C inkubiert. Die Gleichgewichtseinstellung lag bei < 2 h (Daten nicht gezeigt). Der pH im Ansatz wurde testweise mittels pH-Elektrode (InLab Micro) überprüft. Im Falle der CXXC-Peptide (siehe 4.1) konnten alle Redoxspezies gleichzeitig in einem Ansatz mittels rpHPLC (C18 LiChrospher®; Absorption bei 220 nm; 30 °C) detektiert und quantifiziert werden. Hierfür wurde der Ansatz am Ende der Inkubation auf pH 2.5 durch 1/10 Volumen 200 mM HCl (30 °C) angesäuert. Die Chromatografie erfolgte mit 1 mL/min (30 °C) in folgenden Gradienten aus Wasser (Laufmittel A) und ACN (Laufmittel B) mit 0.1 % (v/v) TFA:

0 – 21 min	2 % B (isokratisch)
21 – 38 min	2 – 50 % B
38 – 39 min	50 – 100 % B
39 – 40 min	100 – 2 % B
40 – 45 min	2 % B (isokratisch)

Ebenso wie bei den Proteinen (siehe 3.5.1.1.4) wurde bei den CXXC-Peptiden direkt das Integral der 220 nm Absorption zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante verwendet. Da unklar war, ob die Disulfidbrücke einen signifikanten Anteil in der Absorption bei 220 nm bei den Peptiden generiert, wurde zur Quantifizierung des oxidierten Peptids die Integraldifferenz der reduzierten Spezies im jeweiligen Ansatz zum Gesamtintegral bei 100 % reduzierten Peptid verwendet.

Die Stoffmenge von DTT<sub>OX</sub> und DTT<sub>RED</sub> ( $n$  in nmol) im aufgetragenen Volumen konnten aus den Integralen  $x$  (in mAU·min) der rpHPLC mit folgenden Kalibriergeraden berechnet werden:

$$n_{\text{DTT}_{\text{OX}}} = 0.6193x - 0.1512 \quad 3\text{-XI}$$

$$n_{\text{DTT}_{\text{red}}} = 0.3855x - 0.0688 \quad 3\text{-XII}$$

### 3.5.1.3. Sekundärstrukturbestimmung mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie

Die Bestimmung der Sekundärstruktur der M7-Varianten diente der Überprüfung der strukturellen Integrität der Mutanten und dem Vergleich zur Struktur des M7(wt). Die CXXC-Peptide sind das Modell für den ungefalteten Zustand der CXXC-Sequenz innerhalb der M7-Redoxvarianten. Über Fern-UV-CD-Spektroskopie sollen mögliche Strukturen dieser Peptide identifiziert werden.

#### 3.5.1.3.1. Sekundärstrukturbestimmung der M7-Varianten

Die Konzentration der M7-Varianten wurde, wie zuvor (siehe 3.3.2) beschrieben, über die intrinsische Tyrosin-Fluoreszenz mittels Kalibriergeraden des M7(wt) Protein bestimmt. Aus derselben Proteinstammlösung der Konzentrationsbestimmung wurde die Probe für die CD-Spektroskopie zusammengestellt. Die Proteinkonzentration lag bei  $\approx 10 \mu$ M bzw. 0.11 mg/mL. Es wurde im

Phosphat-Puffer (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.0; 20 °C) unter reduzierenden (2 mM TCEP, 2 h vor der Messung bei RT inkubiert; N<sub>2</sub> überschichtet) und nicht reduzierenden Bedingungen gemessen. Die Spektroskopie erfolgte bei 20 °C in 2 mm- oder 1 mm-Küvetten mit folgenden Parametern: ≥ 30 Akkumulationen; 50 nm/min Schrittgeschwindigkeit; 0.5 nm Schrittweite; 0.5 s Datenintegration; Dynodenspannung < 600 Volt. Eine Versuchsreihe unterlag mindestens einer Doppelbestimmung (n ≥ 2). Jede Probe hatte ein Volumen von 1.2 mL. Hiervon wurden 165 µL zur Benetzung der Küvette genutzt und anschließend verworfen. Die eigentliche Messung wurde mit derselben Probe durchgeführt. Die Probe wurde 5 min im CD-Spektropolarimeter inkubiert (20 °C) um Temperaturschwankungen zu minimieren. Die Messungen wurden um ihr Puffer-Signal korrigiert, d.h. die ermittelte Elliptizität [θ] der jeweiligen Ansätze ohne Protein. Die ermittelte Elliptizität [θ] wurde anschließend auf die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure [θ]<sub>MRW</sub> normiert<sup>132</sup>:

$$[\theta]_{MRW} = \frac{[\theta] \cdot M}{10 \cdot d \cdot c \cdot N} \quad 3\text{-XIII}$$

Hierbei wird [θ]<sub>MRW</sub> (in deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>) und [θ] (in mdeg) angegeben. Bei *M* handelt es sich um das Molekulargewicht (in g·mol<sup>-1</sup>), *d* ist die Schichtdicke der Küvette (in cm), *c* die Konzentration (in mg·mL<sup>-1</sup>) und *N* ist die Anzahl der Aminosäuren.

Desweiteren wurden die M7-Varianten unter denaturierenden Bedingungen über Fern-UV-CD spektroskopisch analysiert (siehe 3.5.2).

### 3.5.1.3.2. Sekundärstrukturbestimmung der CXXC-Peptide

Die Sekundärstruktur der CXXC-Peptide wurde, wie bei den Protein-Varianten, unter reduzierenden, nicht reduzierenden und denaturierenden Bedingungen ermittelt. Nur im Falle der Heptapeptide (ein Tyrosinyl-Rest) konnte die Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gleichung 3-IV) bei 280 nm ermittelt werden. Alle weiteren Peptide besitzen keine aromatischen Aminosäuren. Daher wurde durch Einwaage die Masse bzw. die resultierende Konzentration bestimmt. Es wurden in einer 0.1 mm Küvette mit einer Konzentration von ≈ 2.5 mg/ml bei 20 °C gemessen. Eine Versuchsreihe unterlag einer Doppelbestimmung (n = 2). Jede Probe hatte ein Volumen von 0.3 mL. Die weiteren Versuchsparameter entsprechen der CD-Spektroskopie der M7-Proteine (siehe 3.5.1.3.1). Alle Messungen wurden um ihr Puffer-Signal korrigiert, d.h. die ermittelte Elliptizität [θ] der jeweiligen Ansätze ohne Peptid. Die Auswertung erfolgte nach Gleichung 3-XIII (siehe 3.5.1.3.1).

Puffer verschiedener Messbedingungen:

reduzierend	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 5 mM TCEP; 1 mM EDTA; pH 7.0; RT; entgast
nicht reduzierend	50 mM Tris (entgast); 1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; pH 7.0; 20 °C
denaturierend	6 M GdmCl; 50 mM Tris; 5 mM TCEP; 1 mM EDTA; pH 7.0; 20 °C

### 3.5.2. Denaturierungsübergänge

M7 und seine Redoxvarianten zeichnen sich durch eine hohe Stabilität gegenüber thermischer und chemischer Einflüsse aus. Die Stabilität der M7-Varianten wurde auf zwei Arten untersucht: **i**) die Änderung der Elliptizität bei 220 nm in der Fern-UV-CD-Spektroskopie, die hauptsächlich durch

Änderungen der  $\alpha$ -helikale Anteile verursacht wird und **ii**) die Tyrosin-Fluoreszenz, deren Intensität an die Tertiärstruktur des Proteins gekoppelt ist.

### 3.5.2.1. Thermisch induzierte Denaturierungsübergänge über CD-Spektroskopie

Die M7-Varianten und seine Redoxvarianten wurden einen aufsteigenden Temperaturgradienten von 20 bis 98 °C ausgesetzt. Anschließend wurde die Probe im umgekehrten T-Gradienten wieder auf 20 °C abgekühlt. Die Sekundärstrukturänderungen wurden über die Elliptizität bei 220 nm [ $\vartheta_{220nm}$ ] verfolgt. Die Messung fand in einer 1 mm-Küvette mit einer Proteinkonzentration von  $\approx 10 \mu\text{M}$  mit folgenden Parametern statt: 1 nm Bandweite; 1 °C/min Schrittgeschwindigkeit; 0.2 °C Schrittweite; 8 s Datenintegration; 300 s konstante Temperatur vor der umgekehrter T-Messung. Eine Versuchsreihe unterlag mindestens einer Doppelbestimmung ( $n \geq 2$ ).

Messpuffer: PBS oder 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7.0; 20 °C

### 3.5.2.2. Chemisch induzierte Denaturierungsübergänge über Fluoreszenz-Spektroskopie

Durch die hohe thermodynamische Stabilität der Varianten kann man einen verlässlich auswertbaren Denaturierungsübergang nur in GdmSCN erhalten. Die relative Fluoreszenz wurde entsprechend Kapitel 3.3.2 mit den gleichen Parametern und dem gleichem Vorgehen zur Behandlung der Küvette aufgenommen. Denaturierungsübergänge wurden sowohl bei 20 und 30 °C, als auch unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen (Puffer in Tabelle 2.2- I) in GdmSCN (50 mM Tris; pH 7.0 [T-Abhängigkeit beachten]) gemessen. Der Vergleichbarkeit halber wurde dem nicht reduzierenden Messansatz ein im Salzgehalt adäquater Ersatz für die TCEP-Lösung (5 mM TCEP im reduzierenden Messansatz) zugesetzt (Tabelle 2.2- I). Die Anteile an reduzierter und oxidiertes Spezies wurden nach der Messung per rpHPLC überprüft (siehe 3.5.1.1.2). Ein Beispielansatz ist in Tabelle 3.5.2.2- I gezeigt. Proben unter reduzierenden Bedingungen wurden 5 h ( $\text{N}_2$  überschichtet) und unter nicht-reduzierenden Bedingungen 11 h inkubiert (bei 20 bzw. 30 °C). Die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichtes der Denaturierung im entsprechenden Zeitrahmen wurde zuvor überprüft.

**Tabelle 3.5.2.2- I: Denaturierungsansatz (2.7 M GdmSCN; reduzierend)**

Stock	Konzentration im Ansatz
Protein	10 $\mu\text{M}$
GdmSCN	2.7 M
TCEP-Ersatz	32.5 $\mu\text{L}$ * bzw. 5 mM
EDTA	1 mM
Tris-Puffer	restliche Volumen auf 1.3 mL

\* 32.5  $\mu\text{L}$  entspricht Volumen der TCEP-Ersatz-Lösung im nicht reduzierenden Ansatz

Die GdmSCN-Konzentration der Stammlösung wurde mittels Refraktometer bestimmt (siehe 3.3.1). Für die Auswertung der Denaturierungskurve wurden die GdmSCN-Konzentrationen ( $M$ ) in Denaturansaktivitäten ( $D'$ ) nach Gleichung 3-XIV umgerechnet<sup>133</sup>. Dies führt vor allem bei GdmSCN-abhängigen Denaturierungen zu einer besseren Näherung für den Zusammenhang aus Denaturierungsmittel-Konzentration und freier Energie der Proteinentfaltung ( $\Delta G_{u \rightarrow n}$ ). Die berechnete Aktivität ( $D'$ ) wird in Molar angegeben.

$$[D'] = [M] \cdot \left( \frac{6.47 M}{(6.47 M + [M])} \right) \quad 3\text{-XIV}$$

Die Auswertung des Denaturierungsüberganges erfolgte nach der LEM (*linear extrapolation method*), deren Voraussetzung die Reversibilität der Faltung bzw. Entfaltung ist, und dass im Übergangsbereich nur zwei Zustände populieren (natives und denaturiertes Protein). Die Denaturierungsübergänge werden nach Santoro and Bolen (1988)<sup>134</sup> angepasst (Gleichung 3-XV).

$$y = \frac{\{y_F + m_F \cdot [D]\} + (y_U + m_U \cdot [D]) \cdot \exp - ((\Delta G_{H_2O} - m \cdot [D])/R \cdot T)}{(1 + \exp - ((\Delta G_{H_2O} - m \cdot [D])/R \cdot T))} \quad 3\text{-XV}$$

Hierbei ist  $y$  die gemessene relative Fluoreszenz (in FU);  $y_F$  und  $y_U$  sind die Schnittpunkte mit der  $y$ -Achse und  $m_F$  und  $m_U$  die Anstiege der Pre- und Postübergangsphasen-Basislinien;  $D$  ist die Aktivität des Denaturierungsmittels (in M);  $\Delta G_{H_2O}$  (in  $J \cdot mol^{-1}$ ) ist die geschätzte konformationelle Stabilität des Proteins unter der Annahme, dass ein linearer Zusammenhang des Übergangs bis 0 M Denaturierungsmittel besteht;  $m$  (in  $J \cdot mol^{-1} \cdot M^{-1}$ ) ist der Anstieg des Denaturierungsübergangs bzw. die Abhängigkeit von  $\Delta G$  von der Denaturierungsmittelaktivität;  $T$  die Temperatur (in K) und  $R$  ist die Gaskonstante mit  $8.31451 J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ .

Die Aktivität des Denaturierungsmittels bei der das Protein zu 50 % nativ und 50 % denaturiert vorliegt, ist  $D_{1/2}$  (in M) und wird beschrieben durch:

$$D_{1/2} = \frac{\Delta G_{H_2O}}{m} \quad 3\text{-XVI}$$

Aus den gefitteten Parametern von Gleichung 3-XV lässt sich die relative Fluoreszenz auf die 'Fraktion natives Protein' ( $F$ ) normieren, dabei entsprechen die Parameter von Gleichung 3-XVII denen von Gleichung 3-XV:

$$F = \frac{y - (y_U + m_U \cdot [D])}{(y_U + m_U \cdot [D]) - (y_U + m_U \cdot [D])} \quad 3\text{-XVII}$$

Die 'Fraktion natives Protein' ( $F$ ) kann nach Gleichung 3-XVIII angepasst werden um den  $\Delta G_{H_2O}$  (in  $J \cdot mol^{-1}$ ) und die Kooperativität  $m$  (in  $J \cdot mol^{-1} \cdot M^{-1}$ ) zu bestimmen.

$$F = \frac{y_0 + amp \cdot \exp - ((\Delta G_{H_2O} - m \cdot [D])/R \cdot T)}{(1 + \exp - ((\Delta G_{H_2O} - m \cdot [D])/R \cdot T))} \quad 3\text{-XVIII}$$

Hierbei beschreibt  $y_0$  den Schnittpunkt mit der  $y$ -Achse bzw. den Punkt bei dem das Protein vollständig nativ vorliegt, d.h.  $F = 1$ ;  $amp$  ist die Amplitude der Denaturierungskurve. Die weiteren Parameter entsprechen denen aus Gleichung 3-XV.

### 3.5.2.3. Reversibilität der Denaturierung

Die Reversibilität der Faltung bzw. Entfaltung ist Voraussetzung für die Auswertung unter 3.5.2.2 und muss unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen gewährleistet sein. Ausgangspunkt für die Reversibilitätsversuche ist denaturiertes Protein. Hierfür wurden die M7-Varianten in 2.7 M GdmSCN unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen entfaltet (16 h; 20 °C). Der Denaturierungsansatz enthielt 34  $\mu M$  Protein und entsprach in seiner Zusammensetzung dem

Beispiel in Tabelle 3.5.2.2- I (2.7 M GdmSCN; 50 mM Tris; mit bzw. ohne 5 mM TCEP; 1 mM EDTA; pH 7.0; 20 °C; N<sub>2</sub> überschichtet). Der Denaturierungsansatz wurde nach der Inkubation (16 h; 20 °C) mit Tris- und GdmSCN-Puffer gemischt um eine GdmSCN-Titration zu erhalten (0.5 M bis 3.0 M). Hierbei wurde für die einzelnen GdmSCN-Konzentrationen stets dasselbe Volumen ( $\approx 450 \mu\text{L}$ ) des Denaturierungsansatz (enthält Proteinstammlösung) eingesetzt, um die gleiche Proteinkonzentration ( $\approx 8 \mu\text{M}$ ) in den Ansätzen zu erzielen. Das Gesamtvolumen einer Probe betrug 1.9 mL. Die Ansätze enthielten 1 mM EDTA und entsprechend der Redoxbedingung wurden erneut 5 mM TCEP hinzugefügt bzw. weggelassen. Ein Beispiel für einen 1.4 M GdmSCN Ansatz ist in Tabelle 3.5.2.3- I gezeigt. Die Reversibilitätsansätze wurden bei 20 °C für 5 h (reduzierend; N<sub>2</sub> überschichtet) bzw. 11 h (oxidierend) inkubiert. Anschließend wurde die relative Fluoreszenz mit den gleichen Parametern und dem gleichem Vorgehen zur Behandlung der Küvette, wie unter 3.3.2 beschrieben, bestimmt. Die Anteile an reduzierter und oxidiertes Spezies wurden nach der Messung per rpHPLC überprüft (siehe 3.5.1.1.2).

**Tabelle 3.5.2.3- I: Reversibilitätsansatz (1.4 M GdmSCN\*; reduzierend)**

Stock	Konzentration Stocklösung	Volumen Stocklösung	Konzentration im Reversibilitätsansatz
Denaturierungsansatz	34 $\mu\text{M}$ Protein; 2.7 M GdmSCN; 5 mM TCEP	450 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{M}$ Protein; 0.6 M GdmSCN*; 1.2 mM TCEP
GdmSCN	3.1 M	503 $\mu\text{l}$	0.8 M*
TCEP	200 mM	48 $\mu\text{L}$	5 mM
EDTA	500 mM	4 $\mu\text{l}$	1 mM
Tris-Puffer	50 mM	895 $\mu\text{L}$	50 mM

\* 2.6 M GdmSCN im Reversibilitätsansatz (1.9 mL) entspricht der Summe der Volumina des GdmSCN-Stocks und des Denaturierungsansatzes

### 3.5.2.4. Überprüfung des Zwei-Zustandsmodells

Um zu überprüfen ob die Varianten dieser Arbeit sich entsprechend dem Zwei-Zustandsmodell unter Gleichgewichtsbedingungen verhalten, wurden Denaturierungsübergänge per Fluoreszenz- und per Circular dichroismus-Spektroskopie miteinander verglichen. Die Denaturierungstitration für beide Systeme wurde in GdmCl angefertigt (GdmSCN absorbiert im relevanten Bereich in der CD-Spektroskopie). Fluoreszenz und CD wurden parallel vermessen, d.h. es wurde pro GdmCl-Konzentration eine Probe (Gesamtvolumen 1.9 mL) angefertigt, die auf beide Systeme aufgeteilt wurde. Um Temperatur-Abweichungen zu minimieren, wurden beide Systeme mit einem externen, unabhängigen Thermometer auf 20 °C kalibriert. Auf Zwei-Zustands-Falter wurde sowohl unter reduzierenden (5 mM TCEP; N<sub>2</sub> überschichtet) und nicht reduzierenden Bedingungen getestet (Puffer siehe unten). Proben (Proteinkonzentration  $\approx 10 \mu\text{M}$ ) wurden bei 20 °C für 5 h (reduzierend; N<sub>2</sub> überschichtet) bzw. 18 h (n.-reduzierend) inkubiert. Die relative Fluoreszenz wurde mit den gleichen Parametern und dem gleichen Vorgehen zur Behandlung der Küvette, wie unter 3.3.2 beschrieben, bestimmt. Die CD-Spektroskopie bzw. die Sekundärstrukturänderungen wurden über die Elliptizität bei 220 nm [ $\theta_{220\text{nm}}$ ] verfolgt. Es wurde in einer 1 mm-Küvette mit folgenden Parametern gemessen: 1 nm Bandweite; 0.1 s Datenintegration; 40 s Messdauer; Dynodenspannung < 600 Volt. Die Elliptizität wurde als Kinetik (40 s) aufgezeichnet und deren Messpunkte gemittelt. Die Küvette wurde wie unter 3.5.1.3.1 behandelt.

Puffer verschiedener Messbedingungen:

reduzierend	50 mM Tris; 5 mM TCEP; 1 mM EDTA; pH 7.0; 20 °C; entgast
nicht reduzierend	50 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7.0; 20 °C

### 3.5.3. Kinetische Untersuchungen zur Redoxaktivität

Die Redoxaktivität beschreibt die Kinetik der Redoxreaktion (Reduktion und Oxidation) und ist damit die entscheidende Größe für biologische Prozesse. Die Redoxaktivität ist das Resultat einer Vielzahl an Parametern, wie z.B. dem Redoxpotential und der Sterik der Reaktion. Die kinetischen Untersuchungen sind maßgebend für die Einordnung, in welcher Qualität die Implementierung der CXXC-Sequenz in die M7-Struktur erfolgte. Nach folgenden Methoden wurden die Oxidations- und Reduktionskinetiken der CXXC-Varianten analysiert.

#### 3.5.3.1. Cysteinyl-pK<sub>a</sub>-Bestimmung mittels Stopped-Flow-Absorptions-Spektroskopie

Die pK<sub>a</sub>-Werte der Cysteine von CXXC-Proteinen und CXXC-Heptapeptiden wurden über die Kinetik ihrer Disulfidaustauschreaktion mit Ellman's Reagenz DTNB bestimmt. Je größer der Anteil an reaktiven Thiolat im CXXC-Motiv desto höher die Geschwindigkeitskonstante (*k*) der TNB<sup>2-</sup>-Freisetzung aus der stöchiometrischen Reaktion von Thiolat mit DTNB. Die TNB<sup>2-</sup>-Bildung wird photometrisch bei 412 nm verfolgt. Das Thiolat:Thiol-Verhältnis ist pH-Abhängig, wodurch der pK<sub>a</sub>-Wert der Cysteine in einer pH-Titration ermittelt werden kann. Die Kinetik wurde mittels Stopped-Flow-UV/Vis-Absorption Spektroskopie aufgezeichnet.

Für die Messung sollten möglichst alle Cysteine des Analyten (Proteine und Heptapeptide) reduziert vorliegen. Proteine wurden daher, wie in der Einführung von Kapitel 3.5 beschrieben, mit DTT reduziert. Die Dialyse zur Entfernung vom DTT fand in 200 mM NaCl-Lösung (ungepuffert) statt. Peptide sind nach ihrer Synthese (siehe 3.4) bereits vollständig reduziert und konnten direkt in 200 mM NaCl aufgenommen werden. Die Konzentration der Analyten wurde photometrisch bestimmt und auf eine 13 µM Analyten-Stocklösung verdünnt (200 mM NaCl; ungepuffert). Die pH-Titration wurde im Komplexpuffer (10 mM Borat; 10 mM Citrat; 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 200 mM NaCl) angefertigt und umfasste 25 - 30 pH-Werte. Es wurden 1.2 mL Analyt-Stock mit 1.6 mL Komplexpuffer (auf gewünschten pH eingestellt) gemischt. Mit 0.5 mL dieser gepufferten Analyt-Lösung wurden Spritze A (2.5 mL-Volumen) der Stopped-Flow-Anlage gespült und die Lösung verworfen. Danach wurde Spritze A mit der gepufferten Analyt-Lösung gefüllt. Dasselbe Prinzip von Spülen und Füllen galt für Spritze B (0.25 mL-Volumen), die die DTNB-Lösung (2 mM DTNB; 50 mM Natriumacetat; pH 7.0; 20 °C) enthielt. In der Messung wurde DTNB mit Analyt 1:10 gemischt. Im Messansatz liegen Analyt mit 5 µM bzw. 10 µM Thiol (der CXXC-Sequenz) und DTNB mit 180 µM vor. Die Parameter der Messung waren wie folgt: Absorptionsdetektion bei 412 nm; 20 µL-Quarzküvette; 1 cm Schichtdicke; Spalten 1 nm; Messzeit ≥ 200 s; 10 000 Messpunkte; logarithmische Datenaufzeichnung; 20 °C. Der Ablauf um einen pH-Wert zu vermessen, bestand aus: **a)** Spülen, **b)** neues Füllen; **c)** drei Leerläufe; **d)** 1. Messung; **e)** ein Leerlauf; dann **d)** und **e)** abwechselnd wiederholen bis die Probe aufgebraucht ist bzw. die Datenmenge ausreicht. Die Datenauswertung erfolgte in Pro-data SX. Die Einzelmessungen der pH-Werte wurden gemittelt und die Geschwindigkeitskonstanten nach einer biphasischen Reaktion pseudo-1. Ordnung (Gleichung 3-XIX) ermittelt, da DTNB im Überschuss vorliegt und theoretisch beide Cysteine des CXXC-Motivs reaktiv sind. Dies ist allerdings eine vereinfachte Annahme, da es sich bei den getesteten Analyten (Proteine,

Peptide) um dynamische Systeme handelt, die von vielen Faktoren beeinflusst werden<sup>135</sup>. Unter anderem sind sowohl die Analyten, als DTNB polyprotische Moleküle. Dies kann die Auswertung kinetischer Untersuchungen komplex gestalten<sup>135</sup>. Dennoch ist die folgende Auswertung, die in der Literatur geläufige.

$$y = y_0 + A_1 \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) + A_2 \cdot (1 - e^{-m \cdot t}) \quad 3\text{-XIX}$$

Hierbei ist  $y$  die gemessene Absorption bei 412 nm und  $y_0$  die initiale Absorption bei 412 nm,  $A_1$  und  $A_2$  sind die Amplituden der Einzylcysteine;  $k$  und  $m$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der beiden Cysteine in der Reaktion mit DTNB;  $t$  ist die Zeit.

Unter basischen Bedingungen ( $\text{pH} > 9$ ) tritt zusätzlich die Hydrolyse von DTNB durch Hydroxidionen auf, die ebenso TNB-Anionen freisetzt<sup>124</sup>. Diese zusätzliche Reaktion wurde durch eine Erweiterung von Gleichung 3-XIX durch den Term ( $k_0 \cdot t$ ) nach Miranda (2003)<sup>93</sup> berücksichtigt:

$$y = y_0 + A_1 \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) + A_2 \cdot (1 - e^{-m \cdot t}) + k_0 \cdot t \quad 3\text{-XX}$$

Die apparente 2. Ordnung Geschwindigkeitskonstante ( $k_2$  bzw.  $m_2$ ) der TNB<sup>2-</sup>-Freisetzung erhält man durch Division von  $k$  bzw.  $m$  durch die DTNB Konzentration (in Molar) nach Holmgren (1979)<sup>136</sup> bei jedem pH-Wert. Diese wird als konstant mit 0.18 mM angenommen. Die pH-Werte der einzelnen Messpunkte wurden separat per pH-Meter bestimmt. Dafür wurden die gleichen Ansätze verwendet, wie in der eigentlichen Stopped-Flow-Messung, allerdings ohne Analyt. Die so erhaltenen pH-Werte wurden gegen die Geschwindigkeitskonstanten ( $k_2$ ,  $m_2$ ) aufgetragen um die Cysteinyl-pK<sub>a</sub>-Kurve zu erhalten. Die Kurvenregression konnte zum Einen nach dem ein-pK<sub>a</sub>-Modell nach Roos *et al.* (2013)<sup>97</sup> (Gleichung 3-XXI) erfolgen um den einzelnen Geschwindigkeitskonstanten ( $k_2$ ,  $m_2$ ) jeweils den entsprechenden Cysteinyl-pK<sub>a</sub> zuzuordnen:

$$k_2 = k' \cdot \left( \frac{1}{1 + 10^{(\text{pK}_a - \text{pH})}} \right) \quad 3\text{-XXI}$$

Oder, für den Fall, dass sich durch Gleichung 3-XIX keine mathematische Auftrennung der beiden Cysteine ergab, wurden die pK<sub>a</sub>-Werte beider Cysteine aus der Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  ermittelt.  $k_2$  beschreibt somit die Gesamtreaktion der Cysteine. Dies galt, wenn nachweislich beide Cysteine in einem schnelleren Zeitfenster reagierten, als es durch den berechneten Wert für  $m$  möglich war. Hierbei waren die Geschwindigkeitskonstanten  $k_2 \gg m_2$  und die Amplituden  $A_1 \gg A_2$ . Die beiden pK<sub>a</sub>-Werte konnten aus  $k_2$  durch **i)** Gleichung 3-XXII nach Roos *et al.* (2013)<sup>97</sup> für das Zwei-pK<sub>a</sub>-Modell von sich beeinflussenden titrierbaren Gruppen oder **ii)** durch Gleichung 3-XXIII für das Zwei-pK<sub>a</sub>-Modell von unabhängigen titrierbaren Gruppen bestimmt werden:

$$k_2 = k' \cdot \left( \frac{1}{1 + 10^{(\text{pK}_{a1} - \text{pH})}} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 + 10^{(\text{pK}_{a2} - \text{pH})}} \right) + k'' \cdot \left( \frac{1}{1 + 10^{(\text{pK}_{a2} - \text{pH})}} \right) \quad 3\text{-XXII}$$

$$k_2 = k' \cdot \left( \frac{1}{1 + 10^{(\text{pK}_{a1} - \text{pH})}} \right) + k'' \cdot \left( \frac{1}{1 + 10^{(\text{pK}_{a2} - \text{pH})}} \right) \quad 3\text{-XXIII}$$

$k'$  und  $k''$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der 2. Ordnung-Disulfidaustauschreaktionen der beiden Cysteine.

### 3.5.3.2. Die Redoxkinetik der Varianten mit DTT

Um die Cysteinyl-Reaktivität der Redoxvarianten zu untersuchen, wurden diese sowohl auf ihre Oxidationsstärke gegenüber reduzierten DTT (DTT<sub>RED</sub>) als auch auf ihre Reduktionskraft gegenüber oxidierten DTT (DTT<sub>OX</sub>) getestet. Die Reduktionskinetik wurde mit verschiedenen Konzentrationen DTT<sub>RED</sub> (10 mM; 1 mM; 250 µM) und unterschiedlichen Temperaturen (20 und 30 °C) unter Stickstoff-Begasung bei pH 7.0 aufgenommen. Es wurden im Ansatz 20 µM Protein bzw. Peptid eingesetzt (Tabelle 3.5.3- I), die vor Beginn oxidiert wurden (siehe 3.5). Die Oxidationskinetik durch DTT<sub>OX</sub> konnte nur bei einer Bedingung getestet werden. Proteine und Peptide lagen hierfür reduziert vor (siehe 3.5). Im Versuch wurden 20 µM reduzierte Redoxvariante mit 80 mM DTT<sub>OX</sub> (Tabelle 3.5.3- I) bei 30 °C unter Stickstoff-Zufuhr inkubiert. Die Redoxansätze hatten ein Gesamtvolumen von 3 mL. In minütlichen Zeitabständen wurden 270 µL Probe aus dem Ansätzen entnommen und zum Quenchen der Reaktion mit 30 µL 200 mM HCl (20 bzw. 30 °C) vermischt. Die Analyse und Quantifizierung aller Spezies (DTT<sub>OX; RED</sub>; Redoxvariante<sub>OX; RED</sub>) erfolgte für jeden Zeitpunkt nach 3.5.1.2 über rpHPLC. Es wurden auf diese Weise nur vollständig oxidierte bzw. reduzierte Spezies detektiert, keine gemischten Disulfide. Der Anteil oxidiertes bzw. reduzierter Spezies der Variante zu jedem Zeitpunkt  $[A(t)]$  wurde bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die hier beobachteten Redoxreaktionen bestehen stets aus zwei Teilreaktionen (Abbildung 1.3- II), die Erste führt zum gemischten Disulfid und die Zweite zur Trennung dessen. Bei der ersten Reaktion handelt es sich immer um eine Überschussreaktion eines Reaktanten (Reaktion pseudo-1. Ordnung). Die Trennung des gemischten Disulfids ist eine intramolekulare Reaktion 1. Ordnung. Daher wurden die Progresskurven nach doppelt pseudo-1. Ordnung ausgewertet (Gleichung 3-XXIV):

$$A = A_0 + B_{max} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) + C_{max} \cdot (1 - e^{-l \cdot t}) \quad 3-XXIV$$

Hierbei ist  $A$  der Anteil oxidiertes bzw. reduzierter Spezies der Variante zum Zeitpunkt ( $t$ ) und  $A_0$  ist die Menge an  $A$  zum Startzeitpunkt;  $B_{max}$  und  $C_{max}$  sind die Amplituden der Reaktionen;  $k$  und  $l$  sind die Geschwindigkeitskonstanten von Oxidation bzw. Reduktion;  $t$  ist die Zeit.

**Tabelle 3.5.3- I: Reduktions- und Oxidationsansatz**

Stock	Konzentration im	
	Reduktionsansatz	Oxidationsansatz
Protein	20 µM	20 µM
DTT <sub>OX</sub> (entgast)	/	80 mM
DTT <sub>RED</sub> (entgast)	250 µM, 1 mM oder 10 mM	/
EDTA	1 mM	1 mM
PBS-Puffer, pH 7.0 (entgast)	restliche Volumen auf 3 mL	restliche Volumen auf 3 mL

### 3.5.4. Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie

Die Interpretation von Redoxpotential, Redoxaktivität und thermodynamischer Stabilität stehen in direktem Zusammenhang mit der räumlichen Struktur des Proteins. In dieser Arbeit sollte die Sekundär- und Tertiärstruktur mittels NMR (Nuclear Magnetic Resonance bzw. Kernspinresonanz) gelöst werden. Zwei Varianten (M7<sub>D123</sub>; M7<sub>D126</sub>) wurden hierfür heteronuklear (<sup>15</sup>N; <sup>13</sup>C) markiert (siehe 3.2) und sowohl in ihrer reduzierten als auch oxidierten Form untersucht. Die Proben enthielten 650 µM Protein in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.05 % Natriumazid; 8 % D<sub>2</sub>O und 15 µM DSS-d<sub>6</sub> zur Referenzierung. Reduzierende Bedingungen wurden durch die Gegenwart von 10 mM deuterierten

DTT im Ansatz erzeugt. In den Messungen wurde sowohl Temperatur (20 bis 40 °C) als auch pH (3.0 und 10.0) variiert. Die NMR-Spektroskopie und die Auswertung wurden von S. Gröger und M. Baumann (AG Balbach; Institut für Physik der MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Die Zweidimensionale  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Methode (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) wurde für die Überprüfung der strukturellen Integrität der Proteine genutzt und um strukturelle Unterschiede bei den unterschiedlichen Messbedingungen zu erkennen. Es wurde die fHSQC-Impulsfolge (inklusive WATERGATE-Sequenz) verwendet. Die Spektren bestanden durchschnittlich aus 8 Scans (1 400 x 400 Datenpunkten). Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde von diesen per *zero filling* verbessert. Als Gewichtungsfunktion wurde eine  $\cos^2$ -Funktion eingesetzt.

Die Zuordnung von Aminosäureresten und entsprechenden Kreuzsignalen in den HSQC-Spektren erfolgte durch 3D-Experimente mit doppelmarkiertem Protein ( $^{13}\text{C}$ ;  $^{15}\text{N}$ ). Die 3D-Spektren zur Sequenz-Zuordnung setzten sich aus folgenden Experimentpaaren zusammen:

- i)  $\text{HNC}_\alpha$  +  $\text{HN}(\text{CO})\text{C}_\alpha$
- ii)  $\text{HNCO}$  +  $\text{HN}(\text{C}_\alpha)\text{CO}$
- iii)  $\text{HN}(\text{CO})\text{C}_\alpha\text{C}_\beta$  +  $\text{HNC}_\alpha\text{C}_\beta$

Die Bezeichnungen (i-iii) geben den Magnetisierungsverlauf im Experiment an, dabei wird der Kern in Klammern nicht abgebildet. Für ein gegebenes NH (Rest x) erhält man den Zusammenhang der chemischen Verschiebungen der  $\text{C}_\alpha$  und  $\text{C}_{\alpha+1}$  (i); der Carbonyl  $\text{CO}_x$  und  $\text{CO}_{x+1}$  (ii); sowie der  $\text{C}_\alpha$  und  $\text{C}_{\alpha+1}$  und der  $\text{C}_\beta$  und  $\text{C}_{\beta+1}$  (iii). Alle 3D-Experimente bestanden durchschnittlich aus 2 048 ( $^1\text{H}$ ) x 64 ( $^{15}\text{N}$ ) x 128 ( $^{13}\text{C}$ ) Datenpunkten, die per *zero filling* und  $\cos^2$  Gewichtungsfunktion überarbeitet wurden.

Talos+ und CSI3.0 wurde genutzt um anhand ermittelter chemischer Verschiebungen Sekundärstrukturelemente zu identifizieren.

Um strukturelle Unterschiede zwischen beiden Redoxzuständen oder zwischen den Varianten aufzuzeigen, wurden die chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäurereste direkt miteinander über die Wichtungsfunktionen von Grzesiek *et al.*<sup>137</sup> verglichen. Der Vergleich bezog sich zum einen auf die durchschnittliche chemische Verschiebung der Amid  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kerne ( $\Delta_{\text{av}(\text{NH})}$ ) nach Gleichung 3-XXV:

$$\Delta_{\text{av}(\text{NH})} = \left[ \frac{(\Delta\delta_{\text{HN}})^2 + \frac{(\Delta\delta_{\text{N}})^2}{25}}{2} \right]^{0.5} \quad 3\text{-XXV}$$

oder auf die durchschnittliche chemische Verschiebung ( $\Delta_{\text{av}}$ ) der  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}^{\text{N}}$ ,  $^{13}\text{C}_\alpha$  und  $^{13}\text{C}_\beta$  nach Gleichung 3-XXVI:

$$\Delta_{\text{av}} = \left[ \frac{(\Delta\delta_{\text{HN}})^2 + \frac{(\Delta\delta_{\text{N}})^2}{25} + \frac{(\Delta\delta_{\text{C}_\alpha})^2}{4} + \frac{(\Delta\delta_{\text{C}_\beta})^2}{4}}{4} \right]^{0.5} \quad 3\text{-XXVI}$$

Hierbei sind für jeden zugeordneten Aminosäurerest  $\Delta\delta$  die Differenzen der chemischen Verschiebung zwischen beiden Redoxzuständen. Die  $\Delta\delta$ -Werte stammen von den Kernen der Amid Stickstoffe  $^{15}\text{N}$  ( $\Delta\delta_{\text{N}}$ ), der Amidprotonen  $^1\text{H}^{\text{N}}$  ( $\Delta\delta_{\text{HN}}$ ) und der Kohlenstoffkerne  $^{13}\text{C}_\alpha$  ( $\Delta\delta_{\text{C}_\alpha}$ ),  $^{13}\text{C}_\beta$  ( $\Delta\delta_{\text{C}_\beta}$ ).

### 3.5.5. HistidinyI-pK<sub>a</sub>-Bestimmung mittels NMR-Spektroskopie

Um speziell aromatische Reste in der NMR-Spektroskopie zu untersuchen, wurden aromatische HSQC-Spektren aufgenommen, bei denen die Protonen mit den Kohlenstoffatomen der aromatischen Ringe koppeln. Die HSQC-Spektren wurden entsprechend dem Vorgehen aus Kapitel 3.5.4. aufgenommen und prozessiert. Ziel war es selektiv Histidin anzuregen und dadurch den pK<sub>a</sub>-Wert der Imidazol-Seitenkette zu bestimmen. Dafür wurden <sup>13</sup>C-HSQC-Spektren bei zwölf pH Werten von pH 3 bis 10 in Komplexpuffer (10 mM Borat; 10 mM Citrat; 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) aufgenommen. Aus der chemischen Verschiebung ( $\delta$ ) in Abhängigkeit zum pH-Wert konnte der pK<sub>a</sub>-Wert nach Gleichung 3-XXVII bestimmt werden<sup>138</sup>.

$$\delta = \delta_0 + \frac{\delta_{\max} - \delta_0}{1 + 10^{[\text{pH} - \text{pK}_a]}} \quad 3\text{-XXVII}$$

Hierbei ist  $\delta_0$  die chemische Verschiebung (in ppm) des protonierten Histidins und  $\delta_{\max}$  die chemische Verschiebung (in ppm) des deprotonierten Zustands.

Die pH-Titration, die NMR-Spektroskopie und die Auswertung wurden von S. Gröger und M. Baumann (AG Balbach; Institut für Physik der MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit ist es das Strukturprotein M7 mit der CXXC-Sequenz von Oxidoreduktasen auszustatten. Dabei soll untersucht werden, wie die Struktur das Redoxpotential der implementierten Cysteine beeinflusst und umgekehrt, welchen Einfluss die CXXC-Sequenz und ihr Redoxzustand auf die entsprechende M7-Variante haben. Desweiteren stellt sich die Frage, ob auch eine Redoxaktivität generiert werden kann, das heißt: besitzt das neue Redoxprotein ähnliche kinetische Eigenschaften wie natürliche Oxidoreduktasen oder verhält es sich ähnlich wie das isolierte CXXC-Peptid?

### 4.1. Design von M7-Redoxvarianten und deren Nomenklatur

Das M7-Protein besitzt eine sehr hohe Stabilität ( $80 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )<sup>6</sup> und sollte sich damit eignen, Mutationen zu tolerieren. Desweiteren ist das lösliche Monomer (11 kDa) in hoher Konzentration rekombinant produzierbar ( $\approx 1 \text{ mM}$ ), wodurch Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie möglich ist<sup>30</sup>. Die CXXC-Tetrapeptidsequenz sollte in M7 so positioniert werden, dass eine möglichst vergleichbare Umgebung der CXXC-Sequenz, wie in den natürlichen Oxidoreduktasen vorliegt. Wie in der Einleitung beschrieben, befindet sich das CXXC-Tetrapeptid stets am N-Terminus von  $\alpha$ -Helices (Abbildung 1.6- II). Das katalytische Cystein nimmt dabei die N-Cap Position ein und das C-terminale Cystein ist vom Lösungsmittel abgeschirmt in der Proteinstruktur verborgen. M7 weist eine ähnliche Situation am N-Terminus von  $\alpha_1$ -Helix auf (Abbildung 0- I). Dabei gründet die Implementierung auf rationalen Überlegungen und wurde nicht mittels Molekül-Dynamiken im Vorfeld simuliert. Die Konformation des Peptidrückgrats am N-Terminus von  $\alpha_1$ -Helix in M7(wt) ähnelt in ihren Dieederwinkeln ( $\Psi$ ,  $\Phi$ ) denen von Thioredoxin und DsbA (Anhang Tabelle 7.2- I). Die N-Cap-Position und der vorangehende Loop zeigen größere Abweichungen in den Dieederwinkeln. Es wurden daher verschiedene Varianten um die N-Cap-Position von  $\alpha_1$ -Helix in M7 (Lys<sub>25</sub>) erzeugt, um eine möglichst große strukturelle Breite im M7-Protein abzudecken, die bestenfalls die bestehende M7-Helix durch das CXXC-Peptid ergänzt und somit ein N-Cap positioniertes Cystein erzeugt. Das CXXC-Tetrapeptid wurde über Substitution und Insertion in M7 kloniert

Tabelle 4.1- I: Variantenübersicht

	Variante	Sequenzausschnitt
<b>Wildtyp-Proteine</b>		
1	M7	-V <sub>21</sub> -S <sub>22</sub> -T <sub>23</sub> -G <sub>24</sub> -K <sub>25</sub> -E <sub>26</sub> -L <sub>27</sub> -E <sub>28</sub> -R <sub>29</sub> -
2	Thioredoxin*	-W-A-T-W-C-G-P-C-K-M-V-A-
3	DsbA	-F-S-F-F-C-P-H-C-Y-Q-F-E-
<b>Insertions-Proteine</b>		
4	M7 <sub>Di23</sub>	-V-S <sub>22</sub> -C-P-H-C-T-G-K-E-L-E-R-
5	M7 <sub>Di24</sub>	-V-S-T <sub>23</sub> -C-P-H-C-G-K-E-L-E-R-
6	M7 <sub>Di25</sub>	-V-S-T-G <sub>24</sub> -C-P-H-C-K-E-L-E-R-
7	M7 <sub>Di26</sub>	-V-S-T-G-K <sub>25</sub> -C-P-H-C-E-L-E-R-
8	M7 <sub>Di26</sub> - CPHS	-V-S-T-G-K <sub>25</sub> -C-P-H-S-E-L-E-R-
9	M7 <sub>Di26</sub> - SPHC	-V-S-T-G-K <sub>25</sub> -S-P-H-C-E-L-E-R-
10	M7 <sub>Di26</sub> - SPHS	-V-S-T-G-K <sub>25</sub> -S-P-H-S-E-L-E-R-
11	M7 <sub>Ti26</sub>	-V-S-T-G-K <sub>25</sub> -C-G-P-C-E-L-E-R-
<b>Substitutions-Proteine</b>		
12	M7 <sub>D23</sub>	-V-S <sub>22</sub> -C-P-H-C-L-E-R-
13	M7 <sub>D24</sub>	-V-S-T <sub>23</sub> -C-P-H-C-E-R-
14	M7 <sub>D25</sub>	-V-S-T-G <sub>24</sub> -C-P-H-C-R-
15	M7 <sub>T23</sub>	-V-S <sub>22</sub> -C-G-P-C-L-E-R-
16	M7 <sub>T24</sub>	-V-S-T <sub>23</sub> -C-G-P-C-E-R-
17	M7 <sub>T25</sub>	-V-S-T-G <sub>24</sub> -C-G-P-C-R-
<b>CXXC-Peptide</b>		
18	DsbA <sub>4</sub>	Ac-C-P-H-C-NH <sub>2</sub>
19	Trx <sub>4</sub>	Ac-C-G-P-C-NH <sub>2</sub>
20	DsbA <sub>7</sub>	Ac-A-C-P-H-C-A-Y-NH <sub>2</sub>
21	Trx <sub>7</sub>	Ac-A-C-G-P-C-A-Y-NH <sub>2</sub>
22	Di23-Peptid	Ac-V-S-C-P-H-C-T-G-NH <sub>2</sub>
23	Di25-Peptid	Ac-T-G-C-P-H-C-K-E-NH <sub>2</sub>
24	Di26-Peptid	Ac-G-K-C-P-H-C-E-L-NH <sub>2</sub>

\* - Trx(wt) wurde weder präpariert noch analysiert

Farbcodierung Proteinvarianten: Schwarz - Loop-Reste; Blau -  $\alpha$ -helikale Reste; Orange - CXXC-Sequenz (ebenfalls Peptide) bzw. Serinmutanten

(Tabelle 4.1- I). Es wurden Varianten erzeugt, die die CXXC-Sequenz sowohl in der Loopregion (schwarze Färbung in Tabelle 4.1- I), als auch an und in der  $\alpha$ -Helix von M7(wt) (blaue Färbung) tragen. Die Nomenklatur der elf Proteinvarianten (Tabelle 4.1- I) ergibt sich stets aus dem **M7**-Wildtyp Protein. Dem folgend wird der Ursprung des implementierten CXXC-Tetrapeptid genannt: **D**sbA CPHC = **D** bzw. **T**hioredoxin (Trx) CGPC = **T**. Das kleine 'i' steht für die Mutationsmethode 'Insertion'. Substitutionsvarianten hingegen werden nicht extra abgekürzt. Die abschließende Nummer im Namen gibt die Position des N-terminalen Cysteins ( $C_1$ ) aus dem  $C_1XXC_2$  Tetrapeptid in der Aminosäuresequenz der Variante an. Um die Wechselwirkung von CXXC-Sequenz und Proteinstruktur besser zu verstehen, wurden als Referenz sieben CXXC-Peptide hergestellt. Fünf Peptide beinhalteten das DsbA CPHC-Peptid und für zwei bildet die CGPC-Sequenz von Thioredoxin die Basis. Drei der DsbA-Peptide sind variantenspezifische Oktapeptide (Di23-, Di25-, Di26-Peptid), d.h. N- und C-terminal der CPHC-Sequenz befinden sich je zwei Reste entsprechend der Sequenz der M7-Variante. Desweiteren wurden die isolierten CXXC-Tetrapeptide (DsbA<sub>4</sub>; Trx<sub>4</sub>) synthetisiert, sowie sequenzunspezifische Heptapeptide (DsbA<sub>7</sub>; Trx<sub>7</sub>) hergestellt, die ein Tyrosin zur Quantifizierung aufweisen. Durch die Alanine in den Heptapeptiden sollte eine weniger polare Umgebung um das CXXC-Tetrapeptid erzeugt werden. Damit die Ladungsverhältnisse an den Peptidenden besser denen in Proteinen entsprechen, wurden diese N-terminal acetyliert (Ac-) und C-terminal amidiert (-NH<sub>2</sub>). Eine Übersicht aller Varianten und ihre biophysikalischen Parameter, sowie ihre Sequenzen finden sich im Anhang (siehe 7.3).

#### 4.2. Präparation der M7-Redoxvarianten

Die Proteinproduktion erfolgte, wie unter 3.2.3 beschrieben, standardisiert in *E. coli* und LB-Medium. Variation der Kultivierungstemperatur (20, 30, 37 °C) und -dauer (4 h, 16 h) führten zu keiner wesentlichen Verbesserung oder Verschlechterung der Proteinausbeute (mg Protein pro g Biofeuchtmasse) der jeweiligen Insertionsvariante (Daten nicht gezeigt). Für alle Insertionsvarianten wurden ausreichende Proteinmengen (Tabelle 4.2- I) und -konzentrationen erreicht. Substitutionsvarianten zeigten höhere Ausbeuten, wenn bei geringerer Temperatur produziert wurde. Dennoch schwankten Proteinausbeuten erheblich innerhalb von Chargen einzelner Varianten, sowie im Vergleich der Varianten untereinander. Expressionsdaten (nicht gezeigt) lassen vermuten, dass Substitutionsvarianten im Verhältnis zu Insertionsvarianten entweder instabiler sind und in der Zelle abgebaut werden, oder dass die Proteinvarianten negativ auf die Zellphysiologie wirken und damit die Proteinsynthese oder das Zellwachstum beeinträchtigt werden. Lediglich zwei von sechs Substitutionsvarianten (M7<sub>T23</sub> und M7<sub>D23</sub>) konnten in verwertbaren Mengen erhalten werden (Tabelle 4.2- I). Optimierungsversuche hinsichtlich der Reinigungspuffer (TrisHCl; PBS;  $\pm$  Glycerin), -parameter (T = 4 oder 20 °C; pH 4.0/6.5/7.0/7.5/8.0; Reduzierend/Oxidierend) und im Präparationsablauf ( $\pm$  Hitzefällung [45 bis 85 °C];  $\pm$  His-tag Spaltung;  $\pm$  Anion-/Kationenaustauschchromatografie; Ni<sup>2+</sup> / Zn<sup>2+</sup> IMAC;  $\pm$  Protaminsulfatfällung;  $\pm$  Hydrophobe Interaktionschromatografie) führten zu keiner relevanten Ausbeutensteigerung. Im

**Tabelle 4.2- I: Proteinausbeuten**

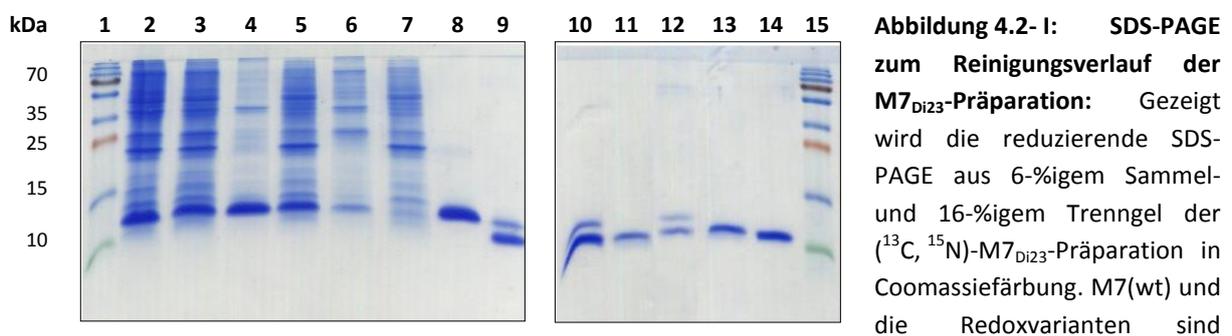
Variante	Ausbeute (mg Protein/g BFM)
<b>M7</b>	1.7
<b>M7</b> <sub>Di23</sub>	1.1
<b>M7</b> <sub>Di24</sub>	1.3
<b>M7</b> <sub>Di25</sub>	1.5
<b>M7</b> <sub>Di26</sub>	1.6
<b>M7</b> <sub>Ti26</sub>	1.7
<b>M7</b> <sub>D23</sub>	0.8
<b>M7</b> <sub>D24</sub>	0.2
<b>M7</b> <sub>D25</sub>	< 0.1
<b>M7</b> <sub>T23</sub>	0.4
<b>M7</b> <sub>T24</sub>	< 0.1
<b>M7</b> <sub>T25</sub>	0.2

Fälle der Nicht-Spaltung des Hexa-Histidin-tags wurden auf Grund weniger Reinigungsschritte zwar höhere Ausbeuten erzielt, allerdings erwies sich monomeres Protein mit His<sub>6</sub>-tag als unbeständiger bei höherer Konzentration (Präzipitation während Konzentrierungsversuchen (siehe 3.2.6)). Zudem zeigten His<sub>6</sub>-M7-Varianten eine unerwartete Absorption im Bereich < 340 nm (siehe 4.2.2). Desweiteren zeigten alle M7-Varianten, M7(wt) inbegriffen, die Tendenz zur Oligomerisierung (≥ Dimer). Die Oligomerisierung war nicht kovalenter Natur bzw. wurde nicht über intermolekulare Disulfidbrücken vermittelt (Daten nicht gezeigt). Das Ziel der Proteinreinigung war es daher, vollständig tag-freies monomeres Protein in millimolarer Konzentration herzustellen, wodurch der Variantenpool zur biophysikalischen Charakterisierung (siehe 4.3) hauptsächlich von den Insertionsvarianten gestellt wurde.

#### 4.2.1. Reinigungsverlauf

Die Proteinreinigung wird am Beispiel von doppelmarkiertem (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N)-M7<sub>Di23</sub> gezeigt, das im Minimalmedium produziert wurde. Im Folgenden wird die Proteinpräparation prinzipiell dargestellt und ist im Detail unter 3.2.4. bis 3.2.6 nachzulesen. Der Reinigungsverlauf kann anhand des Übersichtsgels (Abbildung 4.2- I) nachvollzogen werden. Die Proteinbiosynthese ergab 25 g BFM aus 5 L Kulturvolumen. Bei M7 und den Redoxvarianten handelt es sich um thermophile Proteine, weshalb die gesamte Proteinpräparation zwischen 18 und 24 °C (RT) stattfand. Das Zellpellet wurde entsprechend 3.2.4 durch die Kombination von **i)** Inkubation mit Lysozym (1 h: RT) und **ii)** Hochdruckdispersion aufgeschlossen (**Spur 2**). Ungefähr die Hälfte des Zielproteins verbleibt im Pellet (**Spur 4**) als unlösliche Fraktion. Renaturierungsversuche wurden für keine der M7-Varianten durchgeführt. Nur die lösliche Fraktion wurde weiter prozessiert. Ein Teil an Fremdproteinen konnte aus dem Überstand des Zellaufschlusses (**Spur 3**) durch Hitzedenaturierung (50 °C; 20 min) abgetrennt werden (**Spur 6**). Mittels Western Blot konnte der vollständige Verbleib des Zielproteins in der löslichen Phase bei 50 °C bestätigt werden (**Spur 5**). Zur Hydrolyse der Nukleinsäure folgte die Inkubation mit Benzonase® (2h; RT). Im Anschluss wurde die Proteinlösung mit 20 mM Imidazol und 150 mM NaCl versetzt, filtriert (0.45 µm) und auf eine Ni<sup>2+</sup>-IMAC (5 mL CV) geladen, die das Zielprotein über die His-tag-Fusion bindet (**Spur 7**). Das Zielprotein wurde auf der IMAC gewaschen, bis erneut die Baseline erreicht wurde (Anhang Abbildung 7.4- II-A). Es folgte im Stufengradient **i)** ein Waschschriff mit 63 mM Imidazol und **ii)** die Elution des fast bandenreinen Zielproteins bei 330 mM Imidazol (**Spur 8**). Zur Abspaltung des His<sub>6</sub>-tags wurde die Elutionsfraktion mit Thrombin versetzt und gegen imidazolfreien Puffer dialysiert (dreimal 1.5 L á 8 h; RT). Die His-tag-Abspaltung war trotz unterschiedlicher Bedingungen, wie verschiedener Puffer (weniger Salz, TrisHCl-, PBS-Puffer, ± Glycerin), variierte Inkubationszeit und -temperatur, nie vollständig (**Spur 9** bzw. **10**): ca. 20 - 30 % wurden nicht gespalten. Um homogene His-tag-freie Proben zu erhalten, wurde der Spaltungsansatz über einen zweiten IMAC-Schritt aufgetrennt. Hierfür wurde der Ansatz mit 40 mM Imidazol versetzt. Bei dieser Imidazolkonzentration sollten ausgehend vom 1. Waschschriff der 1. IMAC (63 mM Imidazol) jegliche Verunreinigung und das Fusionsprotein auf der Säule binden und nur das His-tag-freie Protein im Durchfluss (40 mM Imidazol) verbleiben (**Spur 11**). Dabei traten Verluste an gespaltenem Zielprotein in der Elutionsfraktion des zweiten IMAC-Schritts auf (**Spur 12**), die der geringen Imidazolkonzentration geschuldet waren. Die Wertfraktion wurde mit DTT (5 mM) reduziert (2 h bei RT), um mögliche Modifikationen der Cysteine zu entfernen und Disulfidbrücken aufzutrennen. Der Ansatz wurde anschließend gegen EDTA-Puffer dialysiert (dreimal 1.5 L á 12 h; RT). Das EDTA sollte divalente Metallionen entfernen, die mit den CXXC-Resten in der reduzierten Form

interagieren könnten. Zudem oxidierten die Cysteine während der Dialyse zu intramolekularen Disulfidbrücken. Abschließend erfolgte die Separation vom monomeren (**Spur 14**) und dimeren Zielprotein (**Spur 13**) über Gelfiltration (120 mL CV) (Anhang Abbildung 7.4- II-B). Variantenabhängig, vor allem bei den Substitutionsvarianten, traten z.T. große Oligomerfraktionen auf. Die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung verläuft dabei nicht über die Cysteine. Reduzierende Bedingungen durch TCEP hatten keinen Einfluss auf die Dimerisierung, wie über analytische Ultrazentrifugation nachgewiesen (W. Hannemann (2017)<sup>110</sup>). Die Reinheit der Monomerfraktion wurde zusätzlich über Massenspektrometrie (siehe 3.2.7.5) bestätigt (Anhang Abbildung 7.4- III) und wird im folgenden Kapitel (siehe 4.2.2) tiefergehend thematisiert. Die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Einfrieren bzw. Auftauen; Dialysen im Zeitraum von 14 Tagen und Konzentrierung über Zentrifugalkonzentratoren führten nicht zur Dimerisierung der Varianten, die für die biophysikalische Charakterisierung eingesetzt wurden.

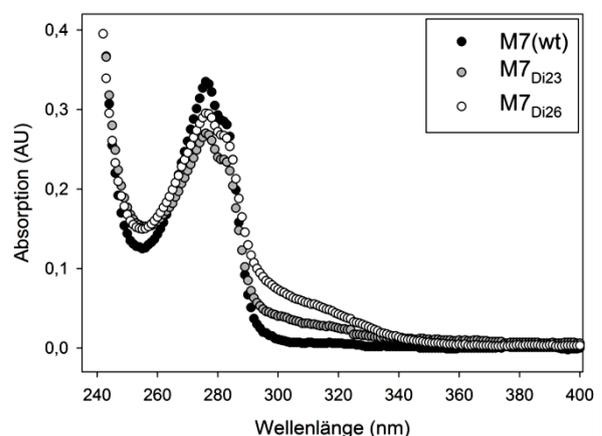


**Abbildung 4.2- I: SDS-PAGE zum Reinigungsverlauf der  $\text{M7}_{\text{Di}23}$ -Präparation:** Gezeigt wird die reduzierende SDS-PAGE aus 6-%igem Sammel- und 16-%igem Trenngel der ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )- $\text{M7}_{\text{Di}23}$ -Präparation in Coomassiefärbung.  $\text{M7}(\text{wt})$  und die Redoxvarianten sind

$\approx 11$  kDa groß. (1) Marker; (2) Zellaufschluss; (3) Überstand Zellaufschluss; (4) Pellet Zellaufschluss; (5) Überstand Hitzefällung; (6) Pellet Hitzefällung; (7) 1. IMAC Durchfluss; (8) 1. IMAC Elution; (9) und (10) *His-tag*-Abspaltung; (11) 2. IMAC Durchfluss; (12) 2. IMAC Elution; (13) SEC  $\text{M7}_{\text{Di}23}$  Dimer; (14) SEC  $\text{M7}_{\text{Di}23}$  Monomer; (15) Marker. Das rechte Gel stellt einen Ausschnitt dar. Das vollständige Gel ist im Anhang Abbildung 7.4- I hinterlegt.

#### 4.2.2. Der Reinheitsgrad der Redoxvarianten

Die Integrität der Redoxvarianten ist entscheidend für jegliche biophysikalische Charakterisierung. Anhand der SDS-PAGE (Abbildung 4.2- I) lässt sich erkennen, dass bandenreines Protein aus der Proteinreinigung erhalten wurde. Allerdings besitzt die SDS-PAGE von gereinigten  $\text{M7}$ -Varianten meist wenig Aussagekraft. Auf Grund der hohen Proteinstabilität können sich Denaturierungsartefakte bilden, die als zusätzliche Banden oder als Schmier im Gel erscheinen. Allerdings eignen sich spektroskopische Methoden zum Nachweis von Verunreinigung, da das  $\text{M7}(\text{wt})$  Protein und all seine Redoxvarianten nur ein Tyrosin besitzen. Fluoreszenzspektren (siehe 3.2.7.3) zeigten nach der Proteinreinigung keinerlei Anteil an Tryptophan-Fluoreszenz durch Fremdproteine



**Abbildung 4.2.2- I: Absorptionsspektren von  $\text{M7}(\text{wt})$ ,  $\text{M7}_{\text{Di}23}$  und  $\text{M7}_{\text{Di}26}$  nach der Proteinreinigung.** Die Spektren wurden um ihr Puffersignal korrigiert und sind nicht normiert.

(Anhang Abbildung 7.4- IV). In der UV/Vis-Absorptions-Spektroskopie besaßen alle CXXC-M7-Varianten eine ungewöhnlich erhöhte Absorption bei  $> 290$  nm, beispielhaft in Abbildung 4.2.2- I für M7<sub>Di23</sub> und M7<sub>Di26</sub> gezeigt. Die zusätzliche Absorption wurde nicht durch die Absorption der Disulfidbrücke verursacht, da Disulfidbrücken  $> 290$  nm nicht absorbieren<sup>139,140</sup>.

Folglich führte die Reduktion von oxidiertem Protein zu keiner Absorptionsänderung  $> 290$  nm (Daten nicht gezeigt). Eine Ursache könnte Lichtstreuung durch Aggregation sein. Ultrazentrifugation (200 000 x g; 1 h) führte allerdings ebenso nicht zur Verbesserung des Spektrums. Eine Verringerung des unbekanntes Signals wurde durch das Entfernen des nicht-gespaltenen His-*tag*-Fusionsproteins über einen zweiten IMAC-Schritt erreicht. Eine Dialyse gegen 10 mM EDTA/EGTA-Puffer über 14 Tage verringerte zudem das Absorptionssignal um ca. 30 % (Anhang Abbildung 7.4- V). Atomspektroskopie von M7<sub>Di26</sub> vor der genannten EDTA/EGTA-Dialyse zeigte, dass lediglich 3 % der Proteine jeweils Zn<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden. Weitere Metallionenbindungen durch das Protein wurden nicht nachgewiesen. Eine Chelatierung von Metallionen durch die CXXC-Sequenz kann ausgeschlossen werden, weil die Cysteine der CXXC-Sequenz für die Atomspektroskopie voll oxidiert vorlagen und kein Thiolat zur Me<sup>2+</sup>-Komplexierung zur Verfügung stand. Hierbei ist anzumerken, dass das dialysierte M7<sub>Di26</sub>-Protein nicht über eine zweite IMAC gereinigt wurde und somit His-*tag*-fusionierte Spezies vorlag. Damit kommt der His-*tag* für die Metallionenbindung in Frage. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass verbleibendes His-*tag*-M7<sub>Di26</sub> während der 14-tägigen EDTA/EGTA-Dialyse präzipitierte und sich dadurch die Absorption  $< 290$  nm verringerte.

Dennoch scheint das zusätzliche Absorptionssignal in Verbindung mit den Cysteinen der CXXC-Sequenz zu stehen, im speziellen mit dem C-terminalen Cystein, da nur die SXXC-Variante der Serinmutanten weiterhin die unerwartete Absorption zeigt<sup>110</sup>. Sowohl der M7(wt), die Doppel-Serin-Mutante<sup>110</sup> und die CPHS-Variante<sup>110</sup> liefern die gewöhnliche Tyrosin-Absorption (Anhang Abbildung 7.4- VI). Das zusätzliche Absorptionssignal konnte durch gründliche His-*tag*-Abtrennung und die EDTA-Dialyse stark verringert werden (um  $\approx 80$  % bei 310 nm). Soweit scheint an der Signal-Entstehung sowohl der His-*tag*, als auch das C-terminale Cystein beteiligt zu sein. In Anbetracht des geringen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{280\text{nm}} = 1\,227$ ) der M7-Varianten scheint die Signalursache ein gering populiertes Artefakt zu sein, dessen physikochemischen Eigenschaften im Vergleich zu den Varianten vernachlässigbar sind. Allerdings stört die erhöhte Absorption signifikant die genaue Konzentrationsbestimmung. Die Proteinkonzentration wurde daher über die Tyrosin-Fluoreszenz unter denaturierenden Bedingungen mittels einer M7(wt) Kalibriergerade ermittelt (siehe 3.2.7.3).

#### 4.2.3. Präparation und Reinheit der CXXC-Peptide

Die CXXC-Peptide dienen als Modell für den denaturierten Zustand des redoxaktiven Bereichs in den M7-Varianten. Es wurden verschiedene Peptide entsprechend der Thioredoxin- (CGPC) und der DsbA-Tetrapeptid-Sequenz (CPHC) generiert. Es stellen sich vor allem die Fragen, welche Bedeutung das Dipeptid zwischen den Cysteinen hat und ob die Sequenz um das CXXC-Peptid einen Einfluss auf das Redoxpotential ausübt. Hierfür wurden die isolierten Tetrapeptide erzeugt, die im Vergleich zu den N- und C-terminal verlängerten Peptiden untersucht werden sollten (Tabelle 4.1- I). Die CXXC-Peptide wurden sowohl manuell (Trx<sub>4</sub>, Trx<sub>7</sub>, DsbA<sub>4</sub>, DsbA<sub>7</sub>) als auch über automatisierte Spritzensynthese (DsbA<sub>7</sub>, Di23, Di25, Di26) hergestellt. Hierfür wurden je 100  $\mu\text{mol}$  Harz eingesetzt. Die Ausbeuten sind in Tabelle 4.2- II gelistet. Der direkte Vergleich zeigt, dass die automatisierte Synthese in etwa ähnliche Ausbeuten liefert, wie die manuelle Spritzensynthese. Wichtig zu

erwähnen ist, dass Cystein-Reste in der Peptidsynthese zur Bildung von Diastereomeren neigen<sup>120</sup> (Anhang Abbildung 7.5- I). Diastereomere lassen sich z.T. nicht vollständig voneinander über rpHPLC trennen und verbleiben damit in der biophysikalischen Charakterisierung bzw. in der Redoxpotentialbestimmung. Es kann angenommen werden, dass diese Stereoisomere verschiedene Redoxpotentiale aufweisen und damit die gemessenen Redoxpotentiale Mittelwerte darstellen. Aus diesem Grund wurde das Peptid DsbA<sub>7</sub>, dessen Diastereomeranteil quantifizierbar war, über automatische und manuelle Peptidsynthese hergestellt, sowie das Diastereomer über rpHPLC von der Hauptfraktion abgetrennt. Damit lag DsbA<sub>7</sub> in drei Diastereomeranteilen vor (0, 7 und 15 %). Die Redoxpotentiale dieser drei Fraktionen sollten den Einfluss der Isomere über den Aufschluss geben (siehe 4.3.1).

**Tabelle 4.2- II: Peptidausbeuten**

<b>CXXC-Peptid</b>	<b>Ausbeute (mg)</b>	<b>Isomer* (%)</b>
<b>Manuelle Synthese</b>		
DsbA <sub>4</sub>	41	n.d.
Trx <sub>4</sub>	29	n.d.
DsbA <sub>7</sub>	53	7
Trx <sub>7</sub>	45	8
<b>Automatisierte Synthese</b>		
DsbA <sub>7</sub>	42	15
Di23-Peptid	69	6
Di25-Peptid	35	9
Di26-Peptid	67	3

\* Diastereomere per rpHPLC getrennt und quantifiziert (siehe 3.5.1.2)

n.d. nicht definiert, da keine Trennung auf der rpHPLC erkennbar

### 4.3. Biophysikalische Charakterisierung

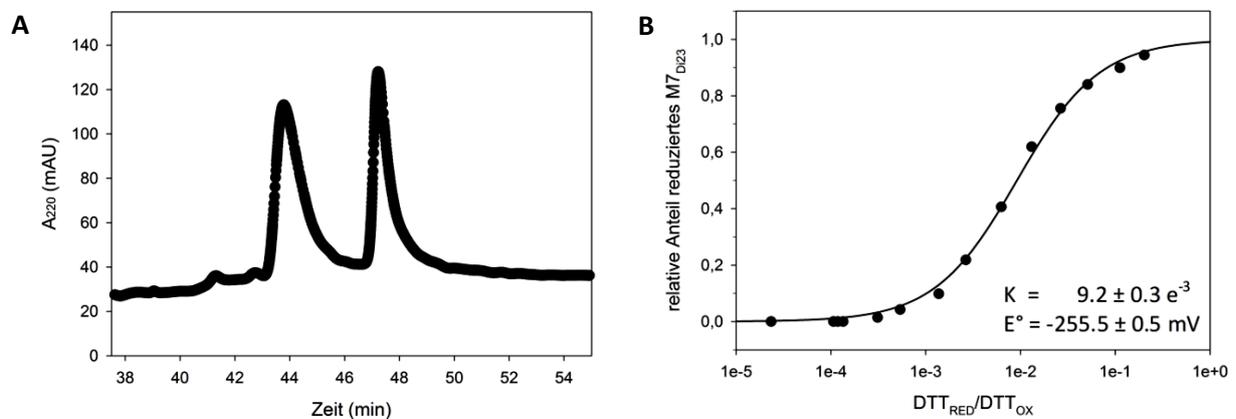
Die biophysikalische Charakterisierung umfasste die Bestimmung der Redoxpotentiale der Varianten, deren thermodynamische Stabilität, die Untersuchung der Cysteinyln-pK<sub>a</sub>-Werte und strukturelle Analysen über Circular Dichroismus- und NMR-Spektroskopie. Hierfür wurde sowohl monomeres Protein der M7-Varianten, sowie die CXXC-Peptide eingesetzt (Tabelle 4.1- I).

#### 4.3.1. Bestimmung des Redoxpotentials

In dieser Arbeit wurde das Redoxpotential von zwei intramolekularen Cysteinen untersucht. Die hier untersuchten CXXC-Sequenzen aus Thioredoxin (CGPC) und DsbA (CPHC) befinden sich an unterschiedlichen Positionen in der Sequenz vom M7(wt), wodurch unterschiedliche physikochemische Umgebungen auf sie wirken. Variationen in den Wasserstoffbrückenbindungen, der effektiven Stärke des  $\alpha$ -Helix-Dipols und von van-der-Waals-Wechselwirkungen beeinflussen das CXXC-Peptid und könnten damit ein weites Spektrum an Redoxpotentialen erzeugen. Die bestimmten Redoxpotentiale, in Verbindung mit weiteren biophysikalischen Experimenten, dienen der Klärung welchen Einfluss die CXXC-Sequenz auf die Stabilität von M7 hat und wie wiederum die Proteinstruktur auf die CXXC-Sequenz wirkt.

Das hier bestimmte Redoxpotential beschreibt das Gleichgewicht zwischen oxidiertem (Disulfid) und reduzierter Spezies (Thiolen) im Bezug zur Standardwasserstoffelektrode ( $E^\circ = 0$  mV) bei pH 7.0. Die Messungen in dieser Arbeit konnten nur unter Nicht-Standardbedingungen stattfinden (< 1 M), weshalb die Nernst-Gleichung (Gleichung 3-VII; siehe 3.5.1.1.4) Anwendung findet, um das Redoxpotential aus der Gleichgewichtskonstante ( $K$ ) zu berechnen. Die Gleichgewichtskonstante ergibt sich aus der Reaktion des Analyten (CXXC-Varianten) mit einem zweiten Redoxpaar, wie Glutathion (GSH, GSSG) oder DTT (DTT<sub>RED</sub>, DTT<sub>OX</sub>), unter Gleichgewichtsbedingungen. Um die Gleichgewichtskonstante zu erhalten, mussten alle vier Redoxspezies, über rpHPLC und Ellman's Test,

quantifiziert werden (siehe 3.5.1). Für die Validität der Redoxpotential-Bestimmung ist die vollständige Probenelution von der rpHPLC essentiell. Getestet wurde dies über die Quantifizierung der Elutionspeaks im Vergleich zur Absorption der gleichen Probe im UV/Vis-Spektrophotometer. Als Referenz diente Hippursäure, die vollständig von der rpHPLC eluiert und vergleichbar der Proteinprobe bei 220 nm absorbiert. Hiernach repräsentieren die Integrale in der rpHPLC vollständig die Redoxprobe vor der Chromatografie. Desweiteren konnten über die gesamte Redox titration keine relevanten Änderungen im Gesamtintegral festgestellt werden, so dass keine Redoxspezies unverhältnismäßig verloren geht. Beispielhaft wird in Abbildung 4.3.1- I für die M7-Varianten die Trennung ihrer Redoxspezies mittels rpHPLC und eine vollständige Redox titration gezeigt, aus der die Gleichgewichtskonstante ( $K$ ) und die Redoxpotentiale bestimmt wurden (Tabelle 4.3- I und Anhang Tabelle 7.5- I). Im Anhang ist zusätzlich die Trennung der Redoxzustände von DTT und Glutathion hinterlegt (Abbildung 7.5- II).



**Abbildung 4.3.1- I: Redoxpotentialbestimmung von Redoxvarianten. A)** Dargestellt ist die Auftrennung der oxidierten (44 min) und reduzierten Spezies (47 min) von M7<sub>D23</sub> über rpHPLC mittels C4-Säule. 11  $\mu\text{M}$  M7<sub>D23</sub> wurden mit 4.85 mM GSH und 0.15 mM GSSG; pH 7.0 bei 30 °C inkubiert (12 h; 30 °C) und anschließend durch 1/10 Volumen 200 mM HCl gequenched. Als Laufmittel dienten A (Wasser; 0.1 % (v/v) TFA) und B (ACN; 0.1 % (v/v) TFA). Die Säule wurde mit einem Fluss von 1 mL/min betrieben. Detektiert wurde die Absorption bei 220 nm. Die Trennung erfolgte im Gradienten: 00 - 15 min mit 2 % B (isokratisch), 15 - 25 min von 2 - 35 % B, 25 - 55 min von 35 - 60 % B. **B)** Gezeigt ist die Redox titration von M7<sub>D23</sub> mit unterschiedlichen Verhältnissen von DTT<sub>RED</sub> zu DTT<sub>OX</sub> bei pH 7.0 und 30 °C. Die Quantifizierung erfolgte nach Kapitel 3.5.1.1. Die Daten wurden mit Gleichung 3-X bzw. 7-V gefittet um die Gleichgewichtskonstante ( $K$ ) zu erhalten. Hier im Beispiel beträgt  $K = 0.0092$ , das wiederum einem Redoxpotential von -256 mV entspricht.

Tabelle 4.3- I: Redoxpotentiale von M7-Varianten (pH 7.0; 30 °C)

Variante	Sequenzausschnitt	Redoxpotential (mV)	
		$E^0_{(\text{GSH})} = -240 \text{ mV}$	$E^0_{(\text{DTT})} = -317 \text{ mV}$
<b>Wildtyp-Proteine</b>			
Thioredoxin*	-W-A-T-W-C-G-P-C-K-M-V-A-	$-271 \pm 3^{38}$	/
DsbA*	-F-S-F-F-C-P-H-C-Y-Q-F-E-	$-122 \pm 1^{39}$	/
<b>Insertions-Proteine</b>			
M7 <sub>Di23</sub>	-V-S <sub>22</sub> -C-P-H-C-T-G-K-E-L-E-R-	$-256^{111}$	$-255 \pm 2$
M7 <sub>Di24</sub>	-V-S-T <sub>23</sub> -C-P-H-C-G-K-E-L-E-R-	$-246 \pm 1$	$-243 \pm 1$
M7 <sub>Di25</sub>	-V-S-T-G <sub>24</sub> -C-P-H-C-K-E-L-E-R-	$-245 \pm 1$	/
M7 <sub>Di26</sub>	-V-S-T-G-K <sub>25</sub> -C-P-H-C-E-L-E-R-	$-208 \pm 2$	/
M7 <sub>Ti26</sub>	-V-S-T-G-K <sub>25</sub> -C-G-P-C-E-L-E-R-	/	$-178 \pm 1$
<b>Substitutions-Proteine</b>			
M7 <sub>D23</sub>	-V-S <sub>22</sub> -C-P-H-C-L-E-R-	$-221 \pm 1$	/
M7 <sub>T23</sub>	-V-S <sub>22</sub> -C-G-P-C-L-E-R-	$-208 \pm 2$	/
<b>CXXC-Peptide</b>			
Trx-Peptide**	Ac-X-C-G-P-C-X-X-NH <sub>2</sub>	/	$-201 \pm 1$
DsbA-Peptide**	Ac-X-X-C-P-H-C-X-X-NH <sub>2</sub>	/	$-227 \pm 2$

\* Redoxpotentiale für Thioredoxin und DsbA wurden in dieser Arbeit nicht bestimmt

\*\* Trx-Peptide umfassen das Tetra- (*Trx<sub>4</sub>*) und Heptapeptid (*Trx<sub>7</sub>*); DsbA-Peptide das Tetra- (*DsbA<sub>4</sub>*), Hepta- (*DsbA<sub>7</sub>*) und die Oktapeptide (*Di23*, *Di25*, *Di26*). X steht sowohl für eine mögliche Aminosäure, kann aber auch das Fehlen einer Aminosäure angeben.

Redoxpotentiale wurden mit dem Glutathion- bzw. DTT-Redoxsystem bestimmt. Farbcodierung: Für Proteinvarianten bedeutet Schwarz = Loop-Reste; Blau =  $\alpha$ -helikale Reste; Orange gibt die CXXC-Sequenz wieder.

Tabelle 4.3- I fasst die gemessenen Redoxpotentiale der CXXC-Varianten im Vergleich zu den Wildtyp Oxidoreduktasen (Trx, DsbA) bzw. den Referenzpeptiden zusammen. Die Redoxpotentiale wurden bei pH 7.0 und 30 °C sowohl mit Glutathion ( $E^0 = -240 \text{ mV}$ ) als auch DTT ( $E^0 = -317 \pm 0.5 \text{ mV}$ ) ermittelt. Dies war notwendig, weil Varianten mitunter gemischte Disulfide mit Glutathion populierten, wie z.B. alle CXXC-Peptide. Die Auswertung der Redoxpotentiale wird hierdurch wesentlich komplexer. Durch die hohe Tendenz von DTT zur intramolekularen Disulfidbildung (starkes Reduktionsmittel) werden in der Disulfidaustauschreaktion keine gemischten Disulfide akkumuliert. Das Standardredoxpotential von DTT ist in der Literatur ungenau mit  $-312$  bis  $-332 \text{ mV}$  definiert<sup>128-131</sup>. DTT wäre damit ungeeignet, um geringe Unterschiede im Redoxpotential zwischen den Varianten zu erkennen. Daher wurde das Redoxpotential von DTT in dieser Arbeit im Redoxgleichgewicht mit Glutathion auf  $-317 \text{ mV}$  ermittelt (siehe 3.5.1.1.4). Dadurch sind alle berechneten Redoxpotentiale auf das Glutathion-Redoxpotential normiert und somit vergleichbar. Für Variante M7<sub>Di23</sub> und M7<sub>Di24</sub> wurde das Redoxpotential mit Glutathion und DTT bestimmt. Die Redoxpotentiale unterscheiden sich nur gering und bestätigen die direkte Vergleichbarkeit der Werte.

Aus Tabelle 4.3- I lassen sich sechs Kernaussagen ableiten.

1. Die Proteinvarianten zeigen, dass das Redoxpotential oxidierender wird, je näher die CXXC-Sequenz an die ursprüngliche  $\alpha$ -Helix vom M7(wt) rückt.
2. Im direkten positionsabhängigen Vergleich zwischen Thioredoxin- und DsbA-Varianten, wird deutlich, dass die Trx-CGPC-Sequenz oxidierendere Redoxpotentiale verursacht, sowohl für Proteine (Substitutions- und Insertionsvarianten) als auch bei den Peptiden. Dies ist gegensätzlich zu den Wildtyp-Proteinen DsbA (starkes Oxidationsmittel) und Thioredoxin (starkes Reduktionsmittel).
3. Die Proteinvarianten unterscheiden sich in ihrem Redoxpotential z.T. deutlich von den Peptiden.

Sowohl stärker oxidierende als auch reduzierende Varianten wurden generiert. Die Peptide stellen in dieser Arbeit das Modell für den denaturierten Zustand dar.

- Alle Peptide mit dem gleichen Dipeptid zwischen den Cysteinen weisen das gleiche Redoxpotential auf. Das bedeutet, dass die flankierenden Reste um die CXXC-Sequenz keinen Einfluss auf das Redoxpotential im denaturierten Zustand besitzen.
- Unterschiedliche Anteile an Cysteinisomeren (0 bis 15 %) des DsbA<sub>7</sub>-Peptids führen zum gleichen Redoxpotential.
- Die Redoxpotentiale der CXXC-Varianten unterscheiden sich deutlich von den Wildtyp-Proteinen mit bis zu +93 mV für Thioredoxin und -134 mV für DsbA.

Zusammenfassend liegen Varianten vor, die auf einen strukturellen Einfluss der M7-Struktur auf die CXXC-Cysteine schlussfolgern lassen. Besonders auffallend ist die große Abweichung zwischen den Redoxpotentialen von den Wildtyp-Proteinen und den entsprechenden CXXC-Varianten. Die DsbA-Variante M7<sub>Di23</sub> besitzt ein bemerkenswertes Redoxpotential, das nur 15 mV vom Thioredoxin(wt) entfernt ist.

#### 4.3.2. Temperatur- und Ionenstärkeabhängigkeit des Redoxpotentials

Unter 4.3.1 wurde das Redoxpotential bei 30 °C, pH 7.0 und in PBS (8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) bestimmt. Im Folgenden wurde untersucht, wie sich das Redoxpotential zum einen durch geringe Temperatur (20 °C) ändert. Viele Versuche zur biophysikalischen Charakterisierung fanden bei 20 °C statt und zeigen z.T. sehr große temperaturabhängige Unterschiede. Desweiteren zeigte die Salzkonzentration des Puffers einen geringen Einfluss auf das Redoxpotential des DsbA(wt) von ca. -6 mV pro 0.5 M NaCl<sup>141</sup>. Änderung der NaCl-Konzentration (bis 3 M) sollte zeigen, ob die Varianten sich hierbei wie ihre Peptide oder wie der DsbA(wt) verhalten. Dies sollte ebenso klären, ob benachbarte Reste um die CXXC-Sequenz in den Peptiden einen Einfluss auf das Redoxpotential ausüben. Durch die Disulfidverbrückung gelangen die Reste um die CXXC-Sequenz (Tabelle 4.1- I) in räumliche Nähe und könnten somit den oxidierten Zustand der Peptide begünstigen oder destabilisieren.

**Tabelle 4.3- II: Temperatur- und Ionenstärkeabhängigkeit des Redoxpotentials**

Variante	Sequenzausschnitt	Redoxpotential (mV)			
		20 °C	30 °C	0 M NaCl	1 M NaCl
M7 <sub>Di23</sub>	-V-S <sub>22</sub> -C-P-H-C-T-G-K-E-L-E-R-	-251 ± 1	-254 ± 1	-255 ± 1	-246 ± 1
M7 <sub>Di26</sub>	-V-S-T-G-K <sub>25</sub> -C-P-H-C-E-L-E-R-	-210 ± 1	-209 ± 1	-208 ± 1	-208 ± 1
Trx <sub>4</sub> -Peptid	Ac-C-G-P-C-NH <sub>2</sub>	-203 ± 1	-201 ± 1	/	/
DsbA <sub>7</sub> -Peptid	Ac-A-C-P-H-C-A-Y-NH <sub>2</sub>	-228 ± 1	-228 ± 1	/	/
Di26-Peptid	Ac-G-K-C-P-H-C-E-L-NH <sub>2</sub>	/	-226 ± 1	-227 ± 1	-225 ± 1
Di23-Peptid	Ac-V-S-C-P-H-C-T-G-NH <sub>2</sub>	/	-228 ± 1	-227 ± 1	-225 ± 1
DsbA(wt) <sup>73,141</sup>	-F-S-F-F-C-P-H-C-Y-Q-F-E-	-116 ± 4*	-118 ± 2*	-125 ± 1*	-137 ± 1*

\* Werte von DsbA(wt) entstammen angegebenen Literatur

Tabelle 4.3- II verdeutlicht, dass Temperaturänderungen ( $\Delta T = 10$  °C) nur einen äußerst geringen Einfluss auf das Redoxpotential der M7-Varianten generieren, vergleichbar dem DsbA(wt)<sup>73</sup>. Ebenfalls zeigt die Salzkonzentration nur geringe Wirkung auf das Redoxpotential der Peptide und auf das M7<sub>Di26</sub>-Protein. Aus der Sequenz von M7<sub>Di26</sub> und seinem Peptid konnte man eine mögliche ionische Wechselwirkung vermuten. Hier liegen ein Lysin N- und ein Glutamat C-terminal der CPHC-Sequenz und damit möglicherweise in räumlicher Nähe im oxidierten Zustand. Die Erhöhung der Ionenstärke

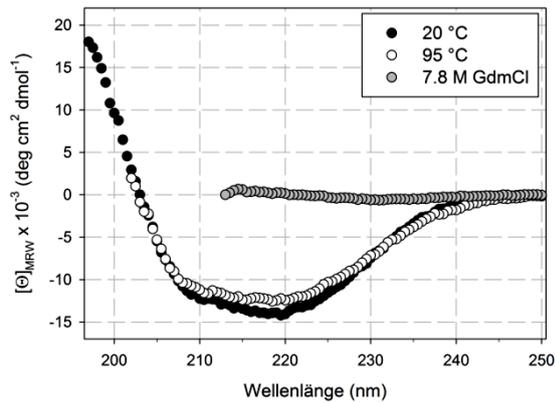
zeigte allerdings keinen Einfluss. Interessant ist das M7<sub>D123</sub>-Protein, dessen Redoxpotential zwischen 0 und 1 M NaCl um +9 mV steigt. Diese Änderung ist vergleichbar mit der Salzabhängigkeit des Redoxpotentials vom DsbA(wt) ( $\Delta E = -12$  mV von 0 bis 1 M NaCl)<sup>141</sup>, wenn auch hier in umgekehrter Richtung hin zu einem mehr oxidierenden Molekül. Eine steigende Ionenstärke im Puffer bedingt für DsbA(wt) und M7<sub>D123</sub> eine Verschiebung des Redoxpotentials hin zu dem Redoxpotential der DsbA-Peptide. Wird die Salzkonzentration weiter bis auf 3 M NaCl gesteigert, änderte dies das Redoxpotential von M7<sub>D123</sub> nur geringfügig ( $\Delta E \approx +3$  mV von 1 bis 3 M NaCl) im Vergleich der Potentialänderung zwischen 0 und 1 M NaCl.

### 4.3.3. Proteinstabilitäten

Das M7(wt)-Protein besitzt eine außergewöhnliche Stabilität gegenüber thermischen und chemischen Einflüssen. In diesem Kapitel wird analysiert ob diese Charakteristik auch auf die CXXC-Varianten zutrifft.

#### 4.3.3.1. Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung

Die thermische Stabilität vom Wildtyp M7-Protein ist außergewöhnlich. Das Temperaturoptimum der Stabilität konnte über thermische Entfaltung in Abhängigkeit von Guanidiniumchlorid (GdmCl) auf  $\approx +48$  °C bestimmt werden. Die geschätzte Hitzedenaturierung findet bei  $\approx +135$  °C statt und im Bereich von -35 °C kommt es zur Kältedenaturierung<sup>6,32</sup>. Dadurch besitzt der M7(wt) eine temperaturabhängige Stabilität unter physiologischen Bedingungen, die möglicherweise an das Redoxpotential gekoppelt werden kann. Die ersten Untersuchungen der oxidierten Form der M7-Redoxvarianten galten der Integrität der Sekundärstruktur über einen Temperaturgradienten von 20 bis 95 °C. Die reduzierte Spezies wurde nicht betrachtet, da durch hohe Temperaturen die Oxidation der Varianten wahrscheinlich wird. In Abbildung 4.3.3-I sind die Fern-UV-CD-Spektren an den Endpunkten des Temperaturgradienten anhand von M7<sub>D23</sub> gezeigt. Es kommt lediglich zu einer geringen Abnahme in der Intensität durch die Temperaturerhöhung, die sich deutlich zur Elliptizitätsänderung vom Spektrum unter 7.8 M GdmCl unterscheidet. Die geringe Intensitätsänderung egalisiert sich wiederum durch erneutes Abkühlen auf 20 °C (Daten nicht gezeigt). Für keine der untersuchten Varianten konnte eine Hitzedenaturierung mittels Fern-UV-CD beobachtet werden. Dies beinhaltete die beiden Substitutionsvariante M7<sub>T23</sub> und M7<sub>D23</sub>. Für die Substitutionsvarianten wurde, ausgehend von der geringen Ausbeute in der Proteinbiosynthese eine geringere Proteinstabilität vermutet (siehe 4.2), die sich aber nicht im hier gewählten Temperaturgradienten wiederfindet. Desweiteren decken sich die temperaturabhängigen Fern-UV-CD-Messungen mit den Beobachtungen in der Hitzefällung während der Proteinpräparation (siehe 4.2.1). Hier diente eine 50 °C-Inkubation (20 min) der Abtrennung des Zielproteins in der löslichen Fraktion.



**Abbildung 4.3.3- I: Temperatureinfluss auf die Sekundärstruktur.** Dargestellt ist das Fern-UV-CD-Spektrum von M7<sub>D23</sub> bei 20 und 95 °C. Durch die Temperaturerhöhung treten nur geringen Änderungen im Spektrum auf. Es scheint keine Hitzedenaturierung stattzufinden. Im Vergleich ist das Fern-UV-CD-Spektrum von M7<sub>D126</sub> unter denaturierenden Bedingungen (7.8 M GdmCl) gezeigt. Gemessen wurde mit 6  $\mu$ M (M7<sub>D23</sub>) und 12  $\mu$ M (M7<sub>D126</sub>) bei pH 7.0 und RT. Die Spektren wurden um ihr Puffersignal korrigiert. Die Datenaufnahme erfolgte mit:  $\geq 30$  Akkumulationen; 50 nm/min Schrittgeschwindigkeit; 0.5 nm Schrittweite; 0.5 s Datenintegration; Dynodenspannung < 600 V.

#### 4.3.3.2. Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln

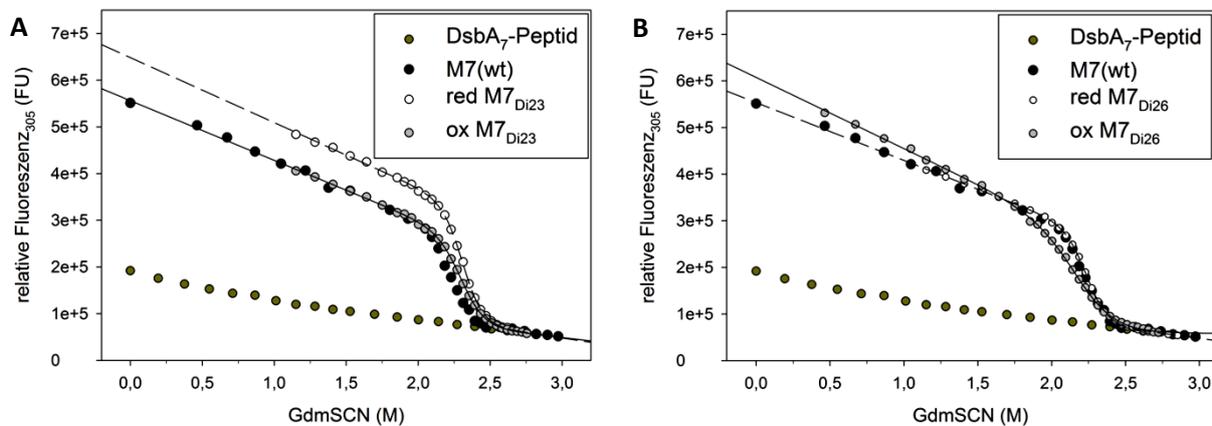
Die freie Energie der Proteinentfaltung ( $\Delta G_{n \rightarrow d}$ ) ist eine der entscheidenden thermodynamischen Größen zur biophysikalischen Charakterisierung der Proteine dieser Arbeit.  $\Delta G$ -Werte wurden für alle Varianten über die chemisch-induzierte Denaturierung durch Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN) bei 20 °C und zum Teil bei 30 °C bestimmt. Die Denaturierung wurde über die Änderung der Tyrosinfluoreszenz verfolgt. In Abbildung 4.3.3- II werden die Denaturierungsübergänge von M7<sub>D123</sub> und M7<sub>D126</sub> in ihrer oxidierten und reduzierten Form beschrieben. Die Denaturierungsübergänge aller hier untersuchten Varianten sind im Anhang Abbildung 7.8- I aufgeführt. Die berechneten  $\Delta G_{n \rightarrow d}$  sind in Tabelle 4.3- III gezeigt (eine ausführlichere Tabelle 7.8- I im Anhang beinhaltet zusätzlich m- und  $D_{1/2}$ -Werte). Zum direkten Vergleich wurden alle Übergänge auf das "denaturierte" Plateau des tyrosinhaltigen DsbA<sub>7</sub>-Peptids normiert (2.6 bis 2.8 M GdmSCN). Die Intensitätsunterschiede im nativen Plateau (0 bis  $\approx 2.0$  M GdmSCN) ermöglichen bereits erste Aussagen zur Umgebung des Tyrosins in der M7-Struktur (Abbildung 4.3.3- II und Anhang Abbildung 7.8- I). Auffällig zeigt Variante M7<sub>D123</sub> eine 15-%ig erhöhte Fluoreszenzintensität in der reduzierten Form gegenüber der oxidierten Spezies, wodurch Unterschiede in Struktur und Dynamik wahrscheinlich sind. Oxidiert scheint die Intensität weitgehend identisch mit der vom M7(wt). Eine ähnliche Umgebung kann damit vermutet werden. Die übrigen Varianten folgen keinem einheitlichen Muster: Teils liegt die Fluoreszenzintensität des oxidierten Zustands über dem des reduzierten Zustands (M7<sub>D125</sub>), es ist umgekehrt (M7<sub>D124</sub>, M7<sub>D126</sub>) oder die Intensitäten sind weitgehend unverändert (M7<sub>D23</sub>, M7<sub>T126</sub>). Ebenso folgt der Fluoreszenzintensitäts-Vergleich mit M7(wt) keinem offensichtlichen Schema.

Die Kurve des DsbA<sub>7</sub>-Peptids beschreibt den Einfluss des GdmSCN-Puffers auf die Fluoreszenz eines vollständig lösungsmittelzugänglichen Tyrosins. Erwartungsgemäß weisen die Plateaus der denaturierten Proteine und das DsbA<sub>7</sub>-Peptid (2.5 bis 3.0 M GdmSCN) den gleichen Verlauf auf. Das abfallende native Fluoreszenz-Plateau (0 bis  $\approx 2.0$  M GdmSCN) zeigt, dass das Tyrosin bereits im nativen Zustand für GdmSCN zugänglich ist. Die dargestellten Denaturierungsübergänge wurden für die Varianten detailliert im Bereich von 1 bis 3 M aufgenommen. Messungen zwischen 0 und 1 M GdmSCN zeigten den Verlauf vom M7(wt). Kein weiterer Übergang scheint in diesem Bereich vorzuliegen, wodurch der Bereich von 1 bis 3 M GdmSCN für die Bestimmung der  $\Delta G_{n \rightarrow d}$ -Werte ausreicht. Diese Aussage wird durch die Fern-UV-CD-Messungen unterstützt, die ebenso einen monophasischen Übergang ergaben (siehe 4.3.5).

Alle untersuchten Varianten besitzen eine hohe bis außergewöhnlich hohe thermodynamische Stabilität, die von der M7(wt)-Struktur stammt. Für alle Varianten gilt, dass die disulfidverbrückte Form stets instabiler ist als die reduzierte Struktur, dies allerdings in stark unterschiedlichen Beträgen von  $\approx 3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (M7<sub>D125</sub>) bis zu  $\approx 53 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (M7<sub>T126</sub>) (Tabelle 4.3- III). Die  $\Delta G_{n \rightarrow d}$ -Werte der reduzierten Form der einzelnen Varianten schwanken weitaus geringer  $\approx 12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , als die der oxidierten Spezies mit bis zu  $49 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Ausgehend von den  $\Delta G$ -Werten ist zu vermuten, dass die Struktur der reduzierten Form eher dem M7(wt) ähnelt. Die reduzierenden Bedingungen im Denaturierungsansatz werden durch 5 mM TCEP erzeugt. Mittels eines Denaturierungsüberganges vom M7(wt) mit und ohne TCEP wurde getestet, ob TCEP Einfluss auf die Proteinstabilität ausübt. Für beide Denaturierungsübergänge wurden identische  $\Delta G_{n \rightarrow d}$ -Werte gefunden (Anhang Tabelle 7.8- I), weshalb davon auszugehen ist, dass TCEP keinen Stabilisierungseffekt besitzt und alle Werte miteinander vergleichbar sind. Weiterhin muss erwähnt werden, dass auch in Gegenwart von 5 mM TCEP in Einzelproben der Denaturierungsübergänge oxidierte Spezies über rpHPLC detektiert ( $< 15\%$ ) wurde. Die gezeigten  $\Delta G$ -Werte der reduzierten Form sind dennoch repräsentativ, da die Wiederholung der Denaturierungsversuche zu identischen Kurvenverläufen führte. Aus dem Pool der Substitutionsvarianten konnte nur für M7<sub>D23</sub> der  $\Delta G$ -Wert bestimmt werden. Auch hier ist die reduzierte Form stabiler als ihr oxidiertes Gegenstück. Gleichzeitig zeigt die Substitutionsvariante die geringste Stabilität aller reduzierten Formen im Vergleich der M7-Varianten. Eine allgemein verringerte Stabilität von Substitutionsvarianten kann nur gemutmaßt werden, würde aber mit den Ergebnissen aus der Proteinbiosynthese und -reinigung einhergehen. M7<sub>T126</sub> in der oxidierten Form ist ein Sonderfall. Für oxidiertes M7<sub>T126</sub> war der  $\Delta G$ -Wert nur aus dem Renaturierungsübergang der Reversibilitätsversuche bestimmbar. Grund hierfür ist eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung des oxidierten Zustands. Dieses Problem wird im Kapitel 4.3.4 näher betrachtet. Ausgehend von dem thermodynamisch favorisierten reduzierten Zustand ähneln die M7-Varianten in dieser Hinsicht dem DsbA(wt) und nicht Thioredoxin (Tabelle 4.3- III). Ein bedeutender Unterschied zu den Denaturierungsübergängen der Wildtyp Oxidoreduktasen ist, dass deren  $\Delta G$ -Unterschiede zwischen den Redoxformen durch eine Änderung des Übergangsmittelpunktes beschrieben werden bzw. nicht durch einen größeren Kooperativitätsunterschied der Entfaltung (m-Wert) bedingt werden (Anhang Tabelle 7.8- I). Hingegen werden die Stabilitätsunterschiede zwischen den Redoxzustände für alle in dieser Arbeit erzeugten CXXC-Varianten hauptsächlich durch eine Abnahme der Kooperativität des Übergangs im oxidierten Zustand verursacht. Daher besitzen alle M7-Varianten unabhängig vom Oxidationszustand einen nahezu identischen Übergangsmittelpunkt (2.2 - 2.3 M GdmSCN), trotz der enormen Unterschiede in den  $\Delta G$ -Werten (z.B.  $\approx 53 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  bei M7<sub>T126</sub>). Ein weiterer Unterschied zwischen den Wildtyp Oxidoreduktasen und den M7-CXXC-Varianten ist die Temperaturabhängigkeit der  $\Delta G$ -Werte, genauer die Differenz zwischen den  $\Delta G$ -Werten von oxidiertem und reduziertem Spezies ( $\Delta\Delta G_{\text{OX/RED}}$ ). Ein Temperaturunterschied von  $10^\circ\text{C}$  führt beim DsbA(wt) zu keiner größeren Änderung im  $\Delta\Delta G_{\text{OX/RED}}$  ( $\approx 14 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) auch wenn die  $\Delta G$ -Werte der Redoxspezies sich ändern. Bei den CXXC-M7-Varianten führt die gleiche Temperaturerhöhung zu einem diversen Resultat, bei der sich variantenabhängig die oxidierte (M7<sub>D123</sub>, M7<sub>D126</sub>) oder die reduzierte Form (M7<sub>D124</sub>, M7<sub>D125</sub>) im Vergleich zu ihrem Redoxpartner stabilisieren kann. Auffällig ist allerdings der enorme Stabilitätsgewinn der oxidierten Form von M7<sub>D126</sub> durch die Temperaturerhöhung (20 auf  $30^\circ\text{C}$ ) von  $\approx -29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Zusammengefasst führt die Ausbildung der Disulfidbrücke zur temperaturabhängigen Destabilisierung der M7-Varianten. Dabei ist die Proteindestabilisierung am stärksten bei Varianten ausgebildet, die die CXXC-Mutation in der ursprünglichen M7- $\alpha_1$ -Helix tragen (M7<sub>D126</sub>, M7<sub>T126</sub>, M7<sub>D23</sub>).

Die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität im nativen Protein korrelieren nicht mit der beobachteten Proteinstabilitätsänderung.



**Abbildung 4.3.3- II: Chemisch-induzierte Denaturierungsübergänge von M7<sub>Di23</sub> und M7<sub>Di26</sub> im Vergleich mit M7(wt) und dem tyrosinhaltigen DsbA<sub>7</sub>-Peptid.** Dargestellt wird die relative Fluoreszenz bei 305 nm in Abhängigkeit der GdmSCN-Konzentration von **A)** M7<sub>Di23</sub> und **B)** M7<sub>Di26</sub>. Die Anregungswellenlänge lag bei 274 nm. Gemessen wurde bei pH 7.0 und 20 °C. Die Übergänge der CXXC-Varianten wurden in ihrer oxidierten und reduzierten Form von 0.5 bzw. 1 bis 2.8 M GdmSCN bestimmt, die für M7(wt) und das DsbA<sub>7</sub>-Peptid wurden von 0 bis 3 M GdmSCN gemessen. Die Analytenkonzentrationen betragen 10 bis 15 µM. Die Übergänge der beiden Redoxformen der CXXC-Varianten wurden nach Gleichung 3-XV angepasst (siehe 3.5.2.2). Es wird der Fit der oxidierten Form mit einer durchgängigen Linie und der reduzierten Spezies mit einer gestrichelten Linie gezeigt. Auf Grund von Konzentrationsunterschieden (siehe 3.3.2) wurden alle Übergänge auf das denaturierte Plateau von DsbA<sub>7</sub>-Peptid (2.6 bis 2.8 M GdmSCN) normiert. Dafür muss das Ramansignal des Puffers bei 305 nm abgezogen werden. Weitere chemisch-induzierten Denaturierungsübergänge der CXXC-Varianten werden im Anhang Abbildung 7.8- I aufgeführt.

**Tabelle 4.3- III: Überblick über  $\Delta G$ -Werte der Varianten**

Variante	20 °C			30 °C		
	$\Delta G_{\text{RED}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{\text{OX}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G_{\text{OX/RED}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{\text{RED}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{\text{OX}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G_{\text{OX/RED}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )
<b>Wildtyp-Proteine</b>						
DsbA <sup>73</sup>	-65 ± 4*	-50 ± 4*	15 ± 8	-48 ± 3*	-34 ± 1*	14 ± 4
Thioredoxin <sup>82</sup> bei 25 °C	-25 ± 1*	-41 ± 2*	-16 ± 3	/	/	/
M7**		-81 ± 2		/	/	/
<b>Insertions-Proteine</b>						
M7 <sub>Di23</sub>	-82 ± 2	-69 ± 1	13 ± 3	-78 ± 2	-75 ± 1	3 ± 3
M7 <sub>Di24</sub>	-86 ± 1	-81 ± 2	5 ± 3	-89 ± 3	-82 ± 3	7 ± 6
M7 <sub>Di25</sub>	-76 ± 1	-73 ± 1	3 ± 2	-80 ± 3	-72 ± 3	8 ± 6
M7 <sub>Di26</sub>	-77 ± 1	-42 ± 3	35 ± 4	-85 ± 2	-71 ± 2	14 ± 4
M7 <sub>Ti26</sub>	-89 ± 3	-36 ± 2***	53 ± 5	n.b.	n.b.	n.b.
<b>Substitutions-Proteine</b>						
M7 <sub>D23</sub>	-60 ± 2	-55 ± 2	5 ± 4	n.b.	n.b.	n.b.

Insofern nicht anders angegeben, entstammen die Werte GdmSCN-induzierten Denaturierungen bei pH 7.0

\* DsbA(wt)- und Trx(wt)-Literaturwerte über GdmCl induzierte Denaturierungen bei pH 7.0 ermittelt

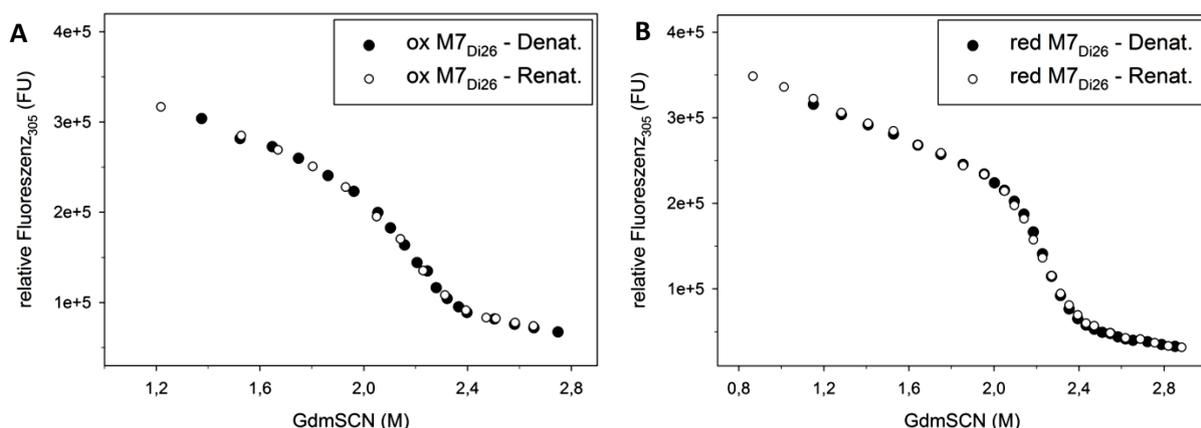
\*\* M7(wt) besitzt keine Cysteine

\*\*\*  $\Delta G$ -Wert von ox M7<sub>Ti26</sub> entstammt dem Renaturierungsübergang (siehe 4.3.4)

#### 4.3.4. Reversibilität der Proteinfaltung

Die vollständige Reversibilität der Denaturierung ist Voraussetzung für die thermodynamische Auswertung der Übergänge und der Berechnung der  $\Delta G$ -Werte. Die Reversibilität für den M7(wt) wurde durch Trabit (2008)<sup>35</sup> gezeigt. Exemplarisch sind in Abbildung 4.3.4- I die Denaturierungs- und Renaturierungsübergänge für M7<sub>Di26</sub> für beide Redoxzustände abgebildet. Ebenso wie für den Wildtyp, ist die Entfaltung der Redoxvariante komplett reversibel. Aus der wieder erlangten Fluoreszenzintensität kann geschlussfolgert werden, dass sich die Tertiärstruktur um das Tyrosin wieder nativ ausrichtet.

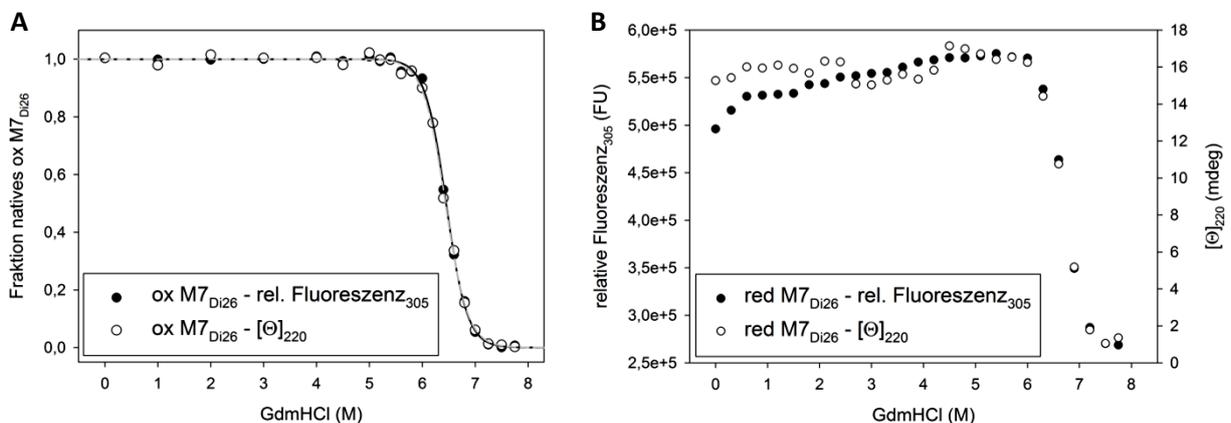
Ein spezieller Fall lag bei der Variante M7<sub>Ti26</sub> vor. Für diese war es nicht möglich einen  $\Delta G$ -Wert für den oxidierten Zustand nach der herkömmlichen Methode (siehe 3.5.2.2) zu ermitteln. Der Übergang besaß kein definierbares Plateau im nativen Bereich (Abbildung 7.8- II) und war damit nicht auswertbar. Es stellte sich heraus, dass diese Variante in der oxidierten Form zur Oligomerisierung neigt, wie über analytische Gelfiltrationsläufe gezeigt. Derartige Oligomerisierungsreaktionen wurden bei keiner der hier untersuchten Varianten beobachtet. Die verhältnismäßig hohe Ansammlung von Oligomeren war auch in der Proteinpräparation (nicht reduzierende Bedingungen) auffällig (Daten nicht gezeigt). Durch die Inhomogenität ergaben sich in der Guanidiniumchlorid-induzierten Denaturierung zwei Übergänge (Anhang Abbildung 7.8- III), die nicht zur  $\Delta G$ -Bestimmung verwendet werden konnten. Beim ersten Übergang ( $D_{1/2} \approx 3.5$  M GdmCl) scheint es sich um ein Artefakt zu handeln, das durch die Proteindimerisierung verursacht wird. Der zweite Übergang ( $D_{1/2} \approx 6.5$  M GdmCl) ähnelt den monophasischen Übergängen der anderen M7-Varianten. Es wurde angenommen, dass die vollständige Denaturierung und die anschließende Verdünnung des Proteins (auf  $\approx 7 \mu\text{M}$ ) die Ausbildung von Oligomeren unterdrücken könnte. Dies gelang, was über analytische Gelfiltration bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Daher wurde aus dem Renaturierungsübergang in GdmSCN (Anhang Abbildung 7.8- I-C) ein apparenter  $\Delta G$ -Wert für oxidiertes M7<sub>Ti26</sub> ermittelt. Dieser Renaturierungsübergang entspricht in seiner Fluoreszenzintensität und dem Übergangsmittelpunkt ( $D_{1/2} = 2.2$  M GdmSCN) dem Erwartungswert aus den Denaturierungsübergängen der anderen Varianten (Anhang Tabelle 7.8- I). Der erhaltene  $\Delta G$ -Wert ( $36 \pm 2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) scheint somit plausibel.



**Abbildung 4.3.4- I: Denaturierungs- und Renaturierungsübergang für M7<sub>Di26</sub>.** Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenzintensität bei 305 nm in Abhängigkeit der GdmSCN-Konzentration für die oxidierte (A) und reduzierte Spezies (B). Die Anregungswellenlänge lag bei 274 nm. Gemessen wurde bei pH 7.0 und 20 °C. Die Analytenkonzentration betrug  $\approx 10 \mu\text{M}$ . Die Proteinproben der Renaturierung entstammen einer Proteinlösung mit 2.7 M GdmSCN, in dem das Protein vollständig denaturiert wurde. Aus dieser Lösung wurden die Renaturierungsproben durch Verdünnung mit 50 mM Tris-Puffer hergestellt (siehe 3.5.2.3). Die Abbildung zeigt die vollständige Reversibilität der Entfaltung der Variante.

#### 4.3.5. Faltungsmodell der Redoxvarianten

Die Denaturierungsübergänge von M7(wt) und seinen Redoxvarianten wurden nach dem Zwei-Zustandsmodell ausgewertet. Das bedeutet, dass im Übergangsbereich nur natives und denaturiertes Protein vorliegen darf. Überprüft wurde diese Annahme durch die Analyse der Denaturierungsübergänge mittels zweier Methoden, die sich unterschiedliche Charakteristiken der Proteinstruktur zu Nutze machen (Abbildung 4.3.5- I). Es wurde zum einem über die Fluoreszenz bei 305 nm die Änderung der Tyrosin-Umgebung untersucht. Das Tyrosin in den M7-Varianten wechselwirkt mit einer Vielzahl an Resten mehrerer Sekundärstrukturelemente und ist damit ein guter Repräsentant der Tertiärstruktur. Desweiteren wurde die Änderung der Elliptizität bei 220 nm in Abhängigkeit zum Denaturant über Fern-UV-CD-Spektroskopie bestimmt. Die Elliptizität bei 220 nm gibt hauptsächlich den  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturanteil wieder. Die M7-Varianten besitzen zwei  $\alpha$ -Helices, die miteinander und mit dem  $\beta$ -Faltblatt interagieren (Abbildung 1.2- I). Aufgrund der Absorption von GdmSCN in der Fern-UV-CD-Spektroskopie wurden die Übergänge mit GdmCl gemessen, welches allerdings ein wesentlich schwächeres Denaturierungsmittel als GdmSCN ist. Dadurch ist das Plateau, das durch das Signal des denaturierten Proteins bei sehr hohen GdmCl-Konzentrationen zu Stande kommt, weniger gut definiert (Abbildung 4.3.5- I), was in der Auswertung nach Gleichung 3-XV (siehe 3.5.2.2) zu größerer Ungenauigkeit führt. Abbildung 4.3.5- I zeigt exemplarisch für beide Redoxformen von M7<sub>Di26</sub> deckungsgleiche Übergänge in der Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Spektroskopie. Die bestimmten  $\Delta G$ -Werte für die oxidierte Form (**A**) unterscheiden sich nicht signifikant ( $\Delta G_{\text{Fluo}} = -79 \pm 3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  bzw.  $\Delta G_{\text{CD}} = -75 \pm 3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).  $\Delta G$ -Werte für die reduzierte Form (**B**) sind unter GdmCl in der Form nicht bestimmbar, dennoch zeigen die Daten klar den identischen Verlauf der beiden Denaturierungsübergänge. Ebenso wie für den M7(wt), wird daher auch für die Redoxvariante das Zwei-Zustandsmodell unter Gleichgewichtsbedingungen postuliert.



**Abbildung 4.3.5- I: Vergleich der Denaturierungsübergänge in Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Spektroskopie von M7<sub>Di26</sub>.** Dargestellt werden **A**) die Fraktion von nativen oxidierten M7<sub>Di26</sub> in Abhängigkeit der GdmCl-Konzentration und **B**) die Denaturierungsübergänge für reduziertes M7<sub>Di26</sub> gemessen mittels Fluoreszenz (●) und der Elliptizität (○). Gemessen wurde bei pH 7.0 und 20 °C. Als schwarze Punkte (●) bzw. schwarze Linie (Fit) ist die Änderung der Tyrosin-Fluoreszenz bei 305 nm gezeigt. Die Sekundärstrukturänderungen wurden über die Elliptizität bei 220 nm [ $\theta_{220\text{nm}}$ ] verfolgt (weiße Punkte (○) bzw. grau gestrichelt Fit-Linie). Elliptizität und Fluoreszenz wurden mit der identischen Probe gemessen (im Detail unter 3.5.2.4 beschrieben). Die Proteinkonzentration lag bei  $\approx 10 \mu\text{M}$ . Die Daten wurden nach Gleichung 3-XV ausgewertet, die daraufhin für die oxidierte Form nach Gleichung 3-XVII normiert wurden, um die hier dargestellte Fraktion natives Protein zu erhalten (siehe 3.5.2.2). Nach Gleichung 3-XVIII wurde der  $\Delta G$ -Wert der Entfaltung für die oxidierte Form bestimmt. Die reduzierte Spezies besitzt kein ausreichend definiertes Plateau im denaturierten Zustand, das eine Kurvenregression ermöglicht.

#### 4.3.6. Kinetische Untersuchungen zur CXXC-Reaktivität

Das Vorhandensein eines Redoxpotentials ist nicht gleichzusetzen mit der Redoxaktivität des Moleküls. Die Redoxaktivität beschreibt die Kinetik der Wechselwirkung mit einem Substrat, welches oxidiert bzw. reduziert wird. Diese Interaktion hängt maßgeblich von der Sterik bzw. von dem Vorhandensein einer Substratbindestelle ab. Im rationalen Design der M7-Varianten wurde eine gezielte Substratinteraktion nicht berücksichtigt. Dennoch ist es von großer Bedeutung die Grenzen der Redoxaktivität der Varianten einzuordnen, da hiermit die Grundlage für weitere Designoptimierungen gelegt wird. In diesem Kapitel wird zum einen die Reaktivität mit DTNB (Ellman's Reagenz) untersucht. Aus dieser Reaktion erhält man Informationen zum Reduktionsvermögen der Varianten und in Abhängigkeit der Reaktion vom pH lässt sich zusätzlich der  $pK_a$  der CXXC-Cysteine bestimmen. Desweiteren wird die Redoxreaktion mit DTT betrachtet, die Aufschluss über Reduktions- und Oxidationskraft der Varianten liefert.

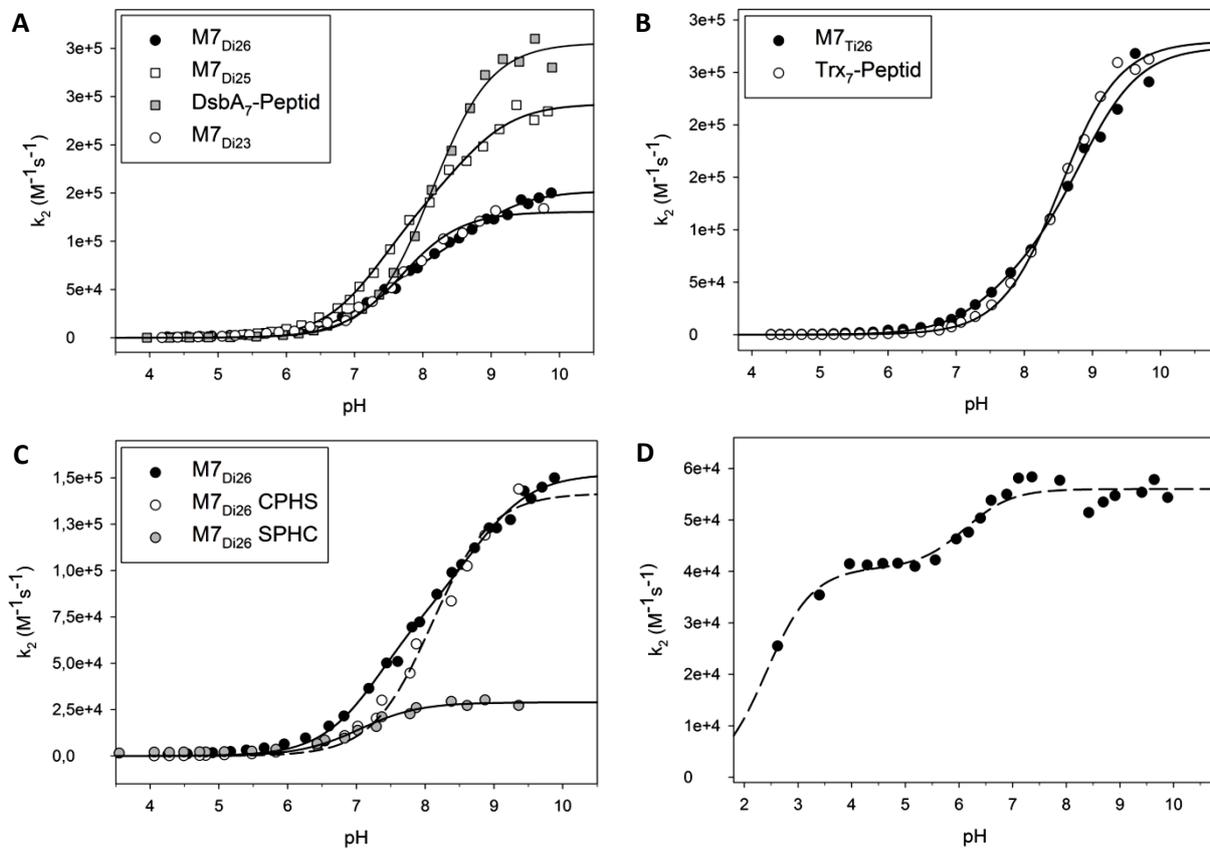
##### 4.3.6.1. Cysteinyl- $pK_a$ -Werte der CXXC-Varianten

Der  $pK_a$ -Wert beschreibt das Gleichgewicht der protonierten und deprotonierten Form eines Moleküls in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die Kinetik der Disulfidaustauschreaktion von DTNB (Disulfid) und der Thiolat-Form der CXXC-Cysteine wurde genutzt, um deren  $pK_a$  zu berechnen. Bei dieser Reaktion wird das TNB-Anion freigesetzt, das anhand seiner Absorption bei 412 nm mittels Stopped-Flow-Absorption-Spektroskopie quantifiziert werden kann. Die Reaktion wurde in einer pH-Titration untersucht. Dabei verschiebt sich der Thiolat-Anteil der Cysteine bei steigenden pH von einem Minimum hin zu einem Maximalwert. Gleichermaßen nimmt die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion pH-abhängig zu. Dieser Verlauf folgt einer sigmoidalen Funktion deren Wendepunkt den  $pK_a$ -Wert definiert. Der Cysteinyl- $pK_a$ -Wert wurde von vier M7-Varianten (M7<sub>D123</sub>; M7<sub>D125</sub>; M7<sub>D126</sub>; M7<sub>T126</sub>), den beiden CXXC-Heptapeptiden (Trx<sub>7</sub>, DsbA<sub>7</sub>) und von DsbA(wt) (Abbildung 4.3.6- I) bestimmt. Zusätzlich wurden die  $pK_a$ -Werte für die Einzelcystein-Varianten von M7<sub>D126</sub> (M7<sub>D126</sub> CPHS und M7<sub>D126</sub> SPHC (Hannemann, 2017)<sup>110</sup>) ermittelt (Abbildung 4.3.6- I-C). Für die Auswertung entscheidend ist es zu klären, wie viele Cysteine der CXXC-Sequenz reagieren. Über einen definierten Standard (z.B. freies Cystein, DTT) kann die Absorption bei 412 nm auf die TNB<sup>2-</sup>-Konzentration umgerechnet werden. Damit kann aus dem Absorptions-Maximum der Progresskurven die Anzahl der reaktiven Cysteine abgeschätzt werden. Bei allen Messungen trat unter basischen Bedingungen (pH > 9) zudem eine signifikante Spontanhydrolyse von DTNB im Zeitraum der Messung auf<sup>124,142</sup>, wodurch Geschwindigkeitskonstanten zum Teil im Basischen weniger genau definierbar waren (Abbildung 4.3.6- I). Erwartungsgemäß reagieren bei den freien Heptapeptiden beide Cysteine, ebenso wie bei M7<sub>D126</sub>, M7<sub>D125</sub> und M7<sub>T126</sub>. Die Einzelcystein-Varianten von M7<sub>D126</sub> zeigten gleichsam, dass beide Cysteine DTNB nukleophil angreifen können (Abbildung 4.3.6- I). Bei pH 7.0 mit sehr ähnlichen Geschwindigkeitskonstanten, wobei bei pH 7.0 das N-terminale Cystein (C<sub>1</sub>) bereits 50 % seiner maximalen Geschwindigkeitskonstante erreicht und C<sub>2</sub> mit nur 10 % dieser reagiert (Tabelle 4.3- IV). Die große Differenz in den Geschwindigkeitskonstanten der Disulfidaustauschreaktionen der einzelnen Cysteine ( $k_2'$  und  $k_2''$ ) kann auf Unterschiede in der **i) Zugänglichkeit** der Cysteine, **ii) Substratausrichtung** oder **iii) Produktstabilisierung** (gemischtes Disulfid, TNB<sup>2-</sup>) hindeuten. Zur Einordnung der Geschwindigkeitskonstanten der Varianten gegenüber einer nicht katalysierten Reaktion, können diese mit freiem Cystein bei pH 7.0 verglichen werden. Sowohl für die Proteine als auch für die CXXC-Peptide ist eine deutliche Zunahme in der apparenten Geschwindigkeitskonstante um das 5- bis 25-fache zu verzeichnen (Tabelle 4.3- IV).

Tabelle 4.3- IV: Überblick über  $pK_a$ -Werte und Geschwindigkeitskonstanten der M7-Varianten

Variante	$k_2'$ ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )	$pK_{a1}$	$k_2''$ ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )	$pK_{a2}$	$k_2$ bei pH 7.0 ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )
M7 <sub>Di26</sub>	$82 \pm 7 \times 10^3$	$7.3 \pm 0.1$	$70 \pm 6 \times 10^3$	$8.7 \pm 0.1$	$28 \times 10^3$
M7 <sub>Di25</sub>	$145 \pm 16 \times 10^3$	$7.3 \pm 0.1$	$97 \pm 15 \times 10^3$	$8.6 \pm 0.2$	$47 \times 10^3$
M7 <sub>Di23</sub>	$131 \pm 2 \times 10^3$	$7.7 \pm 0.1$	n.d.	n.d.	$22 \times 10^3$
DsbA <sub>7</sub> -Peptid	$153 \pm 2 \times 10^3$	$8.1 \pm 0.1$	$153 \pm 2 \times 10^3$	$8.1 \pm 0.1$	$11 \times 10^3$
M7 <sub>Ti26</sub>	$79 \pm 28 \times 10^3$	$7.6 \pm 0.3$	$195 \pm 24 \times 10^3$	$8.8 \pm 0.1$	$11 \times 10^3$
Trx <sub>7</sub> -Peptid	$140 \pm 3 \times 10^3$	$8.5 \pm 0.1$	$140 \pm 3 \times 10^3$	$8.5 \pm 0.1$	$17 \times 10^3$
DsbA(wt)	$41 \pm 1 \times 10^3$	$2.4 \pm 0.1$	$15 \pm 1 \times 10^3$	$6.1 \pm 0.2$	$54 \times 10^3$
M7 <sub>Di26</sub> CPHS <sup>110</sup>	/	/	$142 \pm 4 \times 10^3$	$8.1 \pm 0.0$	$11 \times 10^3$
M7 <sub>Di26</sub> SPHC <sup>110</sup>	$29 \pm 1 \times 10^3$	$7.0 \pm 0.1$	/	/	$14 \times 10^3$
L-Cystein	$38 \pm 1 \times 10^3$	$8.4 \pm 0.1$	/	/	$2 \times 10^3$

$k_2'$  - 2. Ordnung Geschwindigkeitskonstante für das erste Cystein bzw.  $k_2''$  für das zweite Cystein;  $k_2$  - 2. Ordnung Geschwindigkeitskonstante für die Gesamtreaktion beider Cysteine; n.d. - nicht definiert



**Abbildung 4.3.6- I: Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion der CXXC-Varianten mit DTNB als Funktion vom pH.** Für **A)** M7<sub>Di23</sub>, M7<sub>Di25</sub>, M7<sub>Di26</sub> und das DsbA<sub>7</sub>-Peptid Ac-Ala-Cys-Pro-His-Cys-Ala-Tyr-NH<sub>2</sub>; **B)** M7<sub>Ti26</sub> und das Trx<sub>7</sub>-Peptid Ac-Ala-Cys-Gly-Pro-Cys-Ala-Tyr-NH<sub>2</sub>; **C)** M7<sub>Di26</sub> und den Einzelcysteinvarianten M7<sub>Di26</sub> CPHS und SPHC; sowie **D)** den DsbA(wt). Es reagierten 5  $\mu$ M CXXC-Variante mit 0.18 mM DTNB bei 20 °C. Kurvenregression nach Gleichung 3-XXII für sich beeinflussende titrierbare Gruppen von M7<sub>Di25</sub>, M7<sub>Di26</sub>, M7<sub>Ti26</sub>, DsbA<sub>7</sub>-Peptid, Trx-Peptid, DsbA(wt). Für die Einzelcysteinvarianten von M7<sub>Di26</sub> CPHS und SPHC wurde nach dem Ein- $pK_a$ -Modell nach Gleichung 3-XXI ausgewertet. Details zum Versuchsaufbau unter 3.5.3.1.

Die Progresskurven der DTNB-Umsetzung durch die Peptide und die Varianten (M7<sub>Di26</sub>, M7<sub>Di25</sub>, M7<sub>Ti26</sub>) wurden nach Gleichung 3-XIX (siehe 3.5.3.1) ausgewertet, um die Geschwindigkeitskonstanten ( $m$ ,  $k$ ) der Disulfidaustauschreaktion zu erhalten. Mit dieser Auswertung sind Cysteine mit ähnlichen

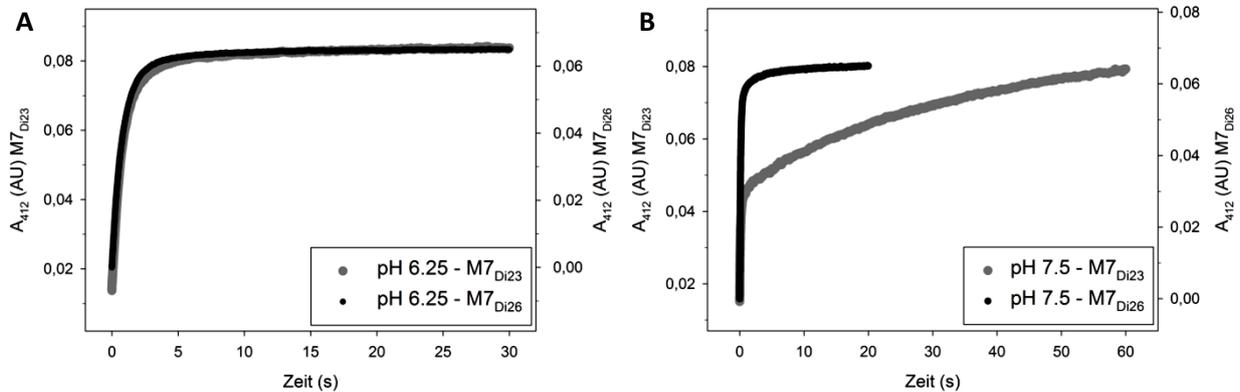
Reaktivitäten schwer mathematisch voneinander zu unterscheiden. Dadurch lässt sich nur eine apparente Geschwindigkeitskonstante sinnvoll bestimmen ( $k$  der Reaktion 1. Ordnung bzw.  $k_2$  der Reaktion 2. Ordnung), die in der Summe die Reaktion beider Cysteine beschreibt, wie anhand der Amplitude der Reaktion geschlussfolgert wurde (Daten nicht gezeigt). In der Auftragung  $k_2$  gegen den pH-Wert der Einzelcystein-Varianten von M7<sub>D126</sub> im Vergleich zum M7<sub>D126</sub>(wt) (Abbildung 4.3.6- I-C) kann deutlich eine verringerte Kooperativität der Mutanten beobachtet werden. Eine erhöhte Kooperativität des M7<sub>D126</sub>(wt) deutet ebenfalls darauf hin, dass beide Cysteine der CXXC-Sequenz an der beobachteten Gesamtreaktion beteiligt sind. Folglich wurden zwei apparente  $pK_a$ -Werte und die apparenten Geschwindigkeitskonstanten ( $k_2'$  und  $k_2''$ ) für die einzelnen CXXC-Cysteine bestimmt (Tabelle 4.3- IV). In dieser Arbeit wird damit als Näherung angenommen, dass ein Cystein mit einer definierten Geschwindigkeitskonstante reagiert. Es ist allerdings durchaus möglich, dass die Cysteine in unterschiedlichen Konformationen vorliegen und damit unterschiedliche Reaktivität generieren. Die hier ermittelten Werte sind folglich als apparent zu betrachten.

Die  $pK_a$ -Kurven der freien CXXC-Peptide zeigen erwartungsgemäß monophasische, stark kooperative Übergänge (Abbildung 4.3.6- I-A, -B), die identische  $pK_a$ -Werte innerhalb der CXXC-Sequenz liefern. Dabei generiert das CPHC-Peptid geringfügig azidere Cysteine (0.4  $pK_a$ -Einheiten) als das Trx-Peptid. Die Cysteine besitzen  $pK_a$ -Werte vergleichbar der freien Aminosäure Cystein (Tabelle 4.3- IV). Liegen die CXXC-Tetrapeptide in der M7-Struktur vor, so wird ein Cystein um  $\approx 1.3$   $pK_a$ -Einheiten azider als das zweite Cystein der Sequenz. Der  $pK_a$  des basischeren Cysteins entspricht Cysteinen in ungefalteten Modellpeptiden ( $pK_a \approx 8.1$  bis  $8.8$ )<sup>81</sup>, bzw. liegt leicht über dem  $pK_a$ -Werten der CXXC-Peptide (DsbA<sub>7</sub>, Trx<sub>7</sub>). Das reaktivere Cystein scheint, entsprechend den Einzelcystein-Varianten vom M7<sub>D126</sub>, das C-terminale Cystein der CXXC-Sequenz zu sein.

Beim DsbA(wt) (Abbildung 4.3.6- I-D) wurden zwei  $pK_a$ -Werte bestimmt, diese beziehen sich allerdings nur auf das reaktive Cysteine (Cys<sub>30</sub>). Aus der Literatur<sup>59,121,143</sup> ist bekannt, dass nur ein Cystein (Cys<sub>30</sub>) reaktiv für die Substratreaktion ist ( $pK_a \approx 3.3$ )<sup>39</sup>. Dennoch entspricht die maximale Absorption der Progresskurven der freigesetzten TNB<sup>2-</sup>-Konzentration einer Reaktion beider CXXC-Cysteine (Daten nicht gezeigt). Es ist wahrscheinlich, dass das zweite Cystein (Cys<sub>33</sub>) das gemischte Disulfid nukleophil angreift, eine intermolekulare Disulfidbindung erzeugt und ein weiteres TNB<sup>2-</sup> freisetzt. Diese intramolekulare Reaktion würde sehr schnell ablaufen, und wäre somit von der hier genutzten Methode nicht auflösbar. Dies passt zum Literaturwert der C30A-Mutante von DsbA, die eine äußerst langsame Geschwindigkeitskonstante von  $200 \pm 50 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  in der Reaktion mit DTNB aufweist<sup>143</sup>. Somit sollte die Reaktion von Cys<sub>33</sub> mit DTNB keine größere Bedeutung in der Reaktion von DsbA(wt) mit DTNB besitzen. Der Anstieg der Geschwindigkeitskonstante bei  $pK_a \approx 6$  muss daher durch eine im pH-Bereich titrierbare Gruppe verursacht werden, die mit Cys<sub>30</sub> wechselwirkt. Entscheidend ist, dass DsbA(wt) bis pH 2.5 eine bemerkenswert hohe Reaktivität besitzt, die von den M7-Varianten in keiner Weise erreicht wird. Messungen unter pH 2.5 sind mit der DTNB-Methode nicht möglich, weil TNB<sup>2-</sup> in diesem pH-Bereich keine auswertbare Absorption mehr aufweist (Anhang Abbildung 7.6- I).

Variante M7<sub>D123</sub> zeigte einen besonderen Verlauf ihrer Progresskurven (Abbildung 4.3.6- II). Die Kinetik entspricht in etwa bis pH 6.25 den Funktionen der anderen Varianten. Ab pH-Werten  $> 7$  ist ein deutlicher biphasischer Verlauf der Kinetik zu erkennen, der bei den anderen Varianten nicht beobachtet wurde. Wahrscheinlich verringert sich hier die Reaktivität eines spezifischen Cysteins, da die verlangsamte Reaktion den halben Absorptionsbetrag ausmacht und damit die Hälfte der Thiole betrifft. Dies führt dazu, dass sich die Geschwindigkeitskonstante ab pH 7.0 für beide Cysteine um

mindestens 1 bis 2 Größenordnungen unterscheidet. Dieser Unterschied vergrößert sich mit steigendem pH exponentiell (siehe  $m_2$  des zweiten Cysteins gegen den pH im Anhang Abbildung 7.6- II). Damit scheint eine ionisierbare Gruppe für die Blockierung des Cysteins verantwortlich zu sein. Der  $pK_a$  der gesuchten Gruppe würde bei ca. 6.5 liegen (weiterführende Versuche unter 4.4.4).



**Abbildung 4.3.6- II: Progresskurven der Reaktion von M7<sub>Di23</sub> und M7<sub>Di26</sub> mit DTNB.** Dargestellt wird die Zunahme der Absorption bei 412 nm gegen die Zeit bei pH 6.25 (A) und 7.5 (B) für 5  $\mu$ M M7<sub>Di23</sub> und M7<sub>Di26</sub> mit 0.18 mM DTNB bei 20 °C. Während die Kinetik beider CXXC-Cysteine im M7<sub>Di26</sub> mit steigenden pH zunimmt, wird im M7<sub>Di23</sub> ein Cystein ab pH-Werten > 6.5 deutlich langsamer. Details zum Versuchsaufbau unter 3.5.3.1.

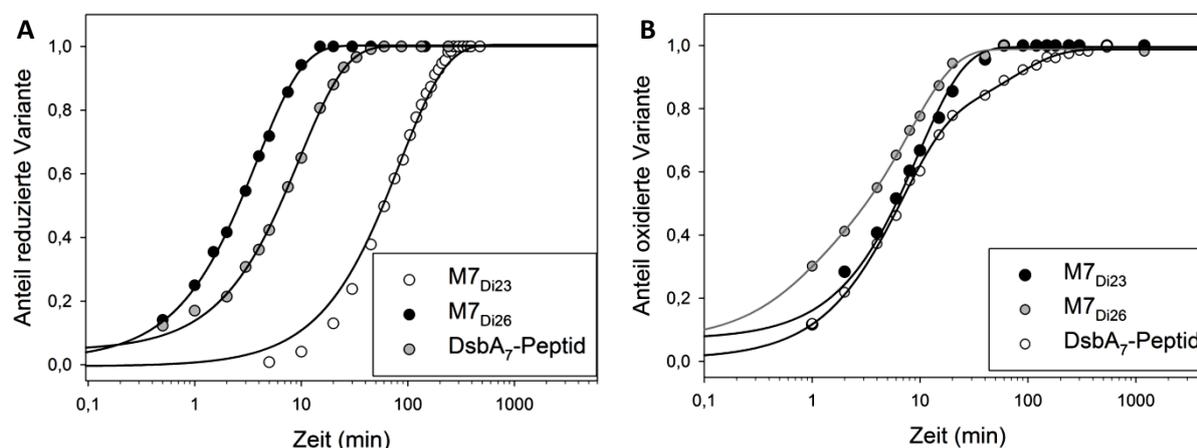
#### 4.3.6.2. Reduktions- und Oxidationskinetik mit DTT

In diesen Versuchen lag der Fokus auf den DsbA-Varianten mit der CPHC-Tetrapeptidsequenz. Es wurden M7<sub>Di26</sub> ( $E^\circ = -208$  mV) und M7<sub>Di23</sub> ( $E^\circ = -255$  mV) untersucht, die die obere und untere Grenze im Spektrum der Redoxpotentiale darstellen. Ebenso wurde das DsbA<sub>7</sub>-Peptid als Modell für den denaturierten Zustand der Proteinvarianten eingesetzt. Thioredoxinvarianten wurden nicht verwendet, da diese sich im Vorfeld als schlecht handhabbar erwiesen und die hier genutzte rpHPLC basierende Auswertung wenig praktikabel wäre.

Die Reduktionskinetik der Varianten beschreibt die Zugänglichkeit der CXXC-Disulfidbrücke und das Potential ihrer Abgangsgruppe, d.h., wie gut wird das Thiolat oder das Thiol der Cysteine in den Varianten nach der Trennung der intramolekularen Disulfidbrücke stabilisiert. Schematisch werden die Teilreaktionen der Redoxreaktion der Varianten mit DTT in Abbildung 4.3.6- IV zusammengefasst. Die Reduktion der oxidierten Variante verläuft in zwei Abschnitten (Abbildung 1.3- II und Abbildung 4.3.6- IV). Die erste Reaktion führt zum gemischten Disulfid und die zweite zur Trennung desselben. Bei der ersten Reaktion handelt es sich um eine Überschussreaktion durch DTT<sub>RED</sub> (Reaktion pseudo-1. Ordnung). Die Trennung des gemischten Disulfids ist eine intramolekulare Reaktion 1. Ordnung. In der rpHPLC wurde das gemischte Disulfid nicht beobachtet. Ursächlich hierfür ist wohl die thermodynamisch stark favorisierte intramolekulare Disulfidverbrückung im oxidierten DTT, wodurch die Spaltung des gemischten Disulfids zu schnell ist, und nur die Bildung des gemischten Disulfids bzw. der ersten Teilreaktion bestimmbar war. Die erste Teilreaktion, die Öffnung der intramolekularen Disulfidbindung des CXXC-Motivs kann theoretisch zwei Produkte liefern, je nachdem welches der C<sub>1</sub>XXC<sub>2</sub>-Cysteine die Abgangsgruppe stellt. Daher wurden die Progresskurven nach einer doppelten Reaktion pseudo-1. Ordnung ausgewertet (Gleichung 3-XXIV; siehe 3.5.3.2). Abbildung 4.3.6- III zeigt exemplarisch die Progresskurven der Reduktion von M7<sub>Di26</sub>, M7<sub>Di23</sub> und dem DsbA-Heptapeptid mit 250  $\mu$ M DTT<sub>RED</sub> bei pH 7.0 und 20 °C. Keine der Kinetiken

konnte mathematisch in ihren Teilreaktionen aufgelöst werden. Deswegen setzt sich die ermittelte Geschwindigkeitskonstante ( $k$ ) aus den beiden möglichen Teilreaktionen der beiden CXXC-Cysteine zur intermolekularen Disulfidbildung zusammen. Die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung sind in Tabelle 4.3- V dargestellt. Messungen mit 1 mM  $\text{DTT}_{\text{RED}}$  führten zu identischen Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung (Daten nicht gezeigt).

Der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der CXXC-Varianten spiegelt deren Unterschiede im Redoxpotential wieder. Das stärkste Oxidationsmittel ( $\text{M7}_{\text{Di26}}$ ) weist die schnellste Reduktion seiner Disulfidbrücke auf. Der umgekehrte Fall gilt für das reduzierendere  $\text{M7}_{\text{Di23}}$ . Das  $\text{DsbA}_7$ -Peptid liegt in der Reaktivität zwischen den Proteinvarianten. Die Reaktionstemperaturerhöhung um 10 °C verdoppelte in etwa die Geschwindigkeitskonstanten. Deutlich heben sich die Geschwindigkeitskonstanten gegenüber den Wildtyp-CXXC-Oxidoreduktasen ab, die 2 (Thioredoxin) bzw. 4 Größenordnungen ( $\text{DsbA}$ ) schneller reduziert werden. Im Vergleich, weisen die CXXC-Varianten jedoch eine moderat höhere Reaktivität gegenüber  $\text{DTT}_{\text{RED}}$  auf als  $\text{GSSG}^{129}$  (Tabelle 4.3- V), das als Modell für unspezifische Wechselwirkungen frei zugänglicher Disulfidbindungen dient.



**Abbildung 4.3.6- III: Progresskurven der Reduktion und Oxidation von CPHC-Varianten mit DTT.** **A)** Zeigt den Anteil an reduzierter Variante in Abhängigkeit der Zeit in der Reaktion von 20  $\mu\text{M}$  oxidiertem CPHC-Variante mit 250  $\mu\text{M}$   $\text{DTT}_{\text{RED}}$  bei 20 °C in PBS (pH 7.0). **B)** Stellt den normierten Anteil an oxidiertem Variante in Abhängigkeit der Zeit aus der Reaktion von 20  $\mu\text{M}$  reduziertem CPHC-Variante mit 80 mM  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  bei 30 °C in PBS (pH 7.0) dar. Die Inkubation wurde mit 1/10 Volumen 200 mM HCl abgestoppt und die Anteile reduzierter bzw. oxidiertem Spezies über rpHPLC quantifiziert. Die Auswertung der Progresskurven erfolgte nach einer biphasischen Reaktion pseudo-1. Ordnung über Gleichung 3-XXIV. Die Geschwindigkeitskonstanten ( $k$ ,  $l$ ) wurden in Konstanten 2. Ordnung ( $k_2$ ,  $l_2$ ) durch Division von  $k$  und  $l$  mit der DTT-Konzentration (in Molar) nach Holmgren (1979)<sup>136</sup> umgewandelt (Tabelle 4.3- V).

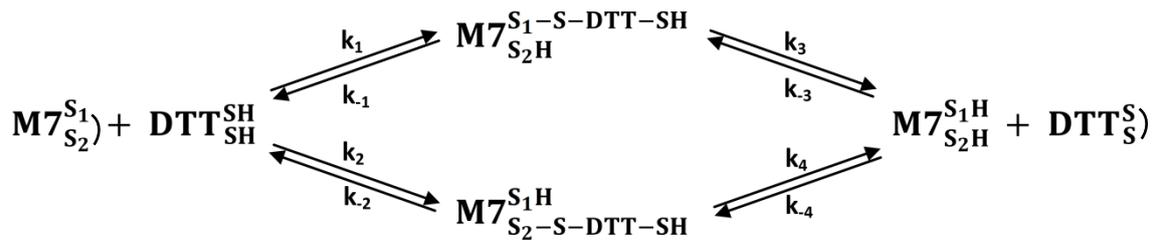
**Tabelle 4.3- V: Geschwindigkeitskonstanten der Redoxreaktionen von CXXC-Varianten**

Variante	Reduktion ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durch $\text{DTT}_{\text{RED}}$		Oxidation ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durch $\text{DTT}_{\text{OX}}$ (30 °C)			
	$k_2$ (20 °C)	$k_2$ (30 °C)	$k_2$	$B_{\text{max}}$ ( $k_2$ )	$l_2$	$C_{\text{max}}$ ( $l_2$ )
$\text{M7}_{\text{Di26}}$	$16 \pm 0.3$	$38 \pm 0.3$	$0.285 \pm 0.075$	0.20	$0.025 \pm 0.013$	0.72
$\text{DsbA}_7$	$7 \pm 0.2$	$18 \pm 0.5$	$0.033 \pm 0.002$	0.73	$0.005 \pm 0.002$	0.25
$\text{M7}_{\text{Di23}}$	$1 \pm 0.1$	$2 \pm 0.1$	$0.048 \pm 0.017$	0.38	$0.015 \pm 0.005$	0.58
$\text{DsbA}^{144}$	/	120 000*	/	/	/	/
$\text{Trx}^{105}$	1 650**	/	/	/	/	/
$\text{GSSG}^{129}$	/	0.4***	/	/	/	/

\* - pH 6.0, 30 °C; \*\* - pH 7.0, 23 °C; \*\*\* - pH 7.0, 30 °C;  $B_{\text{max}}$  bzw.  $C_{\text{max}}$  - Amplituden nach Gleichung 3-XXIV

Die Oxidationskinetik, bzw. das Maß wie schnell die Varianten eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden, wird insbesondere durch den Anteil reaktiver Cysteine bestimmt. Für die vollständige Oxidation zur intramolekularen Disulfidbrücke ist es erforderlich, dass beide CXXC-Cysteine in der Thiolatform vorliegen (Abbildung 1.3- II-A). DTT besitzt ein hohes Reduktionspotential ( $E^\circ = -314 \text{ mV}$ ) weshalb die Oxidation der Varianten nur unter hohen  $\text{DTT}_{\text{OX}}$ -Konzentrationen (80 mM) bei 30 °C messbar war. Abbildung 4.3.6- III-B stellt die normierten Oxidationsverläufe von  $\text{M7}_{\text{Di23}}$ ,  $\text{M7}_{\text{Di26}}$  und  $\text{DsbA}_7$ -Peptid dar. Während der rpHPLC-Trennung des Redoxansatzes wurden erneut keine gemischten Disulfide beobachtet. Allerdings wurde deutlich, dass 80 mM  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  nicht zur vollständigen Oxidation von  $\text{M7}_{\text{Di26}}$  und  $\text{DsbA}_7$  ausreichen (Daten nicht gezeigt).  $\text{M7}_{\text{Di26}}$  lag im Gleichgewicht zu 65 % und das  $\text{DsbA}_7$ -Peptid zu 80 % oxidiert vor.  $\text{M7}_{\text{Di23}}$  wurde vollständig oxidiert. Die Kinetiken sind im Vergleich zur Reduktion (Abbildung 4.3.6- III-A) biphasisch. Auf Grund der nicht populierten gemischten Disulfide entsprechen die beiden resultierenden Geschwindigkeitskonstanten ( $k_2$  und  $l_2$ ) dem nukleophilen Angriff der beiden CXXC-Cysteine auf die DTT-Disulfidbindung. Welches der beiden Cysteine (N- oder C-terminal) als erstes reagiert, lässt sich nur für  $\text{M7}_{\text{Di26}}$  vermuten, da für diese Variante die Einzelsysteinvarianten vorliegen. Der  $\text{pK}_a$ -Wert des C-terminalen Cysteins liegt bei  $\approx 7.3$ , des N-terminalen hingegen bei  $\approx 8.7$ , wodurch für das C-terminale Cystein ca. 25-fach mehr Thiolat-Ionen vorliegen. Dieser Unterschied spiegelt gut den Unterschied der beiden Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  und  $l_2$  wider. Die Amplituden der Teilreaktionen (Tabelle 4.3- V) zeigen allerdings, dass die schnellere Reaktion nur zu 20 % zur vollständigen Oxidation von  $\text{M7}_{\text{Di26}}$  beiträgt. Annähernd gleich ist die Aufspaltung der Amplituden für  $\text{M7}_{\text{Di23}}$ . Das  $\text{DsbA}$ -Peptid hingegen erzeugt den Großteil an oxidiertem Produkt über die schnelle Phase. Diese Unterschiede könnten sterisch begründet sein und auf Abweichungen im Reaktionsverlauf hindeuten. Die Oxidationskinetiken für  $k_2$  sind im Vergleich zur Reduktion mit dem Faktor 40 bis 540 bedeutend langsamer. Überraschend zeigt  $\text{M7}_{\text{Di26}}$  abermals, wie bei der Reduktion, die schnellsten Kinetiken, obwohl diese Variante das oxidierendste Redoxpotential aller Varianten besitzt. Die Variante  $\text{M7}_{\text{Di23}}$  hingegen wird nur geringfügig schneller oxidiert als das Peptid.

Die Oxidationskinetik der Varianten mit  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  geben in der Reihenfolge ihrer Geschwindigkeitskonstanten  $\text{DsbA}(\text{wt}) > \text{M7}_{\text{Di26}} > \text{M7}_{\text{Di23}} > \text{DsbA}_7$ -Peptid den Verlauf der Oxidation mit DTNB bei pH 7.0 wider (Tabelle 4.3- IV). Ob es, wie für  $\text{DsbA}(\text{wt})$  postuliert, bei der DTNB-vermittelten Oxidation ebenfalls zur Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke in den CXXC-Varianten kommt oder ob beide Cysteine mit TNB ein gemischtes Disulfid eingehen, wurde nicht geklärt. Welcher Verlauf wahrscheinlicher ist, lässt sich nur vermuten. Dass keine gemischten Disulfide in der DTT-Reaktion beobachtet werden, bedeutet, dass diese instabil sind, begründbar durch die hohe Tendenz zur Bildung der intramolekularen Disulfidbrücke im DTT. Die stark bevorzugte Rückreaktion könnte die geringen Geschwindigkeitskonstanten der Oxidation durch  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  verursachen. Der Reaktionsverlauf zwischen  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  und den Varianten lässt sich nur bedingt auf die DTNB-Reduktion übertragen, da das gemischte Disulfid mit TNB wesentlich stabiler sein sollte und somit durchaus beide CXXC-Cysteine mit TNB gleichzeitig modifiziert vorliegen könnten.

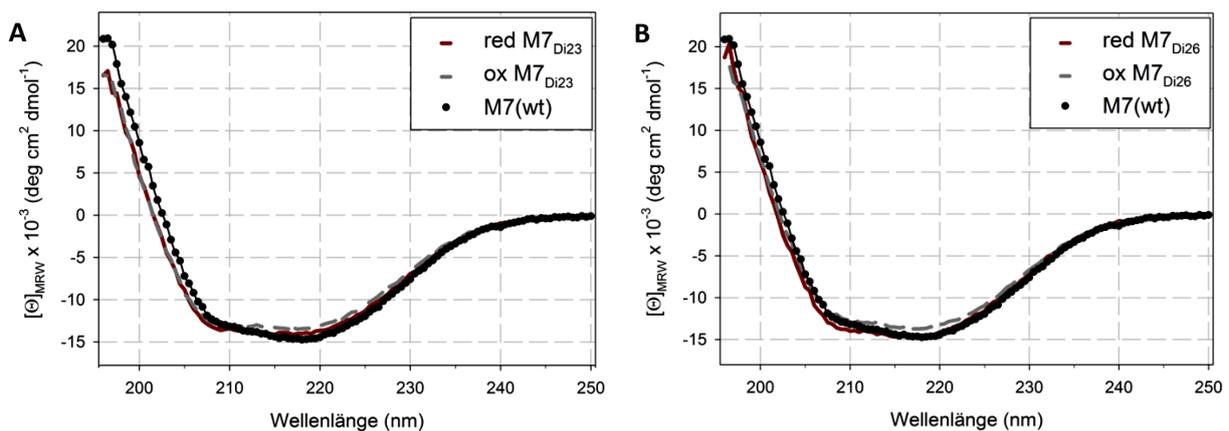


**Abbildung 4.3.6- IV: Reaktionsschema der M7-Redoxvarianten mit DTT.** Die Bildung des gemischten Disulfids kann über das N- ( $S_1$ ) oder das C-terminale Cystein ( $S_2$ ) der CXXC-Sequenz erfolgen. Bestimmt wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Reduktion von oxidierten M7 mit reduzierten DTT. Für  $M7_{D126}$  lag diese beispielsweise bei  $38 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Dabei beinhaltet diese Geschwindigkeitskonstante sowohl  $k_1$  und  $k_2$ . Die Teilreaktionen  $k_3$  und  $k_4$  sind nicht geschwindigkeitsbestimmend und wurden nicht beobachtet. Für die deutlich langsamere Oxidation von reduziertem M7 mit  $\text{DTT}_{\text{ox}}$  wurden für  $M7_{D126}$  zwei Geschwindigkeitskonstanten mit  $0.285 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $0.025 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  bestimmt. Diese beschreiben die Teilreaktionen  $k_3$  und  $k_4$ , sind allerdings mit derzeitiger Datenlage keinem Cystein spezifisch zuordenbar. Reaktionen  $k_1$  und  $k_2$  werden wiederum nicht beobachtet.

#### 4.4. Strukturanalyse der Protein- und Peptidvarianten

##### 4.4.1. Sekundärstrukturanalyse der CXXC-Proteine

Die katalytische CXXC-Sequenz der Wildtyp Oxidoreduktasen ist in einer  $\alpha$ -Helix lokalisiert. Durch die Übertragung dieses Tetrapeptids in die M7-Struktur könnte sich mutmaßlich vor allem der  $\alpha$ -helikale Anteil in der Gesamtstruktur ändern. Desweiteren sind Strukturveränderungen durch den Wechsel des Redoxzustands möglich. Diese Fragestellung wurde über Fern-UV-CD-Spektroskopie untersucht (siehe 3.5.1.3.1).



**Abbildung 4.4.1- I: Sekundärstrukturbestimmung von  $M7_{D123}$  und  $M7_{D126}$ .** Dargestellt werden die Fern-UV-CD-Spektren von  $M7_{D123}$  (A) und  $M7_{D126}$  (B). Der  $M7(\text{wt})$  wird ebenfalls abgebildet ( $\bullet$ ). Die Proteine wurden in ihrer oxidierten (graue Linie) und reduzierten Form (rote Linie) untersucht. Die Reduktion mit 1 mM TCEP erfolgte im Vorfeld für 2 h (RT).  $M7(\text{wt})$  wurde  $14.7 \mu\text{M}$ ,  $M7_{D123}$  mit  $16.2 \mu\text{M}$  und  $M7_{D126}$  mit  $13.6 \mu\text{M}$  eingesetzt. Die Spektroskopie wurde in 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7.0 und  $20^\circ\text{C}$  in 1 mm-Küvetten folgend durchgeführt:  $\geq 30$  Akkumulationen; 50 nm/min Schrittgeschwindigkeit; 0.5 nm Schrittweite; 0.5 s Datenintegration; Dynodenspannung  $< 600$  Volt. Die Spektren wurden um ihr Puffersignal korrigiert.

In Abbildung 4.4.1- I sind die Fern-UV-CD-Spektren exemplarisch von M7<sub>Di23</sub> und M7<sub>Di26</sub> in oxidiert und reduzierter Form gezeigt. Zwischen der reduzierten und oxidierten Form ist lediglich ein sehr geringer Elliptizitätsunterschied zu erkennen. Dieser Unterschied führt zu keinem veränderten Verlauf der Spektren, lediglich der Betrag der Elliptizität unterscheidet sich. Die Spektren der oxidierten und reduzierten Spezies von den Varianten M7<sub>Di24</sub>, <sup>-</sup>Di25, <sup>-</sup>Di23, <sup>-</sup>T23 und M7<sub>Ti26</sub>, sind deckungsgleich im Vergleich der Redoxzustände (Anhang Abbildung 7.7- I-A bis -C). Desweiteren sind die Spektren der oxidierten Formen aller DsbA-Insertionsvarianten nahezu identisch (Anhang Abbildung 7.7- I-D).

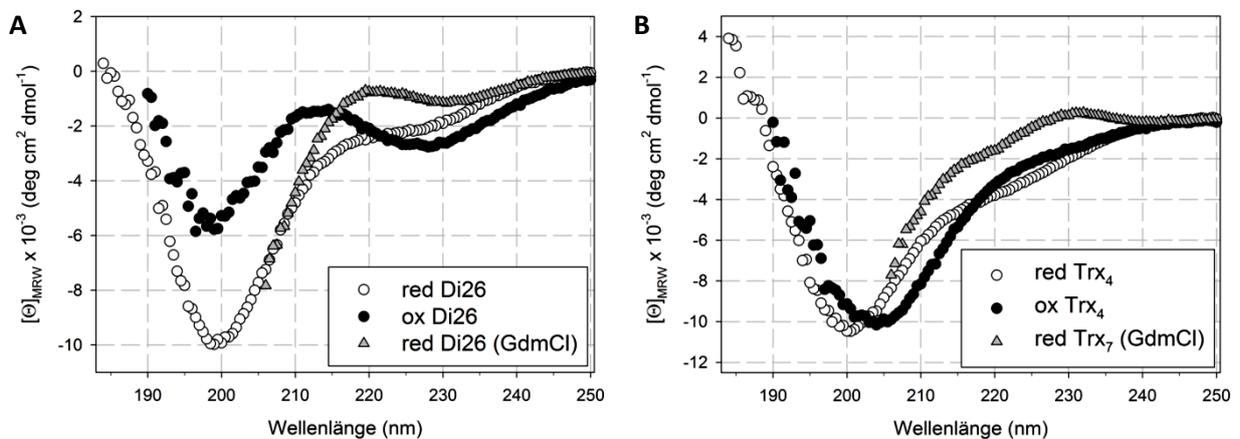
Im Vergleich ähneln die Spektren der Insertionsvarianten dem des M7(wt), jedoch sind diese nicht identisch. Für die oxidierte Form der DsbA-(Di)-Varianten kommt es im Bereich von 210 bis 230 nm, sowie bei 195 nm zur Abnahme der Elliptizität (Anhang Abbildung 7.7- I-D). Dies könnte zum Einen auf einen steigenden *random coil*-Anteil im Protein deuten. Desweiteren sind die isolierten CXXC-Sequenzen der Redoxpeptide in Abhängigkeit ihres Redoxzustandes in der Lage Turn-Strukturen auszubilden, die in den hier angesprochenen Bereichen von 210 bis 230 nm CD-Signale generieren. Die Sekundärstrukturen der Peptide werden im folgenden Kapitel 4.4.2 detailliert behandelt. Die Substitutionsvarianten zeigen einen Verlauf der im Falle von M7<sub>Di23</sub> völlig identisch dem M7(wt) ist und bei M7<sub>T23</sub> nur kleine Abweichungen aufweist (Anhang Abbildung 7.7- I-A, -B). Zusammenfassend sind die hier diskutierten Unterschiede der M7-Varianten in der CD-Analyse gering und dürfen nicht überinterpretiert werden. Entscheidend ist, dass in allen getesteten Varianten die grundlegende M7-Sekundärstruktur erhalten scheint.

#### 4.4.2. Sekundärstrukturanalyse der CXXC-Peptide

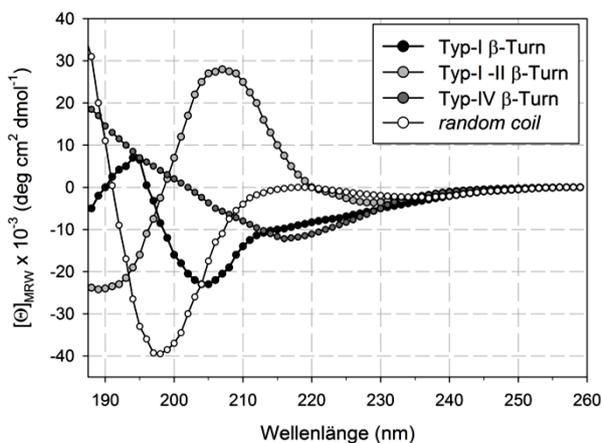
Die CXXC-Peptide stellen in dieser Arbeit das Modell des denaturierten Zustands der CXXC-Varianten. Der denaturierte Zustand ist aber keinesfalls strukturlos und vor allem das Dipeptid (XX) zwischen den Cysteinresten der CXXC-Sequenz könnte direkten Einfluss auf mögliche Konformationen der Peptide bzw. der Proteine im denaturierten Zustand nehmen. Um dies zu testen wurden Fern-UV-CD-Spektren der Peptide in ihrer oxidierten und reduzierten Form aufgenommen. Gemessen wurde sowohl unter Nativbedingungen, als auch in Guanidiniumchlorid-Puffer (6 M GdmCl; 5 mM TCEP) um den *random coil*-Zustand zu erreichen (siehe 3.5.1.3.2). Abbildung 4.4.2- I zeigt die Fern-UV-CD-Spektren der DsbA-basierenden CPHC-Peptide am Beispiel vom Di26-Peptid, Thioredoxin-CGPC-Peptide werden repräsentiert durch Trx<sub>4</sub> und Trx<sub>7</sub>. Peptide mit der identischen CXXC-Sequenz liefern deckungsgleiche Verläufe in ihren Spektren, jedoch mit Unterschieden in den Elliptizitäts-Intensitäten (Daten nicht gezeigt).

Der Vergleich mit Beispielen für verschiedene  $\beta$ -Turn-Typen aus der Literatur<sup>145,146</sup> (Abbildung 4.4.2- I) legt nahe, dass die reduzierten Formen der CXXC-Peptide hauptsächlich Typ-I  $\beta$ -Turns bilden, die gleichzeitig ungeordnete Strukturen enthalten (Kurve (●) in Abbildung 4.4.2- II). Durch Oxidation der Cysteine verschiebt sich das Spektrum der DsbA-Peptide entsprechend einer Mischung aus Typ-I und -II  $\beta$ -Turns (Kurve (●) in Abbildung 4.4.2- II). Desweiteren weist das Minimum bei 228 nm im DsbA-Peptid auf die Ausbildung einer rechtsgängigen Disulfidbindung hin<sup>147</sup>, eine Anordnung, die auch so in den Wildtyp-Oxidoreduktasen vorliegt. Über rpHPLC wurde bestätigt, dass die Oxidation der DsbA-Peptide durch Wasserstoffperoxid eine homogene monomere oxidierte Spezies liefert (Daten nicht gezeigt). Im Fall der Trx-Peptide kommt es im Zuge der Wasserstoffperoxid-Oxidation zur Bildung einer Mischung von oxidiertem Monomer (1 Anteil) und cyclischem Dimer (2 Anteile). Dies wurde mittels rpHPLC und Massenspektrometrie bestimmt (Daten nicht gezeigt). Im CD-

Spektrum führt das zu einer Verschiebung des Minimums von 200 nm auf 205 nm. Diese Verschiebung kann auf einen gestiegenen Typ-IV  $\beta$ -Turn-Anteil hinweisen (Kurve (●) in Abbildung 4.4.2- II). Allerdings scheinen weiterhin hauptsächlich  $\beta$ -Turn Typen-I und -II zu überwiegen, da der grundlegende Verlauf des Spektrums dem des reduzierten Trx-Peptids stark ähnelt. Unter denaturierenden Bedingungen (6 M GdmCl; 5 mM TCEP) entspricht das Spektrum der DsbA-Peptide dem des unstrukturierten Modells eines *random coils* (Kurve (o) in Abbildung 4.4.2- II).  $\beta$ -Turn-Strukturen scheinen nicht mehr populiert vorzuliegen. Das Spektrum des Trx-Peptids unter denaturierenden Bedingungen ähnelt dem Verlauf des *random coil*-Modells. Die vorliegenden Abweichungen weisen darauf hin, dass weiterhin strukturierte Bereiche vorliegen können. Zusätzlich kann im Trx<sub>7</sub>-Peptid das vorhandene Tyrosin ein positives CD-Signal um 226 nm generieren<sup>148</sup>.



**Abbildung 4.4.2- I: Fern-UV-CD-Spektren der CXXC-Peptide.** Gezeigt werden die Spektren der **A)** DsbA-Peptide am Beispiel des Di26-Peptids und **B)** der Thioredoxin-Peptide (Trx) unter reduzierenden (5 mM TCEP) (o); oxidierenden (1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (●) und unter denaturierenden Bedingungen (6 M GdmCl; 5 mM TCEP) (graue Δ). Für Trx<sub>4</sub> konnte kein Spektrum unter denaturierenden Bedingungen aufgenommen werden, daher wird das Trx<sub>7</sub>-Peptid gezeigt. Die genaue Pufferzusammensetzung ist unter 3.5.1.3.2 zu finden. Gemessen wurde in 1 mm-Küvetten mit  $\approx 2.5$  mg/ml ( $\approx 3$  mM) Peptid bei 20 °C und folgenden Parametern:  $\geq 30$  Akkumulationen; 50 nm/min Schrittgeschwindigkeit; 0.5 nm Schrittweite; 0.5 s Datenintegration; Dynodenspannung < 600 Volt.



**Abbildung 4.4.2- II: Gezeigt werden die Fern-UV-CD-Spektren von  $\beta$ -Turn-Beispielen nach Brahms and Brahms (1980)<sup>145</sup> und Perczel and Fasman (1992)<sup>146</sup>.** Von Brahms and Brahms (1980)<sup>145</sup> stammen das Spektrum (●) der Typ-I und -II  $\beta$ -Turn Mischung von poly(Ala<sub>2</sub>-Gly<sub>2</sub>), das hier mit 0.5-facher Intensität dargestellt ist, und das Spektrum (●) des cyclischen Hexapeptids D-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Ala-D-Ala-L-Ala, das Typ-IV  $\beta$ -Turns bildet. Aus Perczel and Fasman (1992)<sup>146</sup> wurden die Spektren des Typ-I  $\beta$ -Turns (●) und das des *random coils* (o) verwendet. Für mehr Details und weitere Spektren siehe Originalliteratur.

#### 4.4.3. NMR-spektroskopische Untersuchungen der CXXC-Varianten

Ausgehend von der Fern-UV-CD-Spektroskopie (Kapitel 4.4.1) scheinen die Sekundärstrukturanteile der Redoxvarianten und von M7(wt) sehr ähnlich zu sein. Weiterführend wurde die NMR-Spektroskopie genutzt um tiefere Einblicke in die strukturelle Bedeutung der CXXC-Sequenz zu erhalten. Aus dem DsbA-Variantenpool wurden das stärkste Oxidans ( $M7_{D126}$ ) und das stärkste Reduktionsmittel ( $M7_{D123}$ ) unter verschiedenen Bedingungen NMR-spektroskopisch untersucht. Die Zuordnung von Aminosäuren und NMR-Kreuzsignale wurde von S. Gröger und M. Baumann (AG Balbach; Institut für Physik der MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt. Leider konnten für einzelne Bereiche der Redoxvarianten keine Kreuzsignale detektiert werden. Dies betrifft ebenfalls das implementierte CXXC-Tetrapeptid. Für keine Variante wurde die dreidimensionale Struktur gelöst. Zum jetzigen Zeitpunkt werden Vergleiche anhand der chemischen Verschiebung der einzelnen Reste getroffen, um aus diesen potentielle Änderungen in Sekundär- und Tertiärstruktur abzuleiten. Zur besseren Visualisierung möglicher Strukturänderungen der Redoxvarianten wurden diese Unterschiede auf die PDB-Struktur von M7(wt) (pdb: 2JVF) übertragen.

##### 4.4.3.1. Definition der Signifikanzgrenzen der $\Delta_{av(NH)}$ - und $\Delta_{av(CNH)}$ -Werte

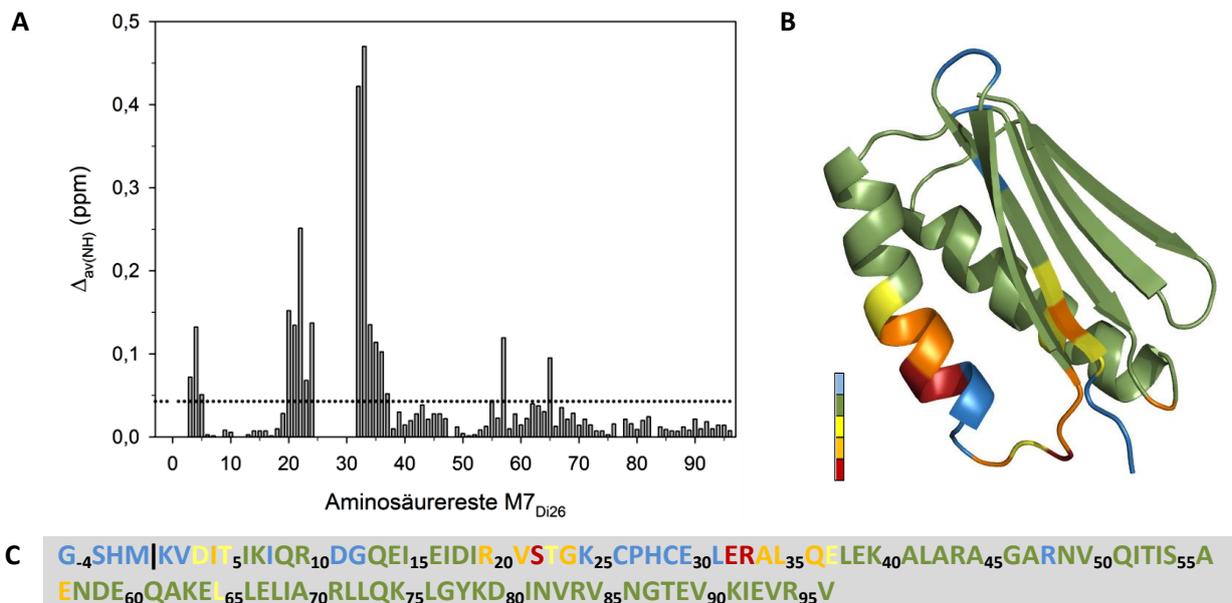
Für alle Vergleiche zwischen den Proteinen ist es nötig eine Grenze zu definieren, ab der Unterschiede in den chemischen Verschiebungen einzelner Reste signifikant sind. Hierfür wurden Messungen von  $^{15}\text{N}$ -markiertem oxidiertem  $M7_{D126}$  aus unterschiedlichen Proteinreinigungen unter gleichen Messbedingungen (pH 7; 20 °C,  $\approx 600 \mu\text{M}$   $M7_{D126}$ , 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 8 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 0.05 %  $\text{NaN}_3$ ) verglichen (Anhang Abbildung 7.9- I). Die durchschnittliche chemische Verschiebung der Amid  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -Kerne ( $\Delta_{av(NH)}$ ) ist ein Maß für Konformationsänderungen, die jeder einzelne Rest im Vergleich der beiden Messungen vollzieht. Diese Strukturänderung kann sowohl die direkte Konformation der Reste oder deren physikochemische Umgebung betreffen. Die  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte wurden mittels einer Wichtungsfunktion nach Gleichung 3-XXV bestimmt (siehe 3.5.4). In den Vergleichsmessungen ergab sich ein maximaler Unterschied im  $\Delta_{av(NH)}$ -Wert von 0.12 ppm. Betrachtet man die Lage der Reste mit Unterschieden von circa 0.10 ppm in der ursprünglichen M7(wt)-Struktur (Anhang Abbildung 7.9- I), so wird deutlich, dass diese sich innerhalb von Loops und Turns befinden würden. Für Reste von  $M7_{D126}$ , die in der Sequenz dem ursprünglichen M7(wt)  $\beta$ -Faltblatt und den beiden Helices entsprechen, ergab sich eine gemittelte durchschnittliche chemische Verschiebung  $\phi(\Delta_{av(NH)})$  von  $\approx 0.024$  ppm. Eindeutig ist die Festlegung der Signifikanzgrenzen nicht, daher dient die Abgrenzung eher als Orientierung für die Deutung der Ergebnisse dieses Kapitels. Reste mit größeren strukturellen Änderungen sind mit  $\Delta_{av(NH)}$ -Wert  $> 0.10$  ppm zu erwarten. Hingegen weisen stabilere Bereiche mit geringen konformationellen Änderungen  $\Delta_{av(NH)}$ -Wert um  $\approx 0.025$  ppm auf. Für Änderungen, die  $^{13}\text{C}$ -Kerne betreffen ( $\Delta_{av(CNH)}$ ), fehlt es an einer vergleichbaren Messung. Daher wurden auch hier die Signifikanzgrenzen der  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte verwendet.

##### 4.4.3.2. NMR-spektroskopische Vergleich zwischen Redoxformen von $M7_{D126}$ und $M7_{D123}$

###### Vergleich von reduziertem und oxidiertem $M7_{D126}$

Für  $M7_{D126}$  konnten der oxidierten Form 83 von 96 Resten und der reduzierten Spezies 85 von 96 Resten zugeordnet werden (Anhang Abbildung 7.11- II und Tabelle 7.10- I). Der Unterschied in der chemischen Verschiebung der Amid  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -Kerne von oxidiertem und reduziertem  $M7_{D126}$  wird

in Abbildung 4.4.3- I gezeigt. In der Gesamtheit ändert sich das Proteinerückgrat durch den Wechsel zwischen den Redoxzuständen nur gering, wie durch die gemittelte durchschnittliche chemische Verschiebung ( $\overline{\Delta_{av(NH)}}$ ) von 0.043 ppm deutlich wird (Abbildung 4.4.3- I-A). Das CPHC-Tetrapeptid und seine terminalen Reste wurden in der NMR-Spektroskopie nicht detektiert. Allerdings gibt es Bereiche im Protein, die größere Änderungen aufweisen. Die Übertragung der  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte auf die M7(wt)-Struktur (Abbildung 4.4.3- I-B) verdeutlicht, dass der Wechsel des Redoxzustands hauptsächlich Reste in ihrer Konformation beeinflusst, die sich in räumlicher Nähe zum Redoxzentrum befinden. Die größten Änderungen werden im N-Terminus von  $\alpha_1$ -Helix, im vorangehenden Loop und am N-Terminus von  $\beta_1$ -Strand beobachtet. Es ist davon auszugehen, dass ebenso das Peptidrückgrat der CPHC-Sequenz durch die Redoxreaktion signifikante Änderungen ( $> 0.10$  ppm) aufweist. Hingegen ist der C-terminale Bereich von M7<sub>Di26</sub> (ab Leu<sup>37</sup>) nahezu unverändert. Die Auswertung der durchschnittlichen chemischen Verschiebung der <sup>13</sup>C $\alpha$ -, <sup>13</sup>C $\beta$ -, <sup>15</sup>N- und <sup>1</sup>H<sup>N</sup>-Kerne ( $\Delta_{av(CNH)}$ ) zeigt ein sehr gut vergleichbares Bild. Signifikante Änderungen ( $> 0.10$  ppm) treten auch hier hauptsächlich in räumlicher Umgebung der CPHC-Insertion auf (Anhang Abbildung 7.9- II).



**Abbildung 4.4.3- I: Strukturvergleich der Redoxzustände von M7<sub>Di26</sub> mittels NMR-Spektroskopie.**

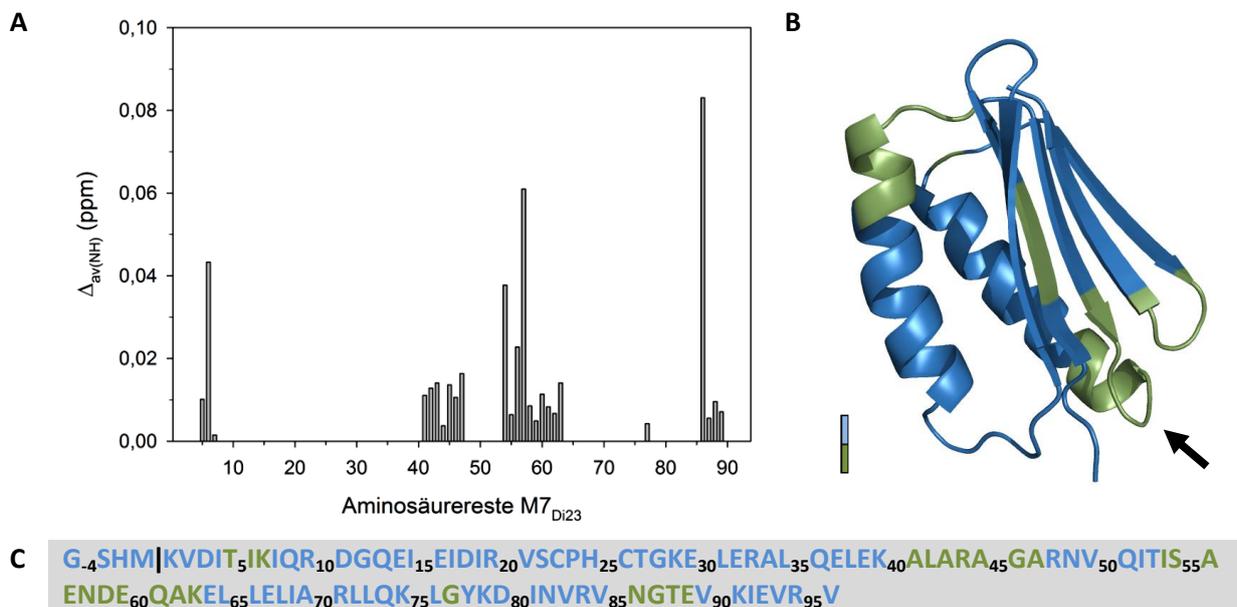
**A)** Dargestellt wird für die einzelnen Reste von M7<sub>Di26</sub> die Differenz der chemischen Verschiebung des oxidierten und reduzierten Zustands bzw. die durchschnittliche chemische Verschiebung der Amid <sup>15</sup>N- und <sup>1</sup>H<sup>N</sup>-Kerne ( $\Delta_{av(NH)}$ ) nach Gleichung 3-XXV (siehe 3.5.4). Die Messungen wurden in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 % D<sub>2</sub>O, 0.05 % NaN<sub>3</sub>, pH 7.0 (20°C) durchgeführt. Die gepunktete Linie bei 0.043 ppm entspricht dem  $\overline{\Delta_{av(NH)}}$ -Wert. **B)** Die  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte sind mittels Farbskala in der M7(wt)-NMR-Struktur (pdb: 2JVF) dargestellt. Blau: Reste nicht zuordenbar; Grün:  $\Delta_{av(NH)} < 0.043$  ppm; Gelb:  $\Delta_{av(NH)} > 0.043$  ppm; Orange:  $\Delta_{av(NH)} > 0.10$  ppm; Rot:  $\Delta_{av(NH)} > 0.25$  ppm. **C)** Sequenz von M7<sub>Di26</sub> in Farbgebung von (B). Die M7-Struktur beginnt am Lys<sub>1</sub> (K<sub>1</sub>).

### Vergleich von reduziertem und oxidiertem M7<sub>Di23</sub>

Für M7<sub>Di23</sub> in seiner oxidierten Form konnten 89 von 96 Resten zugeordnet werden. Allerdings wurde auch hier das CPHC-Tetrapeptid praktisch nicht detektiert (Anhang Abbildung 7.11- I-A und Tabelle 7.10- I). Lediglich der C $\alpha$ -Kern des C-terminalen Cysteins in der CXXC-Sequenz gab ein zuordenbares Signal. Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Proteinen in der NMR-Spektroskopie,

wies die reduzierte Form bedeutend mehr Signale auf, als dass diese von nur einer einzelnen Konformation stammen können (Anhang Abbildung 7.11- I-B). Die Signale überlagerten sich, so dass für lediglich 26 von 96 Resten eine Zuordnung zweifelsfrei möglich war (Anhang Tabelle 7.10- I). Mitunter konnten mehrere Kreuzsignale spezifischen Resten zugewiesen werden. Daraus ergebend liegen für sechs Reste zwei Konformationen und für drei Reste drei Konformationen vor (Anhang Tabelle 7.10- I). Reste mit multiplen Konformationen befinden sich am C-terminalen Ende von  $\beta_3$ -Strang und dem folgenden Loop und der anschließenden  $\alpha_2$ -Helix (Abbildung 4.4.3- II-B). Die Konformationen unterscheiden sich mit bis zu 3 ppm für jeweils  $\Delta_{av(CNH)}$ - und  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte. Durch die hohe Anzahl an Kreuzsignalen ist davon auszugehen, dass sehr viele weitere Reste in mehreren populierten Konformationen zur gleichen Zeit vorkommen werden. Hingegen wird das Protein durch die Disulfidverbrückung in einer Struktur fixiert. Anhand der vorliegenden Daten lässt sich nicht abschätzen zu welchen Anteilen die einzelnen Konformationen vorliegen und ob diese untereinander in einem definierten Gleichgewicht stehen.

Die chemischen Verschiebungen der 26 zugewiesenen Reste des reduzierten Zustands wurden mit den entsprechenden Kreuzsignalen des oxidierten Zustands verglichen. Die  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte (Abbildung 4.4.3- II-A) zeigen, dass diese Reste im reduzierten Zustands in ihrer Konformation dem oxidierten Zustand ähnlich sind ( $\Delta_{av(NH)}$ -Werte  $< 0.1$  ppm). Dennoch können die erhaltenen Daten zum Vergleich der Redozustände von M7<sub>D123</sub> nur einen Bruchteil der realen Situation wiedergeben (Abbildung 4.4.3- II).

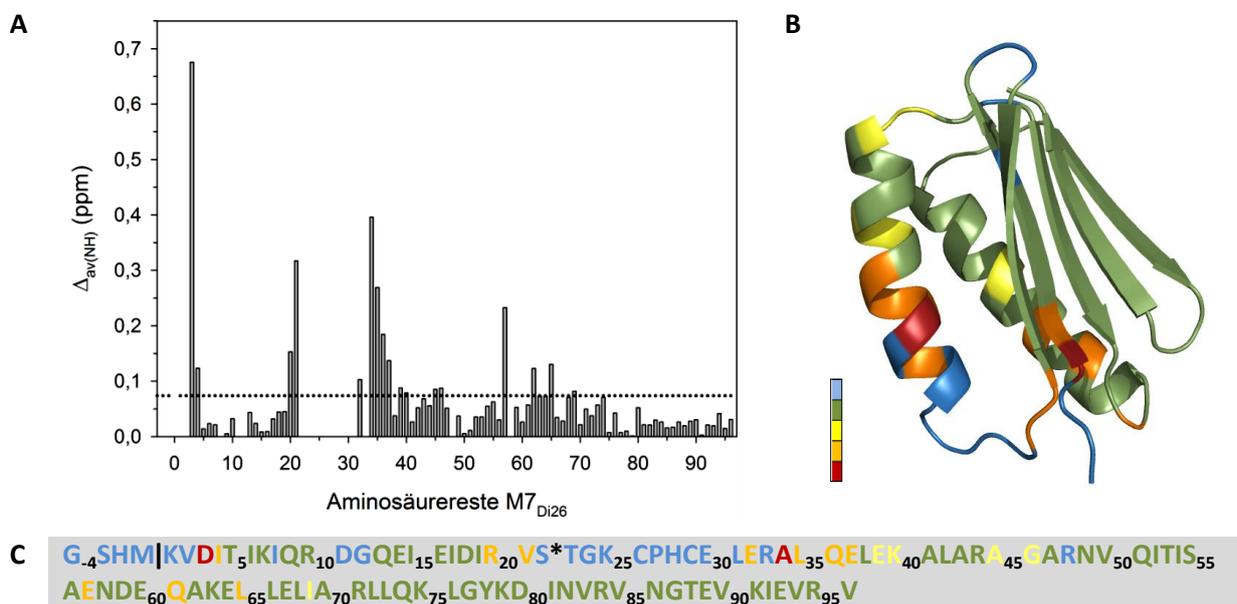


**Abbildung 4.4.3- II: Strukturvergleich der Redozustände von M7<sub>D123</sub> mittels NMR-Spektroskopie.**

**A)** Dargestellt sind für die einzelnen Reste von M7<sub>D123</sub> die Differenz ihrer chemischen Verschiebung vom oxidierten und reduzierten Zustand bzw. die durchschnittliche chemische Verschiebung der Amid  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kerne ( $\Delta_{av(NH)}$ ) nach Gleichung 3-XXV (siehe 3.5.4). Für den Vergleich konnten nur 26 Reste im reduzierten Zustand identifiziert werden. Die Messungen wurden bei 20 °C in 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 8 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 0.05 %  $\text{NaN}_3$ , pH 7.0 durchgeführt. **B)** Die  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte sind mittels Farbskala in der M7(wt)-NMR-Struktur (pdb: 2JVF) dargestellt. Blau: Reste nicht zuordenbar; Grün:  $\Delta_{av(NH)} < 0.10$  ppm. Der schwarze Pfeil markiert den Bereich zwischen  $\beta_3$ -Strang und  $\alpha_2$ -Helix mit multiplen populierten Konformationen. **C)** Sequenz von M7<sub>D123</sub> in der Farbgebung von (B). Die M7-Struktur beginnt am ersten Lys (K<sub>1</sub>).

### Vergleich von oxidiertem M7<sub>Di26</sub> und oxidiertem M7<sub>Di23</sub>

Der direkte Vergleich von oxidiertem M7<sub>Di26</sub> und M7<sub>Di23</sub> zeigt, dass sich der C-terminale Teil der Proteine in Bezug auf das Proteinerückgrat stark ähnelt (Abbildung 4.4.3- III). Große Änderungen betreffen hauptsächlich den N-terminalen Proteinbereich und das Zentrum von  $\alpha_1$ -Helix, in der die CPHC-Sequenz inseriert wurde (M7<sub>Di26</sub>) bzw. sich das CPHC-Tetrapeptid in dem vorangehenden Loop befindet (M7<sub>Di23</sub>). Schließt man die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kerne in den Vergleich mit ein (Anhang Abbildung 7.9- V), so ergibt sich eine ähnliche Verteilung für die Änderungen in der chemischen Verschiebung. Übertragen auf die M7(wt)-Struktur scheint sich der Großteil des  $\beta$ -Faltblatts und  $\alpha_2$ -Helix nur unwesentlich zu unterscheiden. Auf Grund der fehlenden Zuordnung der Reste von reduzierten M7<sub>Di23</sub> konnten die reduzierten Formen beider Proteine nicht ausreichend verglichen werden.



**Abbildung 4.4.3- III: Strukturvergleich zwischen den oxidierten Formen M7<sub>Di26</sub> und M7<sub>Di23</sub> mittels NMR-Spektroskopie. A)** Gezeigt sind die einzelnen Reste von oxidiertem M7<sub>Di26</sub> mit der Differenz ihrer chemischen Verschiebung der Amid  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kerne ( $\Delta_{av(NH)}$ ) im Vergleich zur oxidierten Form von M7<sub>Di23</sub> nach Gleichung 3-XXV (siehe 3.5.4). Die Messungen wurden bei 20 °C in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 % D<sub>2</sub>O, 0.05 % NaN<sub>3</sub>, pH 7.0 durchgeführt. Die gepunktete Linie bei 0.074 ppm entspricht dem  $\bar{\Delta}_{av(NH)}$ -Wert. **B)** Die  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte sind mittels Farbskala in der M7(wt)-NMR-Struktur (pdb: 2JVF) dargestellt. Blau: Reste nicht zuordenbar bzw. unterschiedliche Sequenz von M7<sub>Di23</sub> und M7<sub>Di26</sub>; Grün:  $\Delta_{av(NH)} < 0.074$  ppm; Gelb:  $\Delta_{av(NH)} > 0.074$  ppm; Orange:  $\Delta_{av(NH)} > 0.10$  ppm; Rot:  $\Delta_{av(NH)} > 0.30$  ppm. **C)** Sequenz von M7<sub>Di26</sub> in der Farbgebung von (B). Der Stern (\*) symbolisiert die Position des CPHC-Sequenz in M7<sub>Di23</sub>. Von Position 23 bis 29 sind die Sequenzen von M7<sub>Di23</sub> und M7<sub>Di26</sub> nicht identisch und daher nicht miteinander vergleichbar. Die M7-Struktur beginnt am Lys<sub>1</sub> (K<sub>1</sub>).

#### 4.4.3.3. Temperatureinfluss auf die Struktur von oxidiertem M7<sub>Di26</sub>

Die M7-Varianten besitzen eine außergewöhnlich hohe Stabilität gegenüber Temperatur und chemischen Denaturantien (siehe 4.3.3). Dabei ist die Stabilität eng mit der Temperatur verknüpft. So führt beispielweise bei oxidiertem M7<sub>Di26</sub> eine Temperatursenkung von 30 auf 20 °C zu einer großen Abnahme des  $\Delta G_{n \rightarrow d}$ -Wertes von  $\approx 29 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Tabelle 4.3- III). Parallel dazu hat der gleiche Temperatursprung keinen relevanten Einfluss auf das Redoxpotential von M7<sub>Di26</sub> (Tabelle 4.3- II). Es

ist daher wichtig nachzuvollziehen, welchen Einfluss die Temperatur auf die Proteinstruktur nimmt. Dies wurde bei 20, 30 und 40 °C an oxidiertem M7<sub>D126</sub> untersucht. Vor allem interessant ist die Spektroskopie bei 20 und 30 °C, da unter diesen Temperaturen alle hier aufgeführten biophysikalischen Experimente vollzogen wurden. Der Temperatureinfluss wurde anhand einer einzelnen Proteinprobe gemessen. Im Anhang Abbildung 7.9- III sind die temperaturabhängigen Messungen zusammengefasst. Der Strukturvergleich bei 20 und 30 °C zeigt nur geringe Schwankungen in den  $\Delta_{av(NH)}$ -Werten. Der  $\sigma(\Delta_{av(NH)})$  beträgt 0.025 ppm mit maximalen Schwankungen von  $\approx 0.06$  ppm, damit liegen die Werte unter der definierten Signifikanzgrenze von 0.10 ppm (siehe 4.4.3.1). Die geringeren Unterschiede sind wohl durch die Verwendung einer Einzelprobe begründet. Übertragen auf die M7(wt)-Struktur lässt sich kein Bereich erhöhter Verschiebung definieren (Anhang Abbildung 7.9- III-B). Somit werden keine größeren Strukturunterschiede zwischen den Messungen bei 20 und 30 °C beobachtet. Auch für die nicht detektierte CPHC-Sequenz sind nur eher geringe Änderungen möglich, da anliegende Reste keine signifikanten Verschiebungsdifferenzen aufweisen. Desweiteren führt der gleiche Temperatursprung nicht zu verschiedenen Redoxpotentialen, die als Maß für die elektrochemische Umgebung der CXXC-Sequenz dienen (Tabelle 4.3- II).

Der Strukturvergleich zwischen 20 und 40 °C führt zur Verstärkung der Verschiebung um etwa Faktor 2 (Anhang Abbildung 7.9- III-C, -D). Der  $\sigma(\Delta_{av(NH)})$  beträgt 0.044 ppm mit maximalen Schwankungen von  $\approx 0.12$  ppm, die hauptsächlich in Loop-Regionen auftreten. Wie aus den Stabilitätsmessungen erwartet (siehe 4.3.3), führte eine Temperatur von 40 °C nicht zur Denaturierung des Proteins.

#### 4.4.3.4. Vergleich zwischen den M7-Redoxvarianten und dem M7(wt)

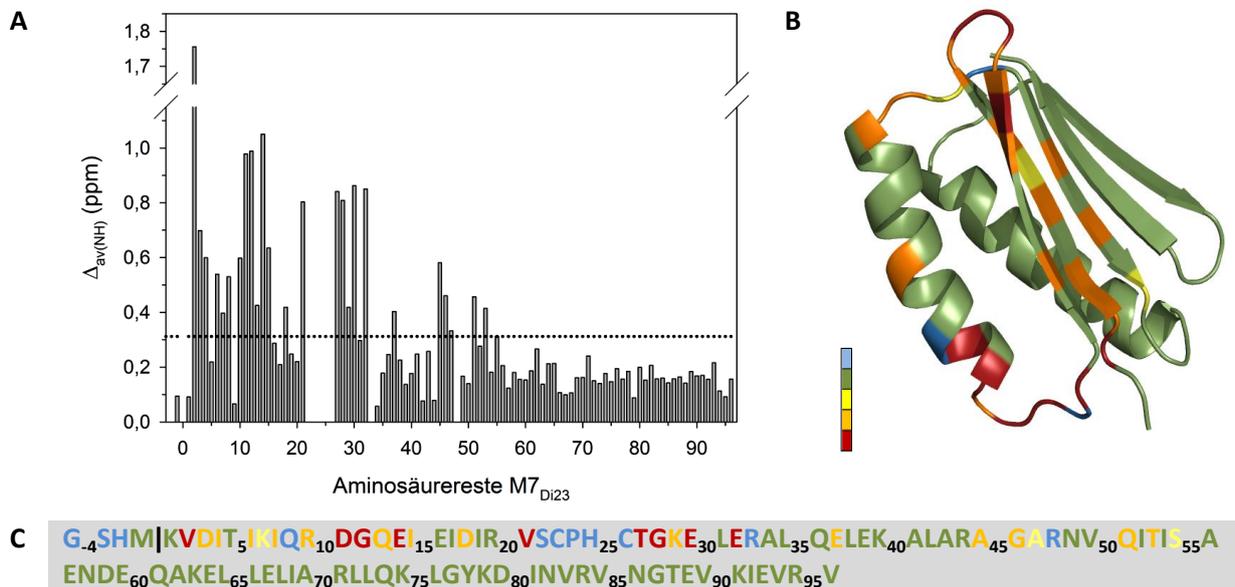
Die in dieser Arbeit erzeugten Redoxproteine sind Varianten des M7-Proteins. Die Insertion des CPHC-Tetrapeptids wurde im M7<sub>D126</sub> direkt auf der N-Cap Position von der  $\alpha_1$ -Helix umgesetzt und im M7<sub>D123</sub> wurde die CXXC-Sequenz innerhalb des Loops vor der  $\alpha_1$ -Helix implementiert. Der direkte Vergleich der chemischen Verschiebungen von M7(wt)-Protein mit den Varianten soll verdeutlichen, in welchem Maß die Mutationen die Ursprungsstruktur beeinflussen. Die Struktur von <sup>15</sup>N-markiertem M7(wt) wurde NMR-spektroskopisch von C. Stordeur (2007)<sup>149</sup> bei pH 6.5 und 25 °C gelöst. Die NMR-Spektroskopie in dieser Arbeit wurde bei pH 7.0 und 20 °C durchgeführt. Der Puffer (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 bzw. 8 % D<sub>2</sub>O, 0.05 % NaN<sub>3</sub>) unterscheidet sich nur durch einen geringeren D<sub>2</sub>O-Gehalt in der M7(wt)-Spektroskopie.

#### Vergleich von oxidiertem und reduziertem M7<sub>D123</sub> gegen M7(wt)

In Abbildung 4.4.3- IV ist der Vergleich von M7(wt) mit der Variante M7<sub>D123</sub> in der oxidierten Form gezeigt. Grundsätzlich weisen nahezu alle Reste  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte  $> 0.10$  ppm auf, so dass durchweg signifikante Verschiebungen im Proteinrückgrat zu erwarten sind. Der Unterschied in der durchschnittlichen chemischen Verschiebung der Amid <sup>15</sup>N- und <sup>1</sup>H<sup>N</sup>-Kerne ( $\sigma(\Delta_{av(NH)})$ ) zwischen M7(wt) und oxidiertem M7<sub>D123</sub> beträgt  $\approx 0.31$  ppm. Die maximalen Unterschiede lagen bei  $\approx 1.0$  ppm (bei Ausschluss von Val<sub>2</sub> am flexiblen N-Terminus). Dennoch ist deutlich zu erkennen, dass der C-terminale Bereich des Proteins (ab  $\beta_3$ -Strang) dem M7(wt) wesentlich ähnlicher in seinen  $\Delta_{av(NH)}$ -Werten ist ( $\sigma(\Delta_{av(NH)}) = 0.18$  ppm für Reste 49 - 96). Der Hauptanteil der Änderungen betrifft die direkte Umgebung der CXXC-Insertion (Abbildung 4.4.3- IV-B), d.h. der Loop, in dem das CPHC-Peptid

implementiert wurde, die nachfolgende  $\alpha_1$ -Helix und die  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Stränge. Die  $\emptyset(\Delta_{av(NH)})$  beträgt 0.46 ppm für Reste 1 - 48.

M7<sub>Di23</sub> in der reduzierten Form wurde nicht mit M7(wt) hinsichtlich der chemischen Verschiebungen verglichen. Dafür war der Anteil zugeordneter Reste zu gering (Anhang Tabelle 7.10- I).



**Abbildung 4.4.3- IV: Strukturvergleich von oxidierten M7<sub>Di23</sub> mit dem M7(wt) mittels NMR-Spektroskopie.** Dargestellt sind für die einzelnen Reste von M7<sub>Di23</sub> die durchschnittliche chemische Verschiebung der Amid  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kerne ( $\Delta_{av(NH)}$ ) nach Gleichung 3-XXV (siehe 3.5.4) aus dem Vergleich von M7<sub>Di23</sub> ox und dem M7(wt). Die Spektroskopie von oxidiertem M7<sub>Di23</sub> wurde bei 20 °C und pH 7.0 durchgeführt. M7(wt) wurde bei 25 °C und pH 6.5 gemessen<sup>149</sup>. Die Proteine lagen in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 bis 8 % D<sub>2</sub>O, 0.05 % NaN<sub>3</sub> vor. Die gepunktete Linie bei 0.31 ppm (**A**) entspricht dem  $\emptyset(\Delta_{av(CNH)})$ -Wert. **B**) Die  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte sind mittels Farbskala in der M7(wt)-NMR-Struktur (pdb: 2JVF) dargestellt. Blau: Reste nicht zuordenbar; Grün:  $\Delta_{av(NH)} < 0.31$  ppm; Gelb:  $\Delta_{av(NH)} > 0.31$  ppm; Orange:  $\Delta_{av(NH)} > 0.40$  ppm; Rot:  $\Delta_{av(NH)} > 0.75$  ppm. **C**) Sequenz von M7<sub>Di23</sub> in der Farbgebung von (**B**). Die M7-Struktur beginnt am ersten Lys (K<sub>1</sub>).

### Vergleich von oxidiertem und reduziertem M7<sub>Di26</sub> gegen den M7(wt)

Für M7<sub>Di26</sub> konnten beide Redoxspezies mit dem M7(wt) verglichen werden. Der Unterschied in der durchschnittlichen chemischen Verschiebung der Amid  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Kerne ( $\emptyset(\Delta_{av(NH)})$ ) zwischen M7(wt) und den M7<sub>Di26</sub> Redoxformen beträgt  $\approx 0.27$  ppm, dabei gab es maximale Unterschiede von 1.1 ppm (Anhang Abbildung 7.9- IV). Sowohl für oxidiertes als auch reduziertes M7<sub>Di26</sub> ähnelt die Verteilung der ( $\Delta_{av(NH)}$ )-Werte erwartungsgemäß der aus dem zuvor beschriebenen Vergleich von M7(wt) und oxidierten M7<sub>Di23</sub>. Die größten Veränderungen in den chemischen Verschiebungen treten erneut um das N-terminale Ende von  $\alpha_1$ -Helix und den  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Strängen auf ( $\emptyset(\Delta_{av(NH)})_{\text{OX M7Di26}} = 0.40$  ppm bzw.  $\emptyset(\Delta_{av(NH)})_{\text{RED M7Di26}} = 0.36$  ppm für Reste 1 - 48). Die  $\emptyset(\Delta_{av(NH)})$ -Werte für den N-terminalen Bereich von M7<sub>Di26</sub> liegen damit unter dem von M7<sub>Di23</sub> ( $\emptyset(\Delta_{av(NH)}) = 0.46$  ppm). Doch muss beachtet werden, dass für M7<sub>Di26</sub> sechs Reste weniger zugeordnet wurden als im M7<sub>Di23</sub>. Diese Reste liegen im Loop zwischen dem  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Strängen und N- und C-terminal um die CXXC-Sequenz. Damit sollten diese Reste tendenziell größere  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte besitzen und entsprechend den  $\emptyset(\Delta_{av(NH)})$  erhöhen, womit keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Insertion im Loop oder auf der N-Cap-Position zu geringeren Verschiebungen des Proteinrückgrats führt. Der C-

terminale Bereich der Proteine (Reste 49 - 96) ist vergleichbar im Bezug auf die Anzahl der definierten Reste (alle zugeordnet). Hier besitzen die Redoxformen von M7<sub>Di26</sub> im Vergleich mit dem M7(wt) nahezu denselben  $\langle\Delta_{av(NH)}\rangle$ -Wert wie oxidiertes M7<sub>Di23</sub> mit  $\approx 0.20$  ppm.

Aussagen über die Gesamtstruktur der Redoxvarianten sind nur bedingt möglich. Im M7(wt) Protein existiert eine starke innere Wechselwirkung der einzelnen Sekundärstrukturelemente untereinander. Die Bereiche maximaler Unterschiede in den chemischen Verschiebungen ( $\Delta_{av(NH)}$ -Wert) sind in den Redoxvarianten mitunter weit in der Primärsequenz voneinander getrennt. Diese Verteilung lässt eine ähnliche Vernetzung der Reste wie im M7(wt) vermuten. Gleichzeitig besitzen Bereiche, die räumlich weit von der CXXC-Mutation getrennt sind (C-Terminus des Proteins), eine auffallend gleichmäßige Verschiebung ihrer  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte. Dies ist ebenso ein Indiz für ein ähnliches Wechselwirkungsnetzwerk wie in der M7(wt)-Struktur. Bei der Bewertung der  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte muss zusätzlich beachtet werden, dass sich die Messbedingungen für die NMR-Spektroskopie zwischen M7(wt) und den Varianten unterschieden hat und dies zusätzlich die  $\Delta_{av(NH)}$ -Werte erhöhen kann. Desweiteren besitzt der hier als N-terminale Bereich definierte Abschnitt (Reste 1-48) im Vergleich zum C-terminalen Bereich bereits im M7(wt)<sup>30</sup> und auch im Top7<sup>5</sup> Ursprungprotein eine erhöhte Flexibilität, wodurch gleichsam verstärkte Abweichungen generiert werden können.

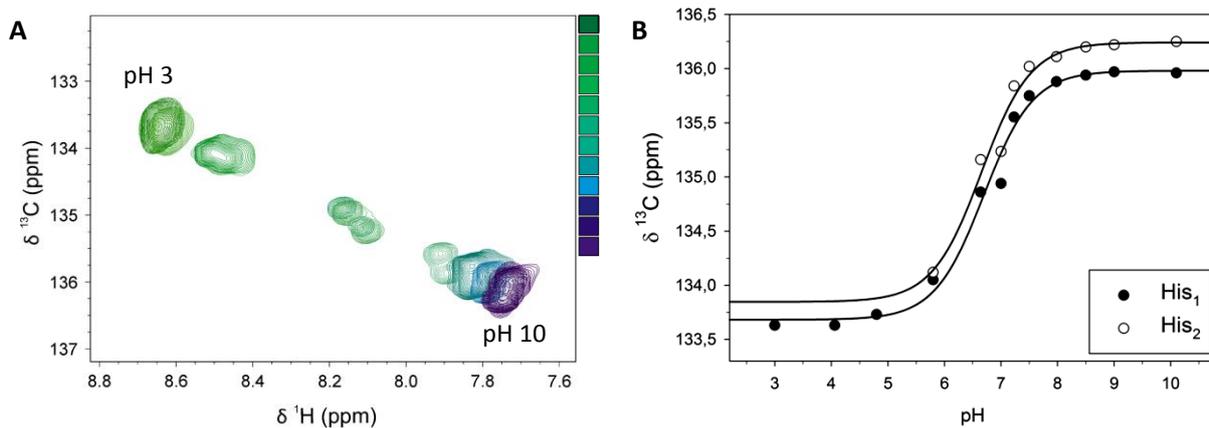
Auch ohne vollständige Strukturrechnung deuten die NMR-spektroskopischen Daten darauf hin, dass die Grundstruktur der Redoxvarianten, die der von M7(wt) zumindest ähnlich ist. Struktursimulationen über Talos+ und CSI3.0 anhand der chemischen Verschiebungen ergaben die M7-Topologie (Daten nicht gezeigt). Dies deckt sich mit dem Resultat aus der Sekundärstrukturbestimmung. Hier wurden zwischen M7(wt) und den Varianten nur geringe Unterschiede in den Fern-UV-CD-Spektren beobachtet.

#### 4.4.4. Bestimmung der Histidinyl-pK<sub>a</sub>-Werte mittels NMR-Spektroskopie

Die katalytische CXXC-Sequenz im DsbA(wt) enthält mit dem Histidin-Rest eine bedeutende funktionelle Gruppe. Sowohl die potentiellen Wasserstoffbrückenbindung der Imidazol-Seitenkette, als auch der Wechsel in der Rotamerstellung dieser Gruppe, könnten entscheidend die Reaktivität der Cysteine beeinflussen<sup>150</sup>. In den pK<sub>a</sub>-Studien der CXXC-Cysteine in dieser Arbeit (siehe 4.3.6.1) zeigte sich für Variante M7<sub>Di23</sub> ein starker Abfall der Reaktivität (Kinetik des DTNB-Umsatzes) eines Cysteins und bei DsbA(wt) ein Anstieg der Geschwindigkeitskonstante ab pH > 6.0. Die Vermutung liegt nahe, dass hier eine Wechselwirkung der Cysteine mit dem CPHC-Histidin stattfindet. Um dies zu untersuchen wurde eine pH-Titration zur Bestimmung des Histidinyl-pK<sub>a</sub>-Werte an <sup>13</sup>C-markierten M7<sub>Di26</sub> von S. Gröger und M. Baumann (AG Balbach; Institut für Physik der MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt (Abbildung 4.4.4- I). M7<sub>Di23</sub> stand für diese Messung nicht zur Verfügung, dennoch können indirekt Aussagen von M7<sub>Di26</sub> auf M7<sub>Di23</sub> übertragen werden.

Die CPHC-Varianten von M7 besitzen zwei Histidine: Eines am lösungsmittlexponierten N-Terminus (Restsequenz der Thrombinschnittstelle), das zweite ist Teil der CPHC-Sequenz. Bei den getrennten Signalen in Abbildung 4.4.4- I-A für oxidiertes M7<sub>Di26</sub>, die gut unter neutralem pH unterscheidbar sind, handelt es sich um diese beiden Histidine. Die Möglichkeit, dass es hierbei lediglich ein Histidin mit seinen beiden Tautomeren (N<sup>δ1</sup>-H und N<sup>ε2</sup>-H) in einem 1:1 Verhältnis beobachtet wird, oder dass zwei verschiedene Konformationen eines Histidins in der Tertiärstruktur vorliegen, kann nahezu ausgeschlossen werden. Die hier verwendete HSQC-Methode untersucht einzig das Spin-System aus <sup>13</sup>C<sup>ε1</sup> und <sup>1</sup>H<sup>ε1</sup>. Dieses spiegelt derartige konformationelle Unterschiede am Histidin und seiner Umgebung kaum wider<sup>138</sup>, vor allem, da die Histidine in den M7-Varianten sehr wahrscheinlich

lösungsmittelexponiert sind. Nur der Unterschied zwischen positiv geladenem (protoniert) und neutralem Histidin (deprotoniert) wird in diesem Spektrum ausreichend differenziert. Beide Zustände sind in Abhängigkeit vom pH die gesamte Titration in unterschiedlichen Verhältnissen vorhanden. Aufgrund der schnellen Austauschrate wird das Mischsignal beider Zustände im Spektrum beobachtet (Abbildung 4.4.4- I-A). Dabei ist die spezifische Zuordnung der Histidine mit der derzeitigen Datenlage nicht möglich. Das vorliegende HSQC-Spektrum ist sehr gut vergleichbar mit  $^{13}\text{C}^{\epsilon 1}\text{-}^1\text{H}^{\epsilon 1}$ -Kreuzsignalen multipler Histidine in einem Protein, wie beispielsweise für das NmerA-Protein<sup>151</sup> oder die SH2-Domäne der Phospholipase  $\text{C}_y$ <sup>152</sup>. Im Laufe der dargestellten pH-Titration (Abbildung 4.4.4- I-A) führt der steigende pH-Wert zu einem stetigen Anstieg der chemischen Verschiebung des  $^{13}\text{C}^{\epsilon 1}$ - und zum Abfall des  $^1\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signals. Eine Signalunterscheidung für beide Histidine ist erst ab pH 6 möglich. Die sich hieraus ergebenden  $\text{pK}_a$ -Kurven für das  $^{13}\text{C}^{\epsilon 1}$ -Signal (Abbildung 4.4.4- I-B) definieren für die Histidine den identischen  $\text{pK}_a$ -Wert von  $6.7 \pm 0.1$ . Der  $\text{pK}_a$  des Histidins in der CPHC-Sequenz deckt sich somit ausgezeichnet mit dem Einbruch der Reaktionskinetik des Cysteins von  $\text{M7}_{\text{D}123}$  ab pH 6.5 (siehe 4.3.6.1 bzw. Anhang Abbildung 7.6- II). Der bestimmte Histidin  $\text{pK}_a$  zeigt sich praktisch unabhängig vom Redoxzustand. So ergaben sich für beide Histidine von reduzierten  $\text{M7}_{\text{D}126}$   $\text{pK}_a$ -Werte von  $6.5 \pm 0.1$  (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.4.4- I: Histidinyl- $\text{pK}_a$ -Titration von oxidiertem  $\text{M7}_{\text{D}126}$  mittels NMR-Spektroskopie. A)** Gezeigt wird die chemische Verschiebung (in ppm) von  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -Kernen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Beide Histidine von  $\text{M7}_{\text{D}126}$  wurden spezifisch im aromatischen HSQC-Spektrum beobachtet, bei dem  $^1\text{H}^{\epsilon 1}$ -Protonen mit  $^{13}\text{C}^{\epsilon 1}$ -Kernen in der Imidazolseitenkette koppeln. Gemessen wurde in Komplexpuffer (10 mM Borat; 10 mM Citrat; 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 200 mM NaCl) mit 600  $\mu\text{M}$  Protein bei 20 °C. Es handelte sich um eine Probe, deren pH schrittweise verändert wurde. Die Farbabstufung im Diagramm entspricht folgenden pH-Schritten: **1)** pH 3.0 (dunkelgrün); **2)** pH 4.1; **3)** 4.8; **4)** 5.8; **5)** 6.6; **6)** 7.0; **7)** 7.2; **8)** 7.5; **9)** 8.0; **10)** 8.5; **11)** 9.0; **12)** 10.1 (dunkelblau). **B)** Aus der Auftragung der chemischen Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ -Kerne ( $\delta$ ) gegen den pH-Wert erhält man die  $\text{pK}_a$ -Kurven beider Histidine nach Gleichung 3-XXVII (siehe 3.5.5). Die Änderung der chemischen Verschiebung der Histidine während der pH-Titration ist nahezu identisch und ergibt folglich denselben  $\text{pK}_a$ -Wert von  $6.7 \pm 0.1$ .

Die Redoxfunktion von CXXC-Oxidoreduktasen ist an deren Struktur gekoppelt. Daher wurde über die Strukturaufklärung der  $\text{M7}$ -Redoxvarianten mittels NMR-Spektroskopie versucht Informationen bezüglich ihres Redoxcharakters abzuleiten. Analysiert wurden die Änderungen der chemischen Verschiebung der zugeordneten Reste von Varianten  $\text{M7}_{\text{D}126}$  und  $\text{M7}_{\text{D}123}$ . Die Vergleichsdaten des  $\text{M7}(\text{wt})$  entstammen der Literatur<sup>149</sup>. Die beschriebenen NMR-spektroskopischen Untersuchungen

zeigen beide Redoxzustände der M7-Varianten als gefaltete Proteine. Dabei lassen sich die Strukturen der Redoxvarianten deutlich in zwei Bereiche unterteilen, je nach Ausmaß der durchschnittlichen chemischen Verschiebungen ihrer einzelnen Aminosäuren. Der C-terminale Bereich (Reste 49 - 96) der Proteine zeigte eine gleichmäßige Änderung in der chemischen Verschiebung im Vergleich zum M7(wt) und im Vergleich der Redoxvarianten untereinander. Dies spricht für strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den Varianten bzw. den Redoxzuständen. Der N-terminale Abschnitt (Reste 1 - 48) beinhaltet die implementierte redoxaktive CXXC-Sequenz. Hier werden für Reste, die die Mutation flankieren, signifikante Strukturänderungen verzeichnet. Die CXXC-Reste im Speziellen konnten hierbei wiederum nicht detektiert werden. Bezieht man die Proteinstabilitäten und die Daten der CD-Spektroskopie der Varianten in die Betrachtung mit ein, so deutet dies ebenfalls auf eine dem M7(wt) vergleichbare Struktur hin. Desweiteren können die Untersuchungen zum  $pK_a$ -Wert des Histidins im CPHC-Redoxmotiv auch auf die kinetischen Experimente zur Redoxaktivität übertragen werden. Allerdings lassen die fehlenden dreidimensionalen Strukturen und die geringen Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der Redoxformen kaum Aussagen auf deren Redoxcharakteristik zu.

## 5. Diskussion

### 5.1. Proteinproduktion und strukturelle Betrachtungen

In der vorliegenden Arbeit wurden redoxaktive Varianten des Strukturproteins M7 generiert, indem die *active site* CXXC-Peptide von Thioredoxin bzw. DsbA in den Loop-Helix-Übergangsbereich N-terminal der Helix<sub>1</sub> im M7 eingefügt wurden. Bei der rekombinanten Herstellung dieser Varianten zeigten sich sehr deutliche Unterschiede in der Ausbeute. Über strukturelle Ursachen dieser Beobachtung kann hier nur spekuliert werden. Thioredoxin-Varianten zeigten im generellen, dass diese schwer in ausreichenden Ausbeuten präparierbar waren. Dies geht mit einer höheren Tendenz zur Oligomerisierung einher. Der Einbau der CGPC-Sequenz in den N-Terminus einer  $\alpha$ -Helix scheint schwerer realisierbar über einen rationalen Designansatz. Glycin und Prolin sind für gewöhnlich weit unter Durchschnitt auf der N<sub>1</sub>- und N<sub>2</sub>-Position nach dem N-Cap der Helix zu finden<sup>47</sup>. Genau dies ist der Fall im Thioredoxin, das damit eine Sonderstellung einnimmt. Weit häufiger finden sich Glycin auf dem N-Cap und Prolin in der N<sub>1</sub>-Position. Ein Szenario, das daher weit wahrscheinlicher für M7<sub>T126</sub> und die Thioredoxin-Substitutionsvarianten ist, als dass das N-terminale Cystein der CXXC-Sequenz, wie gewünscht die N-Cap-Position der  $\alpha$ -Helix stellt. Hierzu passend, führten Versuche die Thioredoxin-*fold* im Redesign nachzubauen, in keinem Fall zu Glycin- bzw. Prolinresten auf der N<sub>1</sub>- bzw. N<sub>2</sub>-Position<sup>31</sup>. Hingegen wird die Implementierung der DsbA-CPHC-Sequenz von der M7-Struktur weit besser toleriert. Im Vergleich zur CXXC-Insertion erwiesen sich die CXXC-Substitutionsvarianten von M7(wt) als schlechter rekombinant produzierbar und in kaum relevanten Ausbeuten zu reinigen. Es scheint möglich, dass die Faltung der Substitutionsvarianten beeinträchtigt ist; M7(wt) weist einen komplexen Faltungsweg mit mehreren Intermediaten auf<sup>35</sup>. M7-Varianten könnten in ihrer Faltung in 'thermodynamische Fallen' laufen und in Folge dessen zum einen instabile Strukturen bilden, die proteolytisch in der Zelle abgebaut werden, oder zum anderen Oligomere bilden, die in dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert wurden. Die CXXC-Insertionsvarianten hingegen zeigten einem dem M7-Wildtyp vergleichbare hohe Monomer-Ausbeute, wodurch die Erzeugung des hier vorliegenden Datensatzes zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung erst möglich wurde.

#### 5.1.1. Strukturelle Ableitungen – Denaturierung und Zwei-Zustandsmodell

Die thermodynamische Stabilität der Redoxzustände beschreibt die Gleichgewichtslage zwischen den Redoxformen und damit ihr Redoxpotential (Abbildung 1.6- I). Generell weisen die Varianten im reduzierten Zustand nahezu gleiche Stabilitäten und Kooperativitäten auf und entsprechen weitgehend dem M7(wt) (Anhang Tabelle 7.8- I). Dies legt nahe, dass die Strukturen der reduzierten Zustände sich nur wenig unterscheiden. Ebenso weisen die allgemein hohen Kooperativitäten der Denaturierungsübergänge (*m*-Werte) auf kompakte globuläre native Zustände der Varianten hin<sup>153</sup>. Die geringen Unterschiede in den thermodynamischen Parametern für die reduzierten Zustände der Varianten können beispielsweise durch verschieden stark ausgeprägte Stabilisierungseffekte am N-Terminus von  $\alpha_1$ -Helix zustande kommen. Im M7(wt) befindet sich am N-Cap ein Lysin, das auf Grund ungünstiger Wechselwirkung mit der positiven Ladung des Helix-Dipols weniger geeignet und seltener auf einer solchen Position vorkommt<sup>154</sup>. Hier bieten neutral geladene Cysteine bzw. deren negativ geladene Thiolat-Form günstigere Wechselwirkungen mit dem positiven Pol des Helix-Dipols<sup>80,81</sup>. Die zwangsläufige Positionierung des Histidins aus dem CPHC-Tetrapeptid in den DsbA-Varianten am Helix-N-Terminus, könnte durch eine potentielle positive Ladung ebenso ungünstig Wechselwirkungen generieren. Diese strukturellen Annahmen gehen konform mit der Thioredoxin-

Variante M7<sub>Ti26</sub>, deren reduzierte Form mit 89 kJ·mol<sup>-1</sup> die höchste Stabilität aller Varianten aufweist (Tabelle 4.3- III). M7<sub>Ti26</sub> besitzt kein Histidin in der CXXC-Sequenz und das ursprüngliche Lysin an der N-Cap-Position wird durch das CGPC-Peptid ersetzt. Letztendlich führt die Insertion der CXXC-Sequenz zu keiner größeren Destabilisierung oder Stabilisierung der Struktur bzw. heben sich im Vergleich zum M7(wt) stabilisierende und destabilisierende Wechselwirkungen im reduzierten Zustand nahezu auf. Hieraus lässt sich ableiten, dass sich nicht die Position oder die Art der Mutation für die große Stabilitätsänderung im oxidierten Zustand hauptverantwortlich zeichnet, sondern dies vielmehr durch die Ausbildung der Disulfidbindung verursacht wird. Hier können Verluste von stabilisierenden Wechselwirkungen durch die Thiolform die Ursache sein. Andernfalls kann die Disulfidbindung zur Verzerrung der Proteinstruktur und damit zur Destabilisierung führen. Verringerungen in der Kooperativität der Übergänge werden auffallend vermehrt für die oxidierten Formen von DsbA(wt)-Mutanten beschrieben<sup>98,141,155</sup>. Die reduzierten Varianten, wie auch in dieser Arbeit, sind weit weniger betroffen und unterscheiden sich weniger von den Wildtyp-Proteinen. Der Stabilitätsunterschied ( $\Delta\Delta G_{\text{OX/RED}}$ -Wert) der beiden Redoxzustände ( $\Delta G_{\text{OX}}$  und  $\Delta G_{\text{RED}}$ ) definiert nach dem in Abbildung 1.6- I gezeigten thermodynamischen Kreislauf die Redoxpotentiale ( $E^{\circ}_{\text{denat}}$  und  $E^{\circ}_{\text{nativ}}$ ) der CXXC-Oxidoreduktasen. Für die Wildtyp-CXXC-Oxidoreduktasen trifft der thermodynamische Zusammenhang (nach Gleichung 2-II; Abbildung 1.6- I) in guter Näherung zu (Tabelle 5.3- I). Die Summe der  $\Sigma\Delta G$ -Werte des thermodynamischen Zyklus liegt z.B. für Thioredoxin, DsbA und Glutaredoxin zwischen 1 und 6 kJ·mol<sup>-1</sup>, und damit nahe dem theoretisch erwarteten Wert von Null. Zur Berechnung dieser Summen-Werte wurden für Thioredoxin und DsbA die Redoxpotentiale der CXXC-Peptide aus dieser Arbeit verwendet. Die in dieser Arbeit generierten Redoxvarianten von M7 weichen deutlicher vom thermodynamischen Kreislauf ab, als die Wildtyp-Oxidoreduktasen (Tabelle 5.3- I), die Thioredoxin-Variante M7<sub>Ti26</sub> sogar mit erheblichen 48 kJ·mol<sup>-1</sup>.

Tabelle 5.3- I: Thermodynamische Parameter der CXXC-Varianten

Protein	$\Delta G_{\text{OX}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{\text{RED}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$E^{\circ}_{\text{nativ}}$ (mV)	$\Delta G^{\text{nativ}}_{\text{ox/red}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$E^{\circ}_{\text{denat}}$ (mV)*	$\Delta G^{\text{denat}}_{\text{ox/red}}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$\Sigma\Delta G$ (kJ·mol <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<b>M7<sub>Di26</sub></b>	-71 ± 2	-85 ± 2	-208 ± 2	+40 ± 1	-227 ± 2	+44 ± 1	10 ± 6
<b>M7<sub>Di24</sub></b>	-82 ± 3	-89 ± 3	-246 ± 1	+48 ± 1	-227 ± 2	+44 ± 1	11 ± 8
<b>M7<sub>Di23</sub></b>	-75 ± 1	-78 ± 2	-255 ± 2	+49 ± 1	-227 ± 2	+44 ± 1	9 ± 5
<b>M7<sub>Ti26</sub></b>	-36 ± 2	-89 ± 3	-178 ± 1	+34 ± 1	-201 ± 1	+39 ± 1	48 ± 7
<b>Trx</b>	-41 ± 2 <sup>[82]</sup>	-25 ± 1 <sup>[82]</sup>	-270 ± 3 <sup>[38]</sup>	+52 ± 1	-201 ± 1	+39 ± 1	4 ± 5
<b>Grx I</b>	-25 ± 1 <sup>[86]</sup>	-22 ± 1 <sup>[86]</sup>	-233 <sup>[86]</sup>	+45	-216 <sup>[156]</sup>	+42	1
<b>DsbA</b>	-34 ± 1 <sup>[39]</sup>	-48 ± 3 <sup>[39]</sup>	-122 ± 1 <sup>[39]</sup>	+24 ± 1	-227 ± 2	+44 ± 1	6 ± 5

<sup>a</sup> Berechnung nach Gleichung 2-I (siehe Abbildung 1.6- I)

<sup>b</sup> Berechnung nach Gleichung 2-II (siehe Abbildung 1.6- I)

\* Redoxpotentiale der Trx- und DsbA-Peptide aus dieser Arbeit

Die hier angegebenen Werte wurden unter vergleichbaren Bedingungen (T; pH) bestimmt.

Vergleichbar starke Abweichungen im thermodynamischen Kreislauf, wie die der M7-DsbA-Varianten, sind nicht ungewöhnlich und wurden beispielsweise für eine Vielzahl an DsbA-Varianten beschrieben<sup>98,141</sup>. Die beobachtete Stabilitätsänderung im oxidierten Zustand für die M7-Varianten und die DsbA-Mutanten<sup>98,141</sup> wird vorwiegend über einen früher einsetzenden Denaturierungsübergang und eine geringe Kooperativität (m-Wert) begründet. Dies trifft nicht auf die Wildtyp-CXXC-Oxidoreduktasen zu (Anhang Tabelle 7.8- I), deren  $\Delta\Delta G_{\text{OX/RED}}$ -Wert durch

unterschiedliche Übergangsmittelpunkte ( $D_{1/2}$ ) bestimmt wird. Die Struktur des reduzierten Zustands ist nahezu gleich für alle Varianten und beinahe unabhängig von der Temperatur. Die oxidierte Form zeigte hingegen zum Teil eine große Temperatursensitivität in seiner Stabilität. Dabei führte Temperaturerhöhung zu erhöhten  $m$ -Werten. Dies könnte mit der Eliminierung eines populierte Intermediates im Denaturierungsübergang zusammenhängen. Ebenso wie eine verringerte Kooperativität auf das Vorhandensein von stabilen Intermediaten in der Entfaltung hindeutet<sup>99,157</sup> und damit zwangsläufig zur Abweichung vom Zwei-Zustandsmodell führt. Aufgrund identischer Denaturierungsübergänge, ausgewertet über die Elliptizität und Tyrosinfluoreszenz der Redoxvarianten (Abbildung 4.3.5- I), bei gleichzeitig vollständiger Reversibilität (Abbildung 4.3.4- I), kann davon ausgegangen werden, dass sich aber kein Intermediat im Übergang populierte. Somit kann das Zwei-Zustandsmodell unter Gleichgewichtsbedingungen angewendet werden. Es muss allerdings beachtet werden, dass auch in der hier durchgeführten Analyse populierte Intermediate verborgen bleiben können<sup>158</sup>. Diese könnten durch Protonenaustausch-Experimente in der NMR-Spektroskopie sichtbar werden<sup>158</sup>. Eine andere Interpretation von Abweichungen in Kooperativitäten sind Unterschiede in den Strukturen des nativen und des denaturierten Zustands. Der  $m$ -Wert, die Kooperativität des Denaturierungsüberganges, ist ein Maß für die Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (ASA)<sup>157</sup>. Wenn sich die Redoxzustände in ihrer denaturierten oder in der nativen Form signifikant in ihren ASAs unterscheiden, könnte dies zu den beobachteten Kooperativitätsunterschieden führen<sup>159</sup>. Zwar unterscheiden sich die denaturierten Zustände der Redoxformen durch die Disulfidbrücke deutlich in ihrer Entropie<sup>99</sup>, jedoch sollte dies nicht maßgebend für den hier beobachteten Kooperativitätsunterschied sein. Dafür sprechen folgende Punkte: **1)** Die identischen Redoxpotentiale für alle CXXC-Peptide eines Typs (CPHC bzw. CGPC) zeigen, dass für den denaturierten Zustand sehr ähnliche Wechselwirkungen zwischen der CXXC-Tetrapeptidsequenz und der sie umgebenden Sequenz vorliegen. Unterschiedliche Kooperativitäten, wie sie bei den Varianten auftreten, sollten somit nicht durch den denaturierten Zustand bedingt werden. **2)** Die Fern-UV-CD-Spektroskopie zeigte, sowohl für den Vergleich von oxidierten und reduzierten CXXC-Peptid (Abbildung 4.4.2- I), als auch im Vergleich aller DsbA-Peptide (Daten nicht gezeigt) äußerst ähnliche Spektren, die die Bildung von  $\beta$ -Turns von Typ-I und -II vermuten lassen. Bemerkenswerterweise werden damit bereits im reduzierten Zustand in gewissem Maße Turns formiert. Der denaturierte Zustand in Abhängigkeit vom Oxidationszustand ist folglich in der CXXC-Umgebung für die DsbA-M7-Varianten in Näherung als identisch zu betrachten. Daraus sollten ähnliche Kooperativitätsunterschiede für alle Varianten folgen, wenn die lösungsmittlexponierte Oberfläche des denaturierten Zustands über die Kooperativität entscheiden würde. Jedoch nehmen die Kooperativitätsunterschiede der Redoxzustände ein weites Spektrum ein. Beispielsweise unterscheiden sich die  $m$ -Werte der beiden Redoxformen von M7<sub>D126</sub> um  $15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$  (20 °C) und von M7<sub>D124</sub> um  $3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$  (20 °C) (Tabelle 7.8- I). Solch große Differenzen dürften wenig wahrscheinlich durch eine einzelne Disulfidbrücke im denaturierten Zustand verursacht werden. **3)** Die Kooperativität der Entfaltung steht, wie zuvor genannt, mit der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (ASA) in Relation. Die M7-Varianten besitzen eine geschätzte ASA im nativen Zustand von  $\approx 6000 \text{ \AA}^2$  nach Gerstein (1992)<sup>160</sup> und im entfalteten Zustand liegt diese bei  $\approx 14400 \text{ \AA}^2$  nach Creamer *et al.* (1997)<sup>161</sup>. Im Durchschnitt führte eine Disulfidbindung, die rund 50 Reste verknüpft, zu einer Abnahme der ASA im denaturierten Zustand von  $900 \text{ \AA}^2$  für die M7-Varianten<sup>157</sup>.  $900 \text{ \AA}^2$  bedeuten einen Anteil an der Gesamtoberfläche im denaturierten Zustand von 6%. Allerdings umfasst das CXXC-Disulfid lediglich vier Reste, die einen 12-atomigen Ring bilden, wodurch der Unterschied in der ASA zwischen den denaturierten Redoxzuständen nur sehr gering sein sollte. Die zusätzliche Präferenz des denaturierten, reduzierten Zustands zur Bildung von  $\beta$ -Turns

(siehe 3.5.1.3.2) sollte den konformationellen Unterschied zwischen den Redoxzuständen im denaturierten Zustand weiter verringern. Der geschätzte ASA-Unterschied von weit unter  $< 6\%$  durch die Disulfidbrücke kann nicht ursächlich für den enormen Kooperativitätsunterschied sein. Der Unterschied in der Entfaltungskooperativität sollte somit hauptsächlich durch Unterschiede im nativen Zustand entstehen. So könnte z.B. ein weniger dichtgepacktes, hydrophobes Interieur des oxidierten Zustands eine Verringerung in der Kooperativität bewirken<sup>162</sup>. Die nachfolgenden Kapitel diskutieren den nativen Zustand der Redoxformen anhand von Unterschieden in der Tyrosinfluoreszenz, der Sekundärstruktur und der NMR-Spektroskopie.

### 5.1.2. Strukturelle Ableitungen – Tyrosinfluoreszenz der M7-Varianten

M7(wt) und die in dieser Arbeit hergestellten CXXC-Varianten besitzen nur ein einzelnes Tyrosin, das für die spektroskopischen Methoden dieser Arbeit von großer Bedeutung war. Das Tyrosin befindet sich in der M7(wt)-Struktur im Loop zwischen  $\alpha_2$ -Helix und  $\beta_4$ -Strang. Dort interagiert es sowohl mit Resten der beiden  $\alpha$ -Helices als auch mit Resten aus drei  $\beta$ -Strängen. Damit liegt das Tyrosin günstig, um Änderungen in der Tertiärstruktur anzuzeigen. Auffällig ist die hohe Fluoreszenzintensität, verglichen mit freiem Tyrosin bzw. dem denaturierten Zustand und weiteren tyrosinhaltigen Proteinen (z.B. Insulin, RNase A)<sup>163,164</sup>. Ursache ist zum einen die trotz Lösungsmittelzugänglichkeit stark hydrophobe Umgebung des Tyrosins im M7(wt)<sup>165,166</sup> und zum anderen, das beinahe vollständige Fehlen von quencheden Gruppen (z.B. Carbonyl-Gruppen, Cystine) in der Tyrosin-Umgebung. Dadurch, dass fast alle untersuchten Varianten eine ähnlich hohe Fluoreszenzintensität ( $\pm 5\%$  bei 1.2 M GdmSCN) aufweisen (Abbildung 4.3.3- II und Anhang Abbildung 7.8- I), kann davon ausgegangen werden, dass die Position des Tyrosins in der Grundstruktur aller Proteine vergleichbar ist. Einzig das reduzierte M7<sub>D123</sub> (+20 % bei 1.2 M GdmSCN); reduziertes M7<sub>D124</sub> (-9 %) und oxidiertes M7<sub>D124</sub> (-9 %) weisen größere Unterschiede zum M7(wt) auf, die durch strukturelle Unterschiede verursacht werden. Diese Unterschiede könnten zum einen von einer stärker hydrophoben Umgebung herrühren oder die einzige relevante Wasserstoffbrückenbindung betreffen, die zwischen der Carbonylgruppe von Ala<sub>43</sub> (M7(wt)-Nomenklatur) und der Hydroxylgruppe des Tyrosins ausgebildet ist<sup>166</sup>. Versuche, Unterschiede in der Umgebung des Tyrosins mittels Nah-UV-CD-Spektroskopie zu untersuchen, ergaben aufgrund zu geringer Signalintensitäten, keine auswertbaren Spektren (Daten nicht gezeigt).

Die Sekundärstrukturanalyse mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie zeigte keine größeren Unterschiede zwischen den Varianten. Desweiteren weisen die oxidierte und reduzierte Form der einzelnen Varianten nur sehr geringe Änderungen auf. Solch geringe Unterschiede zwischen den Redoxzuständen wurden auch für die natürlichen CXXC-Oxidoreduktasen beschrieben, wie beispielsweise für Thioredoxin<sup>167</sup>, DsbA<sup>73</sup> oder Glutaredoxin<sup>168</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die Sekundärstrukturanteile des M7(wt) in den Varianten, unabhängig vom Redoxzustand, erhalten sind und dass es nicht zu größeren Verlusten an  $\alpha$ -helikalen Strukturen durch die eingefügte Mutation kommt. Daher wurden Varianten M7<sub>D123</sub> und M7<sub>D126</sub> mittels NMR-Spektroskopie untersucht, um tiefere Einblicke in deren Strukturen zu erhalten.

### 5.1.3. Strukturelle Ableitungen – NMR Spektroskopie

Die natürlichen CXXC-Oxidoreduktasen weisen sehr ähnliche Strukturen für ihre Redoxzustände auf (Abbildung 1.6- II). Dennoch unterscheiden sich vor allem die CXXC-Sequenz und deren N-terminalen (Loop-Bereich) und C-terminalen Reste ( $\alpha$ -Helix) in ihrer Dynamik, die ebenfalls zu einer veränderten Peptidrückgrat-Konformation führt<sup>76</sup>. Der Vergleich der Redoxzustände für DsbA über deren chemische Verschiebung mittels NMR durch Horne *et al.* (2007)<sup>76</sup> lieferte ein vergleichbares Bild, wie für M7<sub>D126</sub> aus dieser Arbeit (Abbildung 4.4.3- I). Hauptsächlich Reste in der Primärsequenz-Umgebung der CXXC-Sequenz zeigen Konformationsänderungen. Hingegen ist der C-terminale Bereich des Proteins nahezu unverändert. Allerdings sind hierbei für das M7-Redoxprotein etwa doppelt so viele Reste von signifikanten Änderungen  $> 0.1$  ppm betroffen ( $n = 18$ ) wie für DsbA(wt) ( $n = 10$ ). Vor allem die CXXC-assoziierte  $\alpha$ -Helix unterscheidet sich im DsbA(wt) weit weniger zwischen den Redoxformen.

Auffallend für alle hier produzierten NMR-Daten ist das konsequente Fehlen von Signalen der CXXC-Sequenz und der benachbarten Reste. Die Cysteine der CXXC-Sequenzen sind potentielle Metallionen-Binder<sup>169</sup>. Paramagnetische Metallionen (z.B. Eisen(II)-, Nickel(II)-Ionen) wiederum führen in der NMR-Spektroskopie durch eine schnellere Relaxation zur Intensitätsabnahme der NMR-Signale, bzw. werden diese nicht mehr detektiert<sup>170</sup>. Dennoch scheinen paramagnetische Metallionen als mögliche Ursache für die fehlenden NMR-Signale unwahrscheinlich. Atomspektroskopie zeigte, dass lediglich 3 % des gereinigten Proteins  $Zn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  binden. Beide Ionen sind neben ihrer geringen Konzentration am Protein auch diamagnetisch, so dass diese die NMR-Spektroskopie nicht stören<sup>171</sup>. Die Bindung weiterer Metallionen durch das Protein konnte nicht nachgewiesen werden. Desweiteren sind die hier bestimmten Redoxpotentiale nicht abhängig von der Art der Proteinpräparation. Die Koordinierung eines Metallions durch die CXXC-Sequenz würde zwangsläufig zur Stabilisierung der reduzierten Spezies führen<sup>172</sup> und somit das Redoxpotential direkt beeinflussen. Die Bestimmung des Redoxpotentials von M7<sub>D126</sub> in Gegenwart von Zink- und Nickelionen, sowie mit den Metall(II)-Ionenchelatoren EDTA und EGTA (10 mM) ergaben identische Redoxpotentiale ( $\pm 1$  mV) (Daten nicht gezeigt). Dadurch scheint auch eine Metallionen-Bindung durch das CXXC-Peptid als Ursache für die fehlenden Signale in der NMR-Spektroskopie als unwahrscheinlich.

Die fehlenden Kreuzsignale für die CXXC-Sequenz könnten mit Konformationsänderungen der Reste zusammenhängen. Wenn mehrere Konformationen vorhanden sind, die miteinander in Zeitfenstern austauschen, die in der NMR-Spektroskopie unter den verwendeten Bedingungen nicht beobachtbar sind. Beispielsweise wurden Konformationsänderungen ebenfalls als Hintergrund für fehlende His<sub>32</sub>-NMR-Signale vom DsbA(wt) vermutet<sup>71</sup>. Das Vorhandensein mehrerer potentieller Strukturen bzw. Konformationen zur selben Zeit bei den Varianten könnte für die beobachteten Histidin-Kreuzsignale in der  $pK_a$ -Bestimmung bedeuten, dass diese von einem Histidin mit zwei Konformationen erzeugt werden. Die beiden Konformationen müssten dann in etwa equimolar populiert sein<sup>173</sup>. Es ist allerdings weit wahrscheinlicher, dass die gleich intensiven Histidin-Signale durch die beiden Histidinyll-Reste in der M7-Sequenz erzeugt werden. Hierfür sprechen vergleichbare Beispiele aus der Literatur, die sehr ähnlich hinsichtlich der Differenz ihrer chemischen Verschiebungen sind<sup>138,151,152,174</sup>. Desweiteren gibt es keine Information in welchem Verhältnis die *cis* und *trans* Konformation des Prolins in der CXXC-Sequenz der M7-Varianten vorliegt und mit welcher Geschwindigkeit die *cis/trans*-Isomerisierung erfolgt. Die Isomerisierung verläuft laut Literatur<sup>175</sup> mit  $\approx 0.5$  s<sup>-1</sup>. Somit langsam genug, um beide Konformationen in der NMR-Spektroskopie zu detektieren und folglich wenig wahrscheinlich, um die fehlenden Kreuzsignale zu erklären. Allerdings liefert die Prolinisomerisierung eine mögliche Erklärung für die multiplen Konformationen von M7<sub>D123</sub> in der

reduzierten Form. Die Insertion der CXXC-Sequenz erfolgte im M7<sub>D123</sub> innerhalb einer Loop-Region, die genug Raum zur Isomerisierung bieten könnte. Im Umkehrschluss würde die Oxidation von M7<sub>D123</sub> zur Fixierung einer Konformation führen. Ebenfalls möglich zur Kreuzsignalminimierung wäre eine erhebliche, und damit unwahrscheinliche Erhöhung der Austauschrate der Isomerisierung, wodurch nur noch ein Mischsignal sichtbar wäre. Für M7<sub>D126</sub>, dessen CXXC-Insertion die N-Cap-Position der ursprünglichen M7- $\alpha$ -Helix betrifft, scheint eine stabile Prolinkonformation wesentlich wahrscheinlicher.

Dennoch, ungeachtet fehlender Signale, lassen sich im Vergleich der NMR-Spektren mehrere Aussagen über die Struktur der Varianten schlussfolgern. So ändert sich der C-terminale Bereich der M7-Varianten (Reste 49 - 96) nicht in der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit von Mutation oder verschiedener Redoxzustände. Dies stimmt mit der Grundstruktur von M7 überein, bei der im C-terminalen Bereich mehr Wechselwirkungen zwischen den Sekundärelementen ausgebildet werden als im N-terminalen Abschnitt des Proteins. Dies deutet darauf hin, dass die M7(wt)-Topologie in den Varianten erhalten bleibt. Dafür sprechen auch Versuche mit dem Ursprungprotein Top7, das M7 trotz Sequenzunterschied biophysikalisch extrem ähnelt (Topologie, Faltungsverlauf und -kinetik)<sup>6,30,35</sup>. Für Top7 wurde gezeigt, dass der C-terminale Bereich etwa 80 % der Gesamtstabilität ausmacht<sup>176</sup>. Die vollständige Stabilität des Proteins wird erst durch die Wechselwirkung von N- und C-terminalem Bereich erreicht. Dies lässt sich auf M7 und die Redoxvarianten übertragen. Die reduzierte Spezies ähnelt stets in Proteinstabilität dem M7(wt). Da Gesamtstabilität erst durch das spezifische Zusammenspiel aller Sekundärstrukturelemente erreicht wird, kann auch für die reduzierte Form der Redoxvarianten eine dem M7(wt) ähnliche Gesamtstruktur, mit den entsprechenden Wechselwirkungen über weite Strukturbereiche angenommen werden. M7 und seine Redoxvarianten sind, wie auch deren Modellierungsvorlage Top7, trotz ihrer geringen Größe komplex zusammengesetzte Einzelstrukturen, die durch viele Wechselwirkungen vernetzt werden und somit eine kooperative Einheit bilden<sup>177</sup>.

Die Vergleiche zwischen den Redoxformen von M7<sub>D126</sub> mit dem M7(wt) zeigen im allgemeinen große Unterschiede in den chemischen Verschiebungen (Anhang Abbildung 7.9- IV), die zum Teil durch unterschiedliche Messbedingungen zwischen den Varianten dieser Arbeit und dem Wildtyp M7<sup>149</sup> begründet sind. Dennoch lassen sich klar Bereiche hinsichtlich der Differenz der chemischen Verschiebungen unterteilen. So weist der Bereich um die CXXC-Sequenz die größten Unterschiede auf. Hierbei unterscheiden sich die oxidierte und die reduzierte Form hinsichtlich der Verschiebungen der Reste C-terminal der CXXC-Sequenz im Vergleich mit M7(wt). Diese Reste der ursprünglichen  $\alpha_1$ -Helix vom M7(wt) zeigen für die oxidierte Form (Anhang Abbildung 7.9- IV-A) stärkere Abweichungen von der Grundstruktur als die reduzierte Form (Anhang Abbildung 7.9- IV-B). Die oxidierte Form ist ebenfalls stets die thermodynamisch instabilere Spezies. Größere strukturelle Abweichungen vom Wildtyp M7, dessen Grundstruktur auf maximale Stabilität angelegt ist, könnten für die Destabilisierung verantwortlich sein.

Auffällig ist, dass ausschließlich M7<sub>D123</sub> in seiner reduzierten Form in mehreren Konformationen vorliegt, die die Zuordnung der Kreuzsignale in der NMR zum Großteil unmöglich machten. Die Oxidation fixiert das Protein wiederum in einer Konformation. Das Vorhandensein von multiplen Strukturen scheint allerdings nur einen geringen Einfluss auf die Proteinstabilität zu haben bzw. haben diese Strukturvariationen einen sehr ähnlichen Denaturierungsübergang, der mit den reduzierten Zuständen der anderen M7-Varianten gut vergleichbar ist (Tabelle 4.3- III). Ebenso sollte die hiermit verbundene erhöhte strukturelle Flexibilität des reduzierten Zustands nicht zu dessen thermodynamischer Bevorzugung führen, wie das reduzierende Redoxpotential verdeutlicht.

Zusammenfassend scheint sich der native Zustand der Redoxformen der einzelnen M7-Varianten signifikant in seiner Struktur zu unterscheiden, auch wenn die Gesamtheit der Sekundärstrukturelemente grundsätzlich erhalten bleibt. Dies wäre ebenfalls die wahrscheinliche Ursache für die verringerte Kooperativität der Entfaltung.

## 5.2. Funktionelle Einordnung

### 5.2.1. Das Redoxpotential der M7-Varianten

Durch die Implementierung der CXXC-Sequenz im Übergangsbereich zwischen Loop und  $\alpha_1$ -Helix in M7 wurden Redoxvarianten generiert, die ein breites Spektrum an Redoxpotentialen ( $E^\circ = -178$  mV bis  $-256$  mV) aufweisen (Tabelle 4.3- I). Das Redoxpotential beschreibt das Gleichgewicht zwischen oxidiertem und reduziertem Spezies. Unter 4.3.1 wurden sechs Kernaussagen über die Redoxpotentiale getroffen. Besonders auffällig ist, dass entgegen den natürlichen CXXC-Oxidoreduktasen (DsbA und Thioredoxin), die Thioredoxin-Varianten stärker oxidierend sind. Das bedeutet, dass die CGPC-Sequenz im Vergleich zur DsbA-CPHC-Sequenz weniger bevorzugt eine Disulfidbrücke bildet. Dies wurde ebenso für die entsprechenden CXXC-Peptide beobachtet. Die M7-Struktur ist nicht in der Lage, die Disulfidbrücke des CGPC-Peptids zu stabilisieren, wie es im Thioredoxin(wt) der Fall ist. Vielmehr wirkt die CGPC-Sequenz durch ihre Oxidation destabilisierend, wie anhand des extremen Stabilitätsverlusts bei M7<sub>T126</sub> gegenüber der reduzierten Form zu sehen ist ( $\approx 53$  kJ·mol<sup>-1</sup>). Dies führt zu der oxidierenden Redoxcharakteristik aller Thioredoxin-M7-Varianten. Hingegen sind alle DsbA-Varianten deutlich reduzierender als das natürliche DsbA. Bezogen auf das Redoxpotential des DsbA-CPHC-Peptids, wurden allerdings sowohl oxidierendere als auch reduzierendere Redoxproteine erzeugt. Somit kann laut Redoxpotential die CPHC-Disulfidbrücke entgegen den Thioredoxin-Varianten auch zur Stabilisierung der M7-Struktur beitragen.

Die Redoxpeptide stellen das Modell für den denaturierten Zustand dar, ohne den keine vollständige thermodynamische Betrachtung der Redoxvarianten möglich ist. Ihr Redoxpotential ist als das Grundpotential zu verstehen, das die CXXC-Sequenz ohne den Einfluss einer Proteinstruktur aufweist. Die CXXC-Peptide liegen dabei keinesfalls als *random coil* vor. Vielmehr wurde in der Fern-UV-CD-Spektroskopie (siehe 4.4.2) deutlich, dass alle Peptide bereits im reduzierten Zustand Präferenzen für die Ausbildung von spezifischen Turns besitzen. Im direkten Zusammenhang zur räumlichen Ausrichtung der CXXC-Peptide steht der Unterschied in den Redoxpotentialen der CPHC- und CGPC-Sequenz. Das Dipeptid zwischen den Cysteinen scheint dabei die determinierende Komponente zu sein. Am konstanten Redoxpotential der Peptide für den jeweiligen CXXC-Typ mit unterschiedlichen flankierenden Aminosäuren, wird deutlich, dass die Wechselwirkungen der Reste außerhalb der CXXC-Sequenz unspezifisch sind und dass diese keine Abhängigkeit aufweisen. Das Fehlen einer Salz- und Temperaturabhängigkeit für das Redoxpotential unterstützt diese Vermutung (siehe 4.3.2). So sollten elektrostatische Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen für den ungefalteten Zustand von Proteinen mit gleicher CXXC-Sequenz, aber mit unterschiedlichen benachbarten Resten, sehr ähnlich sein. Ebenso wird in der hier aufgeführten Betrachtung die freiwerdende Bindungsenergie durch die Bildung der kovalenten Disulfidbrücken für den nativen und denaturierten Zustand als gleich angesehen. Das stärker oxidierende Redoxpotential der CGPC-Thioredoxin-Peptide gegenüber der CPHC-Sequenz von DsbA kann hauptsächlich über Entropieunterschiede zwischen den beiden Redoxzuständen erklärt werden<sup>99</sup>. Das Thioredoxin-Peptid hat aufgrund des Glycin-Restes und der fehlenden Seitenkette eine höhere konformationelle

Beweglichkeit im reduzierten Zustand als das DsbA-Peptid<sup>178</sup>, die mit einer 5 bis 10-fach verringerten Wahrscheinlichkeit zur  $\beta$ -Turn-Bildung für das Thioredoxin-Peptid einhergeht<sup>179,180</sup>. Hierdurch würde der reduzierte Zustand der CGPC-Peptide im Vergleich zur CPHC-Sequenz stärker bevorzugt werden. Gleichzeitig weist die CPHC-Sequenz im oxidierten Zustand eine 10-fach höhere Geschwindigkeitskonstante der *cis/trans*-Isomerisation, auf als das Thioredoxin-Peptid<sup>175</sup>. Dies deutet auf eine verringerte Flexibilität und damit auf einen entropisch ungünstigen oxidierten Zustand im CGPC-Peptid hin, was wiederum die reduzierte Form bevorzugen würde im Vergleich zum DsbA-Peptid. Desweiteren steigt durch Oxidation der CGPC-Sequenz ihr *cis*-Prolin-Anteil<sup>175</sup>. Dies stimmt mit der Annahme aus der Fern-UV-CD-Spektroskopie überein (siehe 4.4.2), das die CGPC-Sequenz durch das Prolin in Position i+2 Typ-VI  $\beta$ -Turns bildet, ein Turn-Typ der nur selten in natürlichen Proteinen vertreten ist<sup>179</sup>. Typ-VI  $\beta$ -Turns bedingen die *cis*-Prolin-Konformation<sup>103,179</sup>. Dadurch würde der Disulfidring unter zusätzlicher Spannung stehen und weniger bevorzugt werden<sup>181</sup>. Hingegen bildet die CPHC-Sequenz Typ-I und -II  $\beta$ -Turns mit annähernd idealen Torsionswinkeln<sup>95</sup>, die den oxidierten Zustand im Vergleich zur CGPC-Sequenz stärker favorisieren sollten, wodurch das DsbA-Peptid ein reduzierenderes Redoxpotential generiert. Übertragen auf die Trx-Protein-Varianten ist es somit eher wahrscheinlicher, dass sich im reduzierten Zustand verschiedene  $\beta$ -Turn-Typen bilden, bei denen Glycin und Prolin ihre bevorzugte Position von i bis i+3 einnehmen, als dass sich ein IV- $\beta$ -Turn formiert. Durch die Oxidation der Cysteine wird allerdings die konformationelle Freiheit stark eingeschränkt und der IV- $\beta$ -Turn erzwungen. Wie beobachtet, wären oxidierendere Redoxpotentiale der Thioredoxin-Varianten die Folge.

Für die detailliertere Analyse zur Generierung des Redoxpotentials der M7-Redoxvarianten soll zuerst die Situation im gefalteten Zustand von natürlichen CXXC-Oxidoreduktasen betrachtet werden. Hierfür bieten sich Thioredoxin und DsbA an, da diese die Extrama des Redoxspektrums von CXXC-Oxidoreduktasen bilden. Im gefalteten Zustand ist die Wichtung der thermodynamischen Faktoren eine andere als im ungefalteten Zustand. Der native Zustand von DsbA und Thioredoxin besitzt annähernd gleiche Strukturen für den oxidierten und reduzierten Zustand (Abbildung 1.6- II). Hier ist der entropische Verlust durch die Disulfidverbrückung somit weit weniger entscheidend. Der energetische Unterschied wird vielmehr durch enthalpische Änderungen begründet. So liegt für die CXXC-Sequenz im DsbA ein dichtes Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk vor, das den reduzierten Zustand begünstigt. Im Thioredoxin hingegen wird der reduzierte Zustand weit weniger auf diese Weise stabilisiert (siehe Einleitung 1.6). Unterschiede in den van-der-Waals-Wechselwirkungen in den verschiedenen CXXC-Motiven, also Änderungen in der hydrophoben Umgebung, die auch die umgebende Wasserstruktur verändern können, sind für den nativen Zustand wahrscheinlich. Da die Stärke der van-der-Waals-Wechselwirkungen stark abstandsabhängig ist, lässt sich der Einfluss dieser nur schwer vorhersagen. Aber vor allem im Thioredoxin könnte eine hydrophobe Umgebung über van-der-Waals-Effekte die starke Bevorzugung der hydrophoben Disulfidbindung im nativen Zustand anteilig vermitteln<sup>38</sup>. Desweiteren sollten auch Unterschiede in der Dipolstabilisierung des reduzierten Zustands einbezogen werden. Prolin besitzt ohne das Amid-Proton einen schwächeren Dipol<sup>90</sup>. Eine unterschiedliche Positionierung des Prolins im Dipeptid, und damit in der ersten Helixwindung, könnte die Wechselwirkung mit dem N-terminalen Cystein der CXXC-Sequenz beeinflussen und dadurch eine Redoxform stabilisieren.

Für die M7-Varianten ist eine Mischung aus Entropie- und Enthalpieunterschieden im unterschiedlichen Ausmaß die wohl wahrscheinlichste Ursache für die verschiedenen Redoxpotentiale. Wie über NMR-Spektroskopie gezeigt, scheint es im nativen Zustand in Abhängigkeit vom Redoxzustand größere Abweichungen zwischen den Konformationen der CXXC-Reste und der direkten CXXC-Umgebung zu geben. Diese lassen Entropieunterschiede zwischen den

beiden Zuständen vermuten. Damit muss es direkte Wechselwirkungen zwischen der CXXC-Sequenz und der Proteinumgebung geben. Nur so lassen sich z.B. die verringerten Cysteinyl-pK<sub>a</sub>-Werte, die redoxzustandabhängige Tyrosinfluoreszenzintensität und Proteinstabilität, und auch die Salzabhängigkeit des Redoxpotentials von M7<sub>D123</sub> erklären. Eine hydrophobe bzw. hydrophile Umgebung kann das Redoxpotential in der Art beeinflussen, dass polare Gruppen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Thiolen bzw. Thiolaten den reduzierten Zustand stabilisieren und hydrophobe Umgebungen die Disulfidbindung bevorzugen. Für beide Szenarien befinden sich mögliche Reste in der Umgebung der CXXC-Sequenzen im M7. So stellen die beiden β-Stränge (β<sub>1,2</sub>) N-terminal vom CXXC-Peptid vor allem hydrophobe Reste. Der nachfolgende Loop und α<sub>1</sub>-Helix hingegen liefern hauptsächlich polare und geladene Gruppen. Diese Reste können ebenfalls mit dem Histidin der CPHC-Sequenz im M7<sub>D123</sub> wechselwirken und somit zum beobachteten Einbruch der Reaktivität des zweiten Cysteins führen (siehe 4.3.6.1). Wie die Redoxpotentiale im Detail in den Varianten generiert werden, lässt sich anhand der derzeitigen Datenlage nicht beurteilen. Variante M7<sub>D126</sub> zeigt ein oxidierendes Redoxpotential im Vergleich zum entsprechenden DsbA-Peptid und den niedrigsten Cysteinyl-pK<sub>a</sub>-Wert für die hier gemessenen Varianten. Im Fall von M7<sub>D126</sub> ist es das C-terminale Cystein, das den verringerten pK<sub>a</sub> besitzt. Eben jenes Cystein, das die ursprüngliche N-Cap-Position von α<sub>1</sub>-Helix ersetzt. Eine stabilisierende Wechselwirkung zwischen Helix-Dipol und diesem Cystein kann gemutmaßt werden. Dies würde die Ausbildung des reduzierten Zustands unterstützen und so ein oxidierendes Redoxpotential generieren. Dies deckt sich mit einer erhöhten Stabilität des reduzierten Zustands gegenüber der des oxidierten. Der große Redoxpotentialunterschied von -80 mV im Vergleich mit dem natürlichen DsbA zeigt aber deutlich, um wie vieles spezifischer der reduzierte Zustand im DsbA stabilisiert wird.

Bezogen auf das Redoxpotential der DsbA-Peptide handelt es sich für Varianten M7<sub>D123-25</sub> um Reduktionsmittel. Deren Oxidation sollte somit gegenüber dem reduzierten Zustand eine stabilisiertere oxidierte Form liefern. Dies ist für keine Variante der Fall. Bei 20 °C beschreibt vor allem Variante M7<sub>D126</sub> eine deutliche Destabilisierung seiner oxidierten Spezies. Gegenüber Temperaturänderungen ist der reduzierte Zustand von M7<sub>D126</sub>, im Gegensatz zur oxidierten Form, nahezu unbeeinflusst. Die beiden Redoxzustände haben damit eindeutig unterschiedliche Temperaturoptima ihrer Stabilitäten. Ein Zusammenhang der sich nicht im Redoxpotential wiederfindet, das temperaturunabhängig ist.

Nichtsdestotrotz ergibt sich aus der thermodynamischen Auswertung bei 30 °C (Tabelle 4.3- III), dass mit zunehmend reduzierendem Charakter der Varianten, die Differenz aus den ΔG-Werten für beide korrespondierenden Redoxformen (ΔΔG<sub>OX/RED</sub>) immer geringer wird. Die zunehmende relative Stabilisierung des oxidierten Zustands (ΔΔG<sub>OX/RED</sub>) kann mit dem ΔG-Unterschied nach Gleichung 2- I (Abbildung 1.6- I), der sich aus der Redoxpotentialdifferenz der Varianten ergibt (Tabelle 4.3- I), verglichen werden. So verringert sich der ΔΔG<sub>OX/RED</sub>-Wert von M7<sub>D126</sub> gegenüber M7<sub>D124</sub> bzw. M7<sub>D125</sub> um ≈ 7 kJ·mol<sup>-1</sup> (Tabelle 4.3- III). Dies entspricht nahezu der Energiedifferenz von 8 kJ·mol<sup>-1</sup>, die sich aus der 39 mV Redoxpotentialdifferenz (Tabelle 4.3- I) von M7<sub>D126</sub> gegenüber M7<sub>D124</sub> bzw. M7<sub>D125</sub> ergibt. Ebenso gleichen sich die Energiedifferenzen der ΔΔG<sub>OX/RED</sub>-Werte (≈ 11 kJ·mol<sup>-1</sup>) und der Redoxpotentiale (ΔΔE = 49 mV entspricht ΔG<sub>OX/RED</sub> = 10 kJ·mol<sup>-1</sup>) von M7<sub>D126</sub> gegenüber M7<sub>D123</sub>. Dies spricht dafür, dass für die M7-Varianten, ebenso wie bei den natürlichen CXXC-Oxidoreduktasen, der relative Stabilitätsgewinn des oxidierten Zustandes durch die Ausbildung der Disulfidbrücke direkt mit einem reduzierenderen Redoxpotential verbunden ist. Somit decken sich die hier angewendeten thermodynamischen Modelle zur Beschreibung der Redoxpotentiale (Abbildung 1.6- I) und der Proteinstabilitäten (Zwei-Zustandsmodell) im Ansatz mit denen der natürlichen Oxidoreduktasen. Die eindeutige Diskrepanz in der Anwendung des thermodynamischen Zusammenhangs zwischen den

vier Zuständen (reduzierte und oxidierte Zustand im nativen und denaturierten Protein) zeigt allerdings, dass grundlegende, unbekannte Faktoren bisher nicht berücksichtigt werden. Die thermodynamische Beziehung ist komplexer als die der natürlichen CXXC-Oxidoreduktasen, möglicherweise bedingt durch die größeren Strukturunterschiede beider Redoxzustände in den nativen M7-Varianten.

### 5.2.2. Die Redoxaktivität der M7-Varianten

Das Ziel des Proteindesigns dieser Arbeit war die Erzeugung von nukleophilen Cysteinen, deren Redoxpotential durch die Proteinstruktur moduliert wird. Die biologisch relevante Größe ist allerdings die Redoxaktivität bzw. die Kinetik, wie schnell Oxidation und Reduktion ablaufen<sup>135</sup>. Eine möglichst hohe Redoxaktivität zu erzeugen hatte keinen Vorrang, dennoch wurde diese analysiert. Diese Versuche bilden wiederum die Grundlage für eine weitere Optimierung des Designs von M7-Redoxvarianten.

Für die Reduktionskinetik durch  $\text{DTT}_{\text{RED}}$  erhält man für  $\text{M7}_{\text{Di26}}$  ( $38 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) im Vergleich zur Reduktion von  $\text{GSSG}^{129}$  ( $0.2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) oder der frei zugänglichen Disulfidbindung im  $\text{GFP}^{182}$  ( $0.4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) eine deutliche Steigerung der Geschwindigkeitskonstante von bis zu zwei Größenordnungen. Gegenüber der Insulinreduktion gibt es allerdings lediglich eine Erhöhung in der Geschwindigkeitskonstante um das 2- bis 3-fache<sup>105</sup>. Dennoch ist selbst diese geringe Steigerung ein bemerkenswerter Erfolg, der vergleichbar weiteren initialen Designversuchen enzymatischer Aktivität ist<sup>11-16</sup>, wie beispielsweise bei der Konstruktion von Ligasen<sup>16</sup> oder von katalytisch aktiven Diaden zur Esterhydrolyse<sup>15</sup>. Zusätzlich muss beachtet werden, dass im hier durchgeführten Design der vorliegenden Arbeit nicht die Substratbindung berücksichtigt wurde. Eine hohe Redoxaktivität ist zwangsläufig an eine effektive Substratwechselwirkung gekoppelt. So führten Mutationen in der Substratbindestelle von Thioredoxin zu Aktivitätsverlusten von bis 99 %<sup>88,169</sup>. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Reduktion von oxidierten M7-Varianten ist der initiale Angriff von  $\text{DTT}_{\text{RED}}$  auf die intramolekulare Disulfidbrücke der CXXC-Sequenz. Dies kann aus dem Fehlen von gemischten Disulfiden in der rpHPLC-Analyse während der Kinetikmessung geschlossen werden. Der zweite Reaktionsschritt, die Trennung des gemischten Disulfids als intramolekulare Reaktion 1. Ordnung, läuft damit wesentlich schneller ab. Um beide Reaktionsphasen getrennt zu betrachten, müsste die Messung der Reduktionskinetik mit den Einzelcysteinvarianten oder mit selektiv geblockten Cysteinen (z.B. Alkylierung mittels Iodacetamid) wiederholt werden. Die Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücke in den Varianten ist letztendlich um zwei bis vier Größenordnungen langsamer als die der natürlichen CXXC-Oxidoreduktasen (Tabelle 4.3- V). In langsamen Reduktionskinetiken können sterische Beeinträchtigungen eine Rolle spielen, oder eine zu geringe Stabilisierung der Abgangsgruppe im Protein (reduziertes Thiol) zu höheren Aktivierungsenergien führen. Die Reaktionsprodukte  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  und die reduzierte M7-Variante stellen die jeweils thermodynamisch bevorzugten Zustände der Moleküle dar. DsbA(wt) folgt nach Couprie *et al.* (2000)<sup>72</sup> in seinem katalytischen Mechanismus der thermodynamisch bevorzugten Spezies, d.h. das gemischte Disulfid aus dem nukleophilen Cystein und dem Substrat besitzt eine mittlere Stabilität, die zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand der Oxidoreduktase liegt. Dies scheint ebenso für Variante  $\text{M7}_{\text{Di26}}$  zuzutreffen, da auch hier das gemischte Disulfid mit Glutathion und den jeweiligen Einzelcysteinvarianten von  $\text{M7}_{\text{Di26}}$  eine erhöhte Stabilität gegenüber dem oxidierten Zustand aufwies<sup>110</sup>. Das glutathionylierte C-terminale Cystein wird dabei thermodynamisch stark ( $\approx 18 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) gegenüber dem N-terminalen Cystein bevorzugt<sup>110</sup>.

Die Oxidation von reduzierten CXXC-Varianten durch  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  verlaufen ebenso, wie die zuvor beschriebene Reduktion, über zwei nukleophile Substitutionen ( $\text{S}_{\text{N}}2$ )<sup>52</sup>. Dabei ist der initiale nukleophile Angriff der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, da keine gemischten Disulfide für Proteine und auch das DsbA<sub>7</sub>-Peptid detektiert wurden (siehe 4.3.6.2). Ebenso populierten sich für die Proteinvarianten keine gemischten Disulfide in der Redoxkinetik-Messung mit Glutathion (Daten nicht gezeigt). Allerdings führte die Inkubation von Glutathion mit den CXXC-Peptiden unter Gleichgewichtsbedingungen zur Bildung von gemischten Disulfiden (Daten nicht gezeigt). Daher scheint die M7-Struktur unabhängig vom Redoxpotential, die Akkumulation von gemischten Disulfiden, die eine vollständige Disulfidaustauschreaktion inhibieren würden, zu verhindern. Die Oxidationsreaktion durch  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  kann theoretisch über beide CXXC-Cysteine erfolgen. Aufgrund des biphasischen Kurvenverlaufs der Kinetik scheint dies hier vorzuliegen (Abbildung 4.3.6- III-B). Dabei lässt sich nur für M7<sub>D126</sub> aufgrund der  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Werte und der DTNB-Oxidationskinetik der Einzylcysteinvarianten vermuten, dass das C-terminale Cystein das schneller reagierende, nukleophilere Cystein liefert (siehe folgende Diskussion). Die Oxidation durch  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  ist um bis zu drei Größenordnungen langsamer als die umgekehrte Reduktion. Wie auch in der Reduktion besitzt M7<sub>D126</sub> hierbei die höchste Geschwindigkeitskonstante. M7<sub>D123</sub>, das thermodynamisch gesehen beste Reduktionsmittel ( $E^{\circ} = -255 \text{ mV}$ ), ist circa 6-fach langsamer. Hierdurch wird deutlich, dass in den Varianten mehrere Faktoren die Kinetik der Disulfidaustauschreaktion bestimmen. So kann beispielsweise angenommen werden, dass eine labile Disulfidbrücke im M7<sub>D126</sub> zu den schnellen Reduktionskinetiken durch  $\text{DTT}_{\text{RED}}$  führt. Gleichzeitig könnte reduziertes M7<sub>D126</sub> eine bessere Sterik für die Reaktion mit  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  besitzen und dadurch die höchsten Oxidationskinetiken generieren.

Im Vergleich der Oxidationskinetik von reduzierten CXXC-Varianten durch  $\text{DTT}_{\text{OX}}$  und DTNB ist beachtlich, dass auch die M7-Varianten sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeiten erzeugen können. Hohe Oxidations-Geschwindigkeitskonstanten werden durch eine stabilisierte Abgangsgruppe im Substrat und durch einen hohen Anteil an nukleophilem Thiolat in der CXXC-Variante erzielt. Folglich ist die Kinetik direkt an den  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wert der CXXC-Cysteine gekoppelt. Ein besonders niedriger  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wert bedeutet aber nicht, dass das Thiolat eine hohe Nukleophilie inne hat, da das Thiolat in diesem Fall außerordentlich stabilisiert und somit reaktionsträger wird. Die höchsten Geschwindigkeitskonstanten werden erzielt, wenn der  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wert der Cysteine im Bereich des pH-Wertes des vorliegenden Lösungsmittels liegt. Dadurch würde ein verhältnismäßig hoher Anteil Thiolat existieren, ohne eine gleichzeitig zu stark ausgeprägte Stabilisierung der Thiolat-Spezies<sup>97,135</sup>. Alle CXXC-Varianten besaßen ein  $\approx 1.3 \text{ pK}_{\text{a}}$ -Einheiten azideres Cystein gegenüber dem zweiten basischeren Cystein, das im  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Bereich der freien Aminosäure vorlag. Eine gute Kontrolle für die Validität der Daten stellen die Einzylcysteinvarianten von M7<sub>D126</sub> dar, deren  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Werte in guter Näherung mit denen vom Wildtyp M7<sub>D126</sub> stehen. Wie zuvor diskutiert (siehe 5.2.1), ist das C-terminale Cystein der CXXC-Sequenz das azidere. Diese Aussage kann aber nicht direkt auf die anderen Varianten übertragen werden. Aus den DTNB-Versuchen geht eindeutig hervor, dass beide Cysteine reaktiv gegenüber DTNB sind. Ob die CXXC-Cysteine dabei selektiv mit je einem DTNB-Molekül reagieren, kann aber ebenfalls nicht geschlussfolgert werden, da ein TNB-modifiziertes Cystein durchaus die Reaktivität des zweiten Cysteins beeinträchtigen kann. Aufgrund der vergleichbaren Reaktionskinetiken von DsbA(wt) und den Redoxvarianten (Proteine und Peptide) könnte der DsbA-Reaktionsmechanismus auch auf die Redoxvarianten zutreffen. Bei diesen wird eine intramolekulare Disulfidbrücke unter Freisetzung von zwei  $\text{TNB}^{2-}$ -Molekülen gebildet. Bedingt wird der Reaktionsverlauf im DsbA(wt) durch die schlechte Zugänglichkeit des C-terminalen Cysteins für jegliches Substrat<sup>59,121,143</sup>. Die intramolekulare Disulfidbildung im DsbA ist somit stark bevorzugt und bedingt den nukleophilen Angriff des C-terminalen Cysteins auf das gemischte TNB-DsbA-Disulfid.

Dafür ist allerdings die Aktivierung dieses Cysteins nötig. Ein ähnlicher Mechanismus wie für Thioredoxin, nach Roos *et al.* (2009)<sup>54</sup>, kann vermutet werden, bei dem der  $pK_a$  des C-terminalen Cysteins im gemischten Disulfid abgesenkt wird, um katalytische Mengen an Thiolat zu generieren. Die schnellsten Reduktionskinetiken bei pH 7.0 wurden entsprechend des erhöhten Thiolat-Anteils für Varianten M7<sub>D126</sub> und M7<sub>D125</sub> erzielt. Hier könnte das Lysin, das sich für beide Varianten direkt N- bzw. C-terminal von der CXXC-Sequenz befindet, verantwortlich sein (Tabelle 4.1- I). Die positive Ladung des Lysins kann sowohl die Thiolat-Spezies als auch die Abgangsgruppe stabilisieren. Trotz des gleichen  $pK_a$ -Wertes erreicht M7<sub>D125</sub> nochmal deutlich höhere Geschwindigkeitskonstanten, die möglicherweise für eine verbesserte Sterik der nukleophilen Substitution gegenüber den anderen M7-Varianten spricht.

Als Modell für die nicht katalysierte Reaktion diente eine Vergleichsmessung mit DTNB und freiem Cystein. Hier besitzen sowohl die M7-Redoxvarianten als auch die CXXC-Peptide eine deutlich erhöhte Reaktivität gegenüber der Kontrolle. Desweiteren können einzelne Varianten ähnliche Geschwindigkeitskonstanten wie DsbA(wt) generieren. DTNB ist allerdings ein sehr starkes Oxidationsmittel ( $E^\circ \approx +50 \text{ mV}$ )<sup>183</sup>, mit einer hervorragenden Abgangsgruppe (TNB<sup>2-</sup>), so dass gegenüber Thiolgruppen nahezu immer hohe Geschwindigkeitskonstanten erreicht werden. So reagiert DTNB im identischen Versuchsansatz mit freiem Cystein mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $2\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Diese ist aber bis zu 24-fach langsamer als die M7-Redoxvarianten (Tabelle 4.3- IV). Auffallend ist, dass selbst die CXXC-Peptide den M7-Redoxvarianten vergleichbare Geschwindigkeitskonstanten aufweisen. Daher scheint die erhöhte Redoxaktivität bereits zu gewissen Anteilen eine intrinsische Eigenschaft der CXXC-Sequenz zu sein, die durch die M7-Struktur zumeist verstärkt wird. Nur im Fall der Reduktion von oxidiertem M7<sub>D123</sub> durch DTT gibt es eine deutlichere Verlangsamung in der Geschwindigkeitskonstante, die im möglichen Zusammenhang mit dem Histidin der CPHC-Sequenz steht (siehe 4.3.6.1).

Die freie Imidazol-Seitenkette des Histidins besitzt einen  $pK_a$ -Wert um  $6.5$ <sup>184</sup> und ist damit unter physiologischen Bedingungen durch die Änderung des Protonierungsgrads ein funktionell wertvoller Rest<sup>39,83,185</sup>. Das Vorhandensein des Histidins im CXXC-Motiv von beispielsweise DsbA und der PDI ist durch seinen Einfluss auf die Substratbindung<sup>71</sup>, die Disulfidaustauschreaktion<sup>186</sup>, Proteinstabilität und das Redoxpotential<sup>83,150,187</sup> essentiell für die Katalyse dieser Oxidoreduktasen. Die Aufklärung von möglichen Wechselwirkungen des CPHC-Histidins ist damit auch für die Charakterisierung der M7-Varianten bedeutend. Die DsbA-M7-Varianten besitzen zwei Histidine in der Sequenz. Ein Histidin liegt am nicht strukturierten N-Terminus (Restsequenz der Thrombin Schnittstelle), das zweite ist Teil der CPHC-Sequenz. In beiden Redoxformen von M7<sub>D126</sub> liegt für diese Histidine der identische  $pK_a$ -Wert für die Imidazol-Seitenkette bei  $\approx 6.6$  vor. Im Gegensatz wird für DsbA(wt) eine Änderung des Histidinyl- $pK_a$ -Werts in Abhängigkeit vom Redoxzustand vermutet<sup>59,186</sup>. Das bedeutet nicht zwangsläufig, dass die CPHC-Sequenz in den M7-Redoxvarianten in einer unstrukturierten Umgebung vorliegt. Histidine in strukturierten Bereichen mit dem  $pK_a$ -Wert der freien Aminosäure sind nicht ungewöhnlich<sup>151,173</sup>. Desweiteren konnte in dieser Arbeit in den Versuchen zur Cysteinyl- $pK_a$ -Bestimmung des DsbA(wt) gezeigt werden (siehe 4.3.6.1), dass im Übergangsbereich von pH 6.2 die Geschwindigkeitskonstante der DsbA-Oxidation um 25 % zunimmt. Ein direkter Zusammenhang zum Histidin des CPHC-Motivs mit einem  $pK_a$  bei 6.7 scheint plausibel<sup>59</sup>. Mit Ausnahme von Variante M7<sub>D123</sub> zeigten die DTNB-Versuche (siehe 4.3.6.1), sowohl bei den Proteinen als auch beim isolierten CPHC-Peptid keinen erkennbaren kinetischen Einfluss des Histidins über den gesamten Messbereich. Dies spricht dafür, dass die Imidazolseitenkette nicht in Wechselwirkung mit den CXXC-Cysteinen steht, was hingegen für DsbA(wt) vermutet wird<sup>187</sup>. Variante M7<sub>D123</sub> spiegelte allerdings klar den Einfluss einer titrierbaren Gruppe um pH 6.5 wieder, bei der es sich wohl um das CPHC-Histidin

handelt. Hier führt die Deprotonierung allerdings zu einem drastischen Einbruch der Reaktivität des zweiten Cysteins (Abbildung 4.3.6- II). Die kinetischen Daten decken sich mit den Untersuchungen zur Salzabhängigkeit des Redoxpotentials (Tabelle 4.3- II). Nur für M7<sub>Di23</sub> konnte ein Einfluss der Ionenstärke beobachtet werden, der mit DsbA(wt) vergleichbar ist. Dies stützt die Vermutung, dass die ionisierbare Imidazolgruppe des CPHC-Histidins mit den reaktiven Cysteinen interagiert. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die verringerte Geschwindigkeitskonstante der Oxidation von M7<sub>Di23</sub> mit DTT<sub>OX</sub> bei pH 7.0 (Tabelle 4.3- V), die beide Cysteine in der Thiolatform voraussetzt. Möglicherweise blockiert das Histidin in seiner deprotonierten Form den initialen nukleophilen Angriff eines Cysteins auf das oxidierte DTT. Damit wird gleichzeitig eine strukturierte Einbettung vom CPHC-Peptid im M7<sub>Di23</sub> wahrscheinlich.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass bereits mit dem einfachen rationalen Designansatz dieser Arbeit die Aktivierung von mindestens einem Cystein durch die Struktur von M7 erfolgreich zu sein scheint. Im Resultat werden von den CXXC-Varianten, gegenüber den Kontrollreaktionen, moderate Steigerungen in der Redoxaktivität erzielt.

### 5.3. Weiterführende Versuche

#### 5.3.1. Weitere Experimente im ersten Designzyklus

In dieser Arbeit wurden redoxaktive Varianten des Strukturprotein M7 durch die Implementierung der CXXC-Tetrapeptid-Sequenz der Oxidoreduktasen Thioredoxin und DsbA erzeugt. Die Redoxaktivität ist die eigentliche *in vivo* relevante Größe, da biologische Prozesse kinetisch kontrolliert sind. Gesteuert wird die Redoxaktivität, wie unter 1.7 beschrieben, über die Geometrie der Disulfidaustauschreaktion, das Redoxpotential und den pK<sub>a</sub>-Wert bzw. die Nukleophilie der CXXC-Cysteine. Zur Bestimmung der Oxidationskinetik wurde DTT<sub>RED</sub> als Substrat verwendet. Für diese Reaktion liegen ausreichend Literaturwerte vor. Zur Messung der Reduktionskinetik in dieser Arbeit wurde DTT<sub>OX</sub> und DTNB als Substrat genutzt. Für DTT<sub>OX</sub> wiederum liegen leider keinerlei Literaturwerte für Vergleichsmessungen mit Oxidoreduktasen vor. Desweiteren ist es biologisch nicht relevant und kann aufgrund seines niedrigen Redoxpotentials (-320 mV) nur in sehr hohen Konzentrationen, nahe seiner Löslichkeitsgrenze eingesetzt werden ( $\approx 80$  mM). Die Reduktion von DTNB hingegen ist aufgrund der hervorragenden Abgangsgruppe TNB<sup>2-</sup> entropisch stark begünstigt. Damit ist DTNB gegenüber Thiolat-Resten äußerst reaktiv und kinetische Unterschiede sind schwerer zu deuten. Daher wäre der Einsatz von Glutathion oder geeigneten Modellpeptiden mit zwei Cysteinyln-Resten (keine CXXC-Sequenz) als Substrat zur Bestimmung der Redoxkinetiken denkbar. Ein Beispielpeptid ist das dreizehn Reste lange Peptidfragment von SigA nach Paxman *et al.* (2009)<sup>71</sup>. Peptide bieten auch eine gute Möglichkeit um Hydrophobizität und sterische Eigenschaften im Substrat zu variieren. Hierdurch würden auch Informationen gewonnen werden, die nützlich wären für die Konstruktion von möglichen Protein-Substratbindestellen in zukünftigen Designzyklen (siehe 5.3.2).

Die kinetischen Versuche sollten ebenfalls bei unterschiedlichen pH-Werten (pH  $\leq 6.0$ ) durchgeführt werden, um den Einfluss der Histidin-Ionisierung abzuschätzen. Der Einfluss des Histidins kann dabei nicht nur kinetischer Natur sein, sondern ebenso die Stabilität des oxidierten bzw. des reduzierten Zustands betreffen. Deshalb ist es interessant sowohl die Proteinstabilität als auch das Redoxpotentials bei pH  $\leq 6.0$  zu bestimmen.

Aus funktioneller Sicht sollten die Redoxvarianten *in vivo* getestet werden. Dies könnte in Supplementierungsversuchen für DsbA(wt) in DsbA-defizienten *E. coli*-Stämmen erfolgen. Analysiert wird beispielweise die Mobilität der Bakterien, da DsbA zur Funktionalisierung der Flagelle nötig ist<sup>188</sup>. Positive Varianten können durch Randomisierung (*directed evolution*) von Resten in der Umgebung der CXXC-Sequenz in ihrer Aktivität noch gesteigert werden. Als möglicher Selektionsdruck kommt das Reduktionsmittel DTT infrage, da DsbA-defiziente *E. coli*-Kulturen unter reduzierenden Bedingungen kein Wachstum zeigen<sup>71</sup>. Auf ähnliche Weise kann eine potentielle Disulfid-Isomeraseaktivität der Varianten in DsbC-Null-Varianten unter Kupferchlorid-Stress<sup>107</sup> oder durch die Bildung von Substraten mit nicht-konsekutiven Disulfidbindungen (z.B. alkalische Phosphatase<sup>63</sup>, RNase I<sup>189</sup>) untersucht werden. Sowohl Reduktionsvermögen als auch Isomeraseaktivität wurden bereits *in vitro* anhand des Insulin-Reduktionsassays nach Holmgren (1979)<sup>105</sup> und durch Aprotinin-Faltungsassays nach Zapun *et al.* (1995)<sup>190</sup> durch W. Hannemann (2017)<sup>110</sup> getestet. Auch hier lieferten einzelne Varianten des ersten Designzyklus von redoxaktiven M7-Varianten bereits signifikante Aktivitäten.

### 5.3.2. Der folgende Designzyklus

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass die Insertion einer enzymatischen Funktionalität in ein *de novo* designtes Protein ein erwartbar komplexes Unterfangen ist. Es konnten bereits im hier dargestellten ersten Designzyklus moderate Erfolge hinsichtlich der Redoxaktivität erzielt werden. Dabei beruhte dieser initiale Designzyklus lediglich auf der rationalen Implementierung der CXXC-Tetrapeptid-Sequenz. Die Mutation sollte Eigenschaften von CXXC-Oxidoreduktasen aufgreifen, die unmittelbar durch die nähere Primärsequenz erzeugt werden, sprich die Dipeptid-Sequenz zwischen den Cysteinen, die Lösungsmittelzugänglichkeit und die Lokalisation am  $\alpha$ -Helix-N-Terminus. Die Thioredoxin-Superfamilie besitzt allerdings eine hochgradig konservierte Struktur, die im hier beschriebenen Design nicht beachtet wurde: den *cis*-Prolin Loop. Wie unter 1.6 beschrieben, kann der Rest N-terminal vom *cis*-Prolin über hydrophile oder hydrophobe Wechselwirkungen mit den CXXC-Cysteinen interagieren und somit direkt das Redoxpotential und damit die Proteinstabilität beeinflussen<sup>38,69</sup>. Ebenso entscheidend ist der *cis*-Prolin Loop für die Bindung des Substrats<sup>38,49,58,71</sup> (siehe 1.4 und 1.5) und die damit verbundene optimale Sterik der Disulfidaustauschreaktion<sup>80</sup> (siehe 1.7). Mutationen des Prolins führten zu Aktivitätsverlusten von bis 99 % in Thioredoxin<sup>88,169</sup>. Daher ist es für den folgenden Designzyklus äußerst interessant eine Struktur in die redoxM7-Varianten einzufügen, die die Substratbindefunktion des *cis*-Prolin Loops übernimmt. Dies könnte die bisherigen Katalyseraten der M7-Redoxvarianten erheblich steigern. Die Insertion einer Peptidbinde-Domäne kann am N-Terminus oder im Loop zwischen  $\beta_3$ -Strang und  $\alpha_2$ -Helix in den M7-Varianten realisiert werden. Beide Bereiche befinden sich in direkter räumlicher Nähe zum Loop-Helix-Bereich, der die CXXC-Mutation beinhaltet. Zur Substratbindung kommt z.B. die IF-Domäne von SlyD in Frage. Diese wurde bereits erfolgreich mit der Funktion zur Substratbindung in nicht verwandte Proteine eingefügt<sup>191</sup>. Ideal für Disulfidaustauschreaktionen erfolgt die Assoziation und Dissoziation von ungefalteten Peptidsubstraten mit hoher Dynamik und moderater Affinität ( $K_D \approx 5 \mu\text{M}$ )<sup>191</sup>. Ein weiterer Ansatz für den folgenden Designzyklus umfasst die Optimierung der CXXC-Umgebung um das Redoxpotential stärker zu modulieren. So könnte eine Erhöhung in der Hydrophobizität bzw. die Verringerung in der Dielektrizitätskonstante, die elektrostatischen Wechselwirkungen der CXXC-Cysteine verstärken und somit stärkere Oxidationsmittel hervorbringen<sup>192</sup>. Für eine verbesserte Einbettung der CXXC-Sequenz in die  $\alpha$ -Helix-Loop-Region bietet sich ein computergestützter Ansatz

an. Dieser würde auch eine zielgerichtete Anpassung der Dielektrizitätskonstante um das CXXC-Motiv ermöglichen. Geplant hierfür ist die Anwendung des „Tetrapeptidbasierten-Proteindesign“-Algorithmus<sup>6</sup>, durch den ursprünglich M7 hervorgegangen ist. Hierfür wurde bereits in dieser Arbeit eine entsprechende nicht-redundante Tetrapeptid-Bibliothek aus der PDB-Datenbank generiert. Diese Bibliothek ist die Grundlage für den Algorithmus, der wiederum neue Proteinsequenzen erzeugt, die in die gewünschte Zielstruktur falten sollen. Neue optimierte M7-Sequenzen wurden allerdings noch nicht berechnet.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ballinger, M. D., Tom, J. & Wells, J. A. Furlisin: A variant of subtilisin BPN' engineered for cleaving tribasic substrates. *Biochemistry* 35, 13579–13585 (1996).
2. Henderson, G. B. *et al.* Engineering the substrate specificity of glutathione reductase toward that of trypanothione reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8769–8773 (1991).
3. Simons, K. T., Bonneau, R., Ruczinski, I. & Baker, D. *Ab initio*: Prediction reports: *Ab initio* protein structure prediction of CASP III targets using Rosetta. *Proteins Struct. Funct. Genet. Suppl 3* Suppl 3, 171–176 (1999).
4. Richter, F., Leaver-Fay, A., Khare, S. D., Bjelic, S. & Baker, D. *De novo* enzyme design using Rosetta3. *Plos* 6, e19230 (2011).
5. Kuhlman, B. *et al.* Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science*. 302, 1364–1368 (2003).
6. Dallüge, R. *et al.* A tetrapeptide fragment-based design method results in highly stable artificial proteins. *Proteins* 68, 839–849 (2007).
7. Bale, J. B. *et al.* Accurate design of megadalton-scale two-component icosahedral protein complexes. *Protein Des.* 353, 389–394 (2016).
8. Das, R. *et al.* Structure prediction for CASP7 targets using extensive all-atom refinement with Rosetta@home. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 69, 118–128 (2007).
9. Antala, S., Ovchinnikov, S., Kamisetty, H., Baker, D. & Dempski, R. E. Computation and functional studies provide a model for the structure of the zinc transporter hZIP4. *J. Biol. Chem.* 290, 17796–17805 (2015).
10. Song, W. J. & Tezcan, F. A. A designed supramolecular protein assembly with *in vivo* enzymatic activity. *Protein Des.* 346, 1525–15228 (2012).
11. Korendovych, I. V *et al.* Design of a switchable eliminase. *PNAS* 108, 6823–6827 (2011).
12. Rajagopalan, S. *et al.* Design of activated serine-containing catalytic triads with atomic-level accuracy. *Nat. Chem. Biol.* 10, 386–391 (2014).
13. Nixon, A. E., Firestine, S. M., Salinas, F. G. & Benkovic, S. J. Rational design of a scytalone dehydratase-like enzyme using a structurally homologous protein scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3568–3571 (1999).
14. Bolon, D. N. & Mayo, S. L. Enzyme-like proteins by computational design. *PNAS* 98, 14274–14279 (2001).
15. Richter, F. *et al.* Computational design of catalytic dyads and oxyanion holes for ester hydrolysis. *JACS* 134, 16197–16206 (2012).
16. Liu, D. S. *et al.* Computational design of a red fluorophore ligase for site-specific protein labeling in living cells. *PNAS* 111, E4551–E4559 (2014).
17. Whitehead, T. A. *et al.* Optimization of affinity, specificity and function of designed influenza inhibitors using deep sequencing. *Nat. Biotechnol.* 30, 543–548 (2012).
18. Preiswerk, N. *et al.* Impact of scaffold rigidity on the design and evolution of an artificial Diels-Alderase. *PNAS* 111, 8013–8018 (2014).
19. Kiss, G., Röthlisberger, D., Baker, D. & Houk, K. N. Evaluation and ranking of enzyme designs. *Protein Sci.* 19, 1760–1773 (2010).
20. Lichtenstein, B. R. *et al.* Engineering oxidoreductases: maquette proteins designed from scratch. *Biochem Soc Trans.* 40, 561–566 (2013).
21. Farid, T. A. *et al.* Elementary tetrahelical protein design for diverse oxidoreductase functions. *Nat. Chem. Biol.* 9, 826–835 (2013).
22. Glover, D. J. & Clark, D. S. Protein calligraphy: A new concept begins to take shape. *ACS Cent. Sci.* 2, 438–444 (2016).

23. Procko, E. *et al.* Computational design of a protein-based enzyme inhibitor. *J. Mol. Biol.* 425, 3563–3575 (2013).
24. Glover, D. J., Giger, L., Kim, S. S., Naik, R. R. & Clark, D. S. Geometrical assembly of ultrastable protein templates for nanomaterials. *Nat. Commun.* 1, 1–9 (2016).
25. King, N. P. *et al.* Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy. *Science (80-. )*. 336, 1171–1174 (2012).
26. Renata, H., Wang, Z. J. & Arnold, F. H. Expanding the enzyme universe: accessing non-natural reactions by mechanism-guided directed evolution. *Angew. Chem. Int. Ed* 54, 3351–3367 (2015).
27. Garrabou, X., Wicky, B. I. M. & Hilvert, D. Fast Knoevenagel condensations catalyzed by an artificial Schiff-Base-forming enzyme. *JACS* 138, 6972–6974 (2016).
28. Siegel, J. B. *et al.* Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. *Science (80-. )*. 329, 309–313 (2010).
29. Coelho, P. S., Brustad, E. M., Kannan, A. & Arnold, F. H. Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes. *Science (80-. )*. 339, 307–310 (2012).
30. Stordeur, C. *et al.* The NMR solution structure of the artificial designed model M7 matches the computationally designed model. *Proteins* 72, 1104–1107 (2008).
31. Johansson, K. E. *et al.* Computational redesign of thioredoxin is hypersensitive toward minor conformational changes in the backbone template. *J. Mol. Biol.* 428, 4361–4377 (2016).
32. Dallüge, R. *Tetrapeptidbasiertes Proteindesign - Ein Lösungsansatz für das inverse Proteinfaltungsproblem.* 84–85 (2008).
33. Thompson, M. J. & Eisenberg, D. Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J. Mol. Biol.* 290, 595–604 (1999).
34. Jackson, S. E. How do small single-domain proteins fold? *Fold. Des.* 3, R81–91 (1998).
35. Trabitz, S. *Untersuchung der Faltung des artifiziellen Proteins M7.* Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit. 1–79 (2008).
36. Basanta, B. *et al.* Introduction of a polar core into the *de novo* designed protein Top7. *Protein Sci.* 25, 1299–1307 (2016).
37. Zhu, C. *et al.* Slow and bimolecular folding of a *de novo* designed monomeric protein. *Biophys. J.* 105, 2141–2148 (2013).
38. Ren, G. *et al.* Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* 284, 10150–10159 (2009).
39. Huber-Wunderlich, M. & Glockshuber, R. A single dipeptide sequence modulates the redox properties of a whole enzyme family. *Fold. Des.* 3, 161–171 (1998).
40. Laurent, T. C., Moore, E. C. & Reichard, P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides IV. isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 239, 3436–3444 (1964).
41. Holmgren, A. Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 237–271 (1985).
42. Holmgren, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264, 13963–13966 (1989).
43. Arnér, E. S. J. & Holmgren, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6102–6109 (2000).
44. Hirota, K. *et al.* AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3633–3638 (1997).
45. Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K. & Ichijo, H. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin. Cancer Biol.* 16, 427–435 (2006).
46. Saitoh, M. *et al.* Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 17, 2596–2606 (1998).
47. Richardson, J. S. & Richardson, D. C. Amino acid preference for specific locations at the ends of  $\alpha$  helix. *Science.* 240, 1648–1652 (1988).

48. Maeda, K., Hägglund, P., Finnie, C., Svensson, B. & Henriksen, A. Structural basis for target protein recognition by the protein disulfide reductase thioredoxin. *Structure* 14, 1701–1710 (2006).
49. Atkinson, H. J. & Babbitt, P. C. An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000541 (2009).
50. Singha, N. C., Vlamis-Gardikas, A. & Holmgren, A. Real-time kinetics of the interaction between the two subunits, *Escherichia coli* thioredoxin and gene5 protein of phage T7 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 278, 21421–24128 (2003).
51. Björnberg, O., Maeda, K., Svensson, B. & Hägglund, P. Dissecting molecular interactions involved in recognition of target disulfides by the barley thioredoxin system. *Biochemistry* 51, 9930–9939 (2012).
52. Singh, R. & Whitesides, G. M. in *In: S. Patai, and Z. Rappoport, Z. (eds.), Supplement S: The Chemistry of Sulphur-containing Functional Groups; Chichester: Wiley* 633–658 (1993).
53. Pearson, R. G. The HSAB principle - more quantitative aspects. *Inorg. Chim. Acta* 240 240, 93–98 (1995).
54. Roos, G. *et al.* How thioredoxin dissociates its mixed disulfide. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000461 (2009).
55. Mora-García, S., Rodríguez-Suárez, R. & Wolosiuk, R. A. Role of electrostatic interactions on the affinity of thioredoxin for target proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 16273–16280 (1998).
56. Shouldice, S. R. *et al.* Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 1729–1760 (2011).
57. Martin, J. L., Bardwell, J. C. A. & Kuriyan, J. Crystal structure of the DsbA protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Nature* 365, 464–468 (1993).
58. Voigtmann, M. & Lilie, H. The CXXC Motif – structure and redox properties of oxidoreductases. *Biol. Chem.* Conditionally Accepted
59. Nelson, J. W. & Creighton, T. E. Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry* 33, 5974–5983 (1994).
60. Schirra, H. J. NMR investigations on DsbA from *Escherichia coli*. *Diss. ETH Zürich* pp74–77 (1999).
61. Piatek, R., Bruzdziak, P., Wojciechowski, M., Zalewska-Piatek, B. & Kur, J. The noncanonical disulfide bond as the important stabilizing element of the immunoglobulin fold of the Dr Fimbrial DraE subunit. *Biochemistry* 49, 1460–1468 (2010).
62. Kadokura, H. & Beckwith, J. Mechanisms of oxidative protein folding in the bacterial cell envelope. *Antioxidants & Redox Signaling* 13, 1231–1246 (2010).
63. Bardwell, J. C. A., McGovern, K. & Beckwith, J. Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* 67, 581–589 (1991).
64. Kamitani, S., Akiyama, Y. & Ito, K. Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *EMBO J* 11, 57–62 (1992).
65. Yamanaka, H., Kameyama, M., Baba, T., Fujii, Y. & Okamoto, K. Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable Enterotoxin I: Requirement of DsbA for disulfide bond formation. *J. Bacteriol.* 176, 2906–2913 (1994).
66. Zhang, H.-Z. & Sonnenberg, M. S. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21, 787–797 (1996).
67. Dailey, F. E. & Berg, H. C. Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1043–1047 (1993).
68. Frech, C., Wunderlich, M., Glockshuber, R. & Schmid, F. X. Preferential binding of an unfolded protein to DsbA. *EMBO J* 15, 392–398 (1996).
69. Kadokura, H., Tian, H., Zander, T., Bardwell, J. C. A. & Beckwith, J. Snapshots of DsbA in action: Detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science (80-. )*. 303, 534–537 (2004).
70. Dutton, R. J., Boyd, D., Berkmen, M. & Beckwith, J. Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *PNAS* 105, 11933–11938 (2008).

71. Paxman, J. J. *et al.* The structure of the bacterial oxidoreductase enzyme DsbA in complex with a peptide reveals a basis for substrate specificity in the catalytic cycle of DsbA enzymes. *J. Biol. Chem.* 284, 17835–17845 (2009).
72. Couprie, J., Vinci, F., Dugave, C., Quéméneur, E. & Moutiez, M. Investigation of the DsbA mechanism through the synthesis and analysis of an irreversible enzyme-ligand complex. *Biochemistry* 39, 6732–6742 (2000).
73. Wunderlich, M., Jaenicke, R. & Glockshuber, R. The redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) of *Escherichia coli* result from a tense conformation of its oxidized form. *J. Mol. Biol.* 233, 559–566 (1993).
74. Kobayashi, T. *et al.* Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11857–11862 (1997).
75. Lennon, B. W., Williams Jr., C. H. & Ludwig, M. L. Twists in catalysis: Alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science* (80-. ). 289, 1190–1194 (2000).
76. Horne, J. *et al.* Probing the flexibility of the DsbA oxidoreductase from *Vibrio cholerae* - a <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H heteronuclear NMR relaxation analysis of oxidized and reduced forms of DsbA. *J. Mol. Biol.* 371, 703–716 (2007).
77. Messens, J. & Collet, J.-F. Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *IJBCB* 38, 1050–1062 (2006).
78. Shouldice, S. R. *et al.* *In vivo* oxidative protein folding can be facilitated by oxidation-reduction cycling. *Mol. Microbiol.* 75, 13–28 (2010).
79. Bednar, R. A. Reactivity and pH dependence of thiol conjugation to N-ethylmaleimide: Detection of a conformational change in chalcone isomerase. *Biochemistry* 29, 3684–3690 (1990).
80. Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. Theoretical insights into the mechanism for thiol/disulfide exchange. *Chem. Eur. J.* 10, 257–266 (2004).
81. Bulaj, G., Kortemme, T. & Goldenberg, D. P. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* 37, 8965–8972 (1998).
82. Mössner, E., Huber-Wunderlich, M. & Glockshuber, R. Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci.* 7, 1233–1244 (1998).
83. Grauschopf, U. *et al.* Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell* 83, 947–955 (1995).
84. Jeng, M.-F. *et al.* High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin. *Structure* 2, 853–868 (1994).
85. Dyson, H. J., Tennant, L. L. & Holmgren, A. Proton-transfer effects in the active-site region of *Escherichia coli* thioredoxin using two-dimensional <sup>1</sup>H NMR. *Biochemistry* 30, 4262–4268 (1991).
86. Aslund, F., Berndt, K. D. & Holmgren, A. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J. Biol. Chem.* 272, 30780–30786 (1997).
87. Quan, S., Schneider, I., Pan, J., Von Hacht, A. & Bardwell, J. C. A. The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J. Biol. Chem.* 282, 28823–28833 (2007).
88. Roderer, D. J. A., Schärer, M. A., Rubini, M. & Glockshuber, R. Acceleration of protein folding by four orders of magnitude through a single amino acid substitution. *Sci. Rep.* 5, 1–16 (2015).
89. Sitkoff, D., Lockhart, D. J., Sharp, K. A. & Honig, B. Calculation of electrostatic effects at the amino terminus of an  $\alpha$  helix. *Biophys. J.* 67, 2251–2260 (1994).
90. Madzellan, P., Labunska, T. & Wilson, M. A. Influence of peptide dipoles and hydrogen bonds on reactive cysteine pKa values in fission yeast DJ-1. *FEBS J.* 279, 4111–4120 (2012).
91. Hol, W. G. J., van Duijnen, P. T. & Berendsen, H. J. C. The  $\alpha$ -helix dipole and the properties of proteins. *Nature* 273, 443–446 (1978).

92. Kortemme, T. & Creighton, T. E. Ionisation of cysteine residues at the termini of model  $\alpha$ -helical peptides. Relevance to unusual thiol pK<sub>a</sub> values in proteins of the thioredoxin family. *J. Mol. Biol.* 253, 799–812 (1995).
93. Miranda, J. J. L. Position-dependent interactions between cysteine residues and the helix dipole. *Protein Sci.* 12, 73–81 (2003).
94. Petersen, M. T. N., Jonson, P. H. & Petersen, S. B. Amino acid neighbours and detailed conformational analysis of cysteines in proteins. *Protein Eng.* 12, 535–548 (1999).
95. Park, H. S., Kim, C. & Kang, Y. K. Preferred conformations of cyclic Ac–Cys–Pro–Xaa–Cys–NHMe peptides: A model for chain reversal and active site of disulfide oxidoreductase. *Biophys. Chem.* 105, 89–104 (2003).
96. Ren, B. *et al.* A protein disulfide oxidoreductase from the archaeon *Pyrococcus furiosus* contains two thioredoxin fold units. *Nat. Struct. Biol.* 5, 602–611 (1998).
97. Roos, G., Foloppe, N. & Messens, J. Understanding the pK<sub>a</sub> of redox cysteines: the key role of hydrogen bonding. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 94–127 (2013).
98. Jacobi, A., Huber-Wunderlich, M., Hennecke, J. & Glockshuber, R. Elimination of all charged residues in the vicinity of the active-site helix of the disulfide oxidoreductase DsbA. *J. Biol. Chem.* 272, 21692–21699 (1997).
99. Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomson, J. A. & Barnett, B. J. Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 263, 11820–11825 (1988).
100. Bowler, B. E. Residual structure in unfolded proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 4–13 (2012).
101. Cho, J. *et al.* Energetically significant networks of coupled interactions within an unfolded protein. *PNAS* 111, 12079–12084 (2014).
102. Wilmot, C. M. & Thornton, J. M. Analysis and prediction of the different types of  $\beta$ -turn in proteins. *J. Mol. Biol.* 203, 221–232 (1988).
103. Müller, G., Gurrath, M., Kurz, M. & Kessler, H.  $\beta$ -VI-turns in peptides and proteins: A model peptide mimicry. *Proteins* 15, 235–251 (1993).
104. Lin, T.-Y. Protein–protein interaction as a powering source of oxidoreductive reactivity. *Mol. Biosyst.* 6, 1454–1462 (2010).
105. Holmgren, A. Reduction of disulfides by thioredoxin - Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *J. Biol. Chem.* 254, 9113–9119 (1979).
106. Ferrer-Sueta, G. *et al.* Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 434–450 (2011).
107. Hiniker, A. *et al.* Laboratory evolution of one disulfide isomerase to resemble another. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 11670–11675 (2007).
108. Wilks, J. C. & Slonczewski, J. L. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J. Bacteriol.* 189, 5601–5607 (2007).
109. Hannemann, W. *Redoxaktive Varianten des Proteins M7. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Bachelorarbeit.* 1–70 (2013).
110. Hannemann, W. *Charakterisierung möglicher enzymatischer Aktivität von M7-Redoxvarianten. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Masterarbeit.* 1–86 (2017).
111. Nicolaus, F. *Biophysikalische Charakterisierung von redoxaktiven Varianten des Proteins M7. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Masterarbeit.* 1–65 (2014).
112. Bensadoun, A. & Weinstein, D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70, 241–250 (1976).
113. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).
114. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4354 (1979).

115. Svedberg, T. & Fåhræus, R. A new method for the determination of the molecular weight of the proteins. *JACS* 48, 430–438 (1926).
116. Takase, K., Nitta, K. & Sugai, S. Thermodynamics of the unfolding of  $\alpha$ -lactalbumin by guanidine thiocyanate. *BBA* 371, 352–359 (1974).
117. Nozaki, Y. The preparation of guanidine hydrochloride. *Methods Enzymol.* 26 PtC, 43–50 (1972).
118. Gill, S. C. & von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319–326 (1989).
119. Böhme, M. *Selektion M7-basierter künstlicher Bindeproteine mittels ribosome display. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit.* p34 (2011).
120. Han, Y., Albericio, F. & Barany, G. Occurrence and minimization of cysteine racemization during stepwise solid-phase peptide synthesis. *J. Org. Chem.* 62, 4307–4312 (1997).
121. Zapun, A., Cooper, L. & Creighton, T. E. Replacement of the active-site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Biochemistry* 33, 1907–1914 (1994).
122. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 70–77 (1959).
123. Collier, H. B. A note on the molar absorptivity of reduced Ellman's reagent, 3-carboxylato-4-nitrothiophenolate. *Anal. Biochem.* 56, 310–311 (1973).
124. Russell, J., McKeown, J. A., Hensman, C., Smith, W. E. & Reglinski, J. HPLC determination of biologically active thiols using pre-column derivatisation with 5,5'-dithio-(bis-2-nitrobenzoic acid). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1757–1763 (1997).
125. Yilmaz, Ö. *et al.* A practical HPLC method to measure reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations in animal tissues. *J. Anim. Vet. Adv.* 8, 343–347 (2009).
126. Rost, J. & Rapoport, S. Reduction-potential of glutathione. *Nature* 4915, 185 (1964).
127. Hawkins, H. C., De Nardi, M. & Freedman, R. B. Redox properties and cross-linking of the dithiol/disulphide active sites of mammalian protein disulphide-isomerase. *Biochem. J.* 275, 341–348 (1991).
128. Cleland, W. W. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3, 480–482 (1964).
129. Szajewski, R. P. & Whitesides, G. M. Rate constants and equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions involving oxidized glutathione. *JACS* 102, 2011–2026 (1980).
130. Regeimbal, J. & Bardwell, J. C. A. DsbB catalyzes disulfide bond formation *de novo*. *J. Biol. Chem.* 277, 32706–32713 (2002).
131. Beld, J., Woycechowsky, K. J. & Hilvert, D. Selenogluthathione: efficient oxidative protein folding by a diselenide. *Biochemistry* 46, 5382–5390 (2007).
132. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* 1751, 119–139 (2005).
133. Cota, E. & Clarke, J. Folding of  $\beta$ -sandwich proteins: Three-state transition of a fibronectin type III module. *Protein Sci.* 9, 112–120 (2000).
134. Santoro, M. M. & Bolen, D. W. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of Phenylmethanesulfonyl  $\alpha$ -Chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27, 8063–8068 (1988).
135. Nagy, P. Kinetics and mechanisms of thiol–disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxidants & Redox Signlaing* 18, 1623–1641 (2013).
136. Holmgren, A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by Dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* 254, 9627–9632 (1979).
137. Grzesiek, S., Stahl, S. J., Wingfield, P. T. & Bax, A. The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* 35, 10256–10261 (1996).
138. Hass, M. A. S., Yilmaz, A., Christensen, H. E. M. & Led, J. J. Histidine side-chain dynamics and protonation monitored by  $^{13}\text{C}$  CPMG NMR relaxation dispersion. *J. Biolmol. NMR* 44, 225–233 (2009).

139. Edelhoich, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948–1954 (1967).
140. Pace, N. C., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411–2423 (1995).
141. Hennecke, J., Spleiss, C. & Glockshuber, R. Influence of acidic residues and the kink in the active-site helix on the properties of the disulfide oxidoreductase DsbA. *J. Biol. Chem.* 272, 189–195 (1997).
142. Riddles, P. W., Blakeley, R. L. & Zerner, B. Ellman's Reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) - a reexamination. *Anal. Biochem.* 94, 75–81 (1979).
143. Wunderlich, M. *et al.* Efficient catalysis of disulfide formation during protein folding with a single active-site cysteine. *J. Mol. Biol.* 247, 28–33 (1995).
144. Wunderlich, M., Otto, A., Seckler, R. & Glockshuber, R. Bacterial protein disulfide isomerase: Efficient catalysis of oxidative protein folding at acidic pH. *Biochemistry* 32, 12251–12256 (1993).
145. Brahms, S. & Brahms, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* 138, 149–178 (1980).
146. Perczel, A. & Fasman, G. D. Quantitative analysis of cyclic  $\beta$ -turn models. *Protein Sci.* 1, 378–395 (1992).
147. Kelly, S. M. & Price, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1, 349–384 (2000).
148. Krittanaï, C. & Johnson Jr., W. C. Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains. *Anal. Biochem.* 253, 57–64 (1997).
149. Stordeur, C. *NMR-Spektroskopische Untersuchungen an artifiziellen Proteinen. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit.* pp 40–43 (2007).
150. Guddat, L. W., Bardwell, J. C. A. & Martin, J. L. Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: Investigation of domain motion and thiolate stabilization. *Structure* 6, 757–767 (1998).
151. Shimba, N. *et al.* Quantitative identification of the protonation state of histidines *in vitro* and *in vivo*. *Biochemistry* 42, 9227–9234 (2003).
152. Hansen, A. L. & Kay, L. E. Measurement of histidine pKa values and tautomer populations in invisible protein states. *PNAS* 111, E1705–E1712 (2014).
153. Jackson, S. E. & Fersht, A. R. Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition. *Biochemistry* 30, 10428–10435 (1991).
154. Blagdon, D. E. & Goodman, M. Mechanisms of protein and polypeptide helix initiation. *Biopolymers* 14, 241–245 (1975).
155. Moutiez, M., Burova, T. V., Haertlé, T. & Quéméneur, E. On the non-respect of the thermodynamic cycle by DsbA variants. *Protein Sci.* 8, 106–112 (1999).
156. Siedler, F., Rudolph-Böhner, S., Doi, M., Musiol, H.-J. & Moroder, L. Redox potentials of active-site bis(cysteinylyl) fragments of thiol-protein oxidoreductases. *Biochemistry* 32, 7488–7495 (1993).
157. Myers, J. K., Pace, C. N. & Scholtz, J. M. Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* 4, 2138–2148 (1995).
158. Mayne, L. & Englander, S. W. Two-state vs. multistate protein unfolding studied by optical melting and hydrogen exchange. *Protein Sci.* 9, 1873–1877 (2000).
159. Guinn, E. J., Kontur, W. S., Tsodikov, O. V., Shkel, I. & Record Jr., M. T. Probing the protein-folding mechanism using denaturant and temperature effects on rate constants. *PNAS* 110, 16784–16789 (2013).
160. Gerstein, M. A resolution-sensitive procedure for comparing protein surfaces and its application to the comparison of antigen-combining sites. *Acta Cryst.* A48, 271–276 (1992).
161. Creamer, T. P., Srinivasan, R. & Rose, G. D. Modeling unfolded states of proteins and peptides. II. Backbone solvent accessibility. *Biochemistry* 36, 2832–2835 (1997).

162. Nathaniel, C., Wallace, L. A., Burke, J. & Dirr, H. W. The role of an evolutionarily conserved cis-proline in the thioredoxin-like domain of human class Alpha glutathione transferase A1-1. *Biochem. J.* 372, 241–246 (2003).
163. Teale, F. W. J. The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution. *Biochem. J.* 76, 381–388 (1960).
164. Cowgill, R. Fluorescence and the structure of proteins. III. Effects of denaturation on fluorescence of insulin and ribonuclease. *Arch. Biochem. Biophys.* 104, 84–92 (1964).
165. Giancotti, V., Quadrifoglio, F., Cowgill, R. & Crane-Robinson, C. Fluorescence of buried tyrosine residues in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 624, 60–65 (1980).
166. Lee, J. & Ross, R. T. Absorption and fluorescence of tyrosine hydrogen-bonded to amide-like ligands. *J. Phys. Chem. B* 102, 4612–4618 (1998).
167. Brown, S. B., Turner, R. J., Roche, R. S. & Stevenson, K. J. Spectroscopic characterization of thioredoxin covalently modified with monofunctional organoarsenical reagents. *Biochemistry* 26, 863–871 (1987).
168. Sandberg, V. A., Kren, B., Fuchs, J. A. & Woodward, C. *Escherichia coli* Glutaredoxin: Cloning and overexpression, thermodynamic stability of the oxidized and reduced forms, and report of an N-terminal extended species. *Biochemistry* 30, 5475–5484 (1991).
169. Su, D., Berndt, C., Fomenko, D. E., Holmgren, A. & Gladyshev, V. N. A conserved cis-proline precludes metal binding by the active site thiolates in members of the thioredoxin family of proteins. *Biochemistry* 46, 6903–6910 (2007).
170. Bonneau, E. & Legault, P. NMR localization of divalent cations at the active site of the Neurospora VS ribozyme provides insights into RNA – metal-ion interactions. *Biochemistry* 53, 579–590 (2014).
171. Dalvit, C., Tennant, L. & Wright, P. E. <sup>1</sup>H NMR studies of heme pocket conformation in zinc-substituted leghemoglobin, a diamagnetic analog of deoxyhemoglobin. *J. Inorg. Biochem.* 28, 303–309 (1986).
172. Rozema, D. B. & Poulter, C. D. Yeast protein farnesyltransferase. pK<sub>a</sub>s of peptide substrates bound as zinc thiolates. *Biochemistry* 38, 13138–13146 (1999).
173. Wolff, N. *et al.* Histidine pK<sub>a</sub> shifts and changes of tautomeric states induced by the binding of gallium-protoporphyrin IX in the hemophore HasASM. *Protein Sci.* 11, 757–765 (2002).
174. Shimahara, H. *et al.* Tautomerism of histidine 64 associated with proton transfer in catalysis of carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 282, 9646–9656 (2007).
175. Shi, T., Spain, S. M. & Rabenstein, D. L. Unexpectedly fast cis/trans isomerization of Xaa-Pro peptide bonds in disulfide-constrained cyclic peptides. *JACS* 126, 790–796 (2004).
176. Watters, A. L. *et al.* Theory the highly cooperative folding of small naturally occurring proteins is likely the result of natural selection. *Cell* 128, 613–624 (2007).
177. Privalov, P. L. Intermediate states in protein folding. *J. Mol. Biol.* 258, 707–725 (1996).
178. Krieger, F., Möglich, A. & Kiefhaber, T. Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains. *JACS* 127, 3346–3352 (2005).
179. Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. A revised set of potentials for  $\beta$ -turn formation in proteins. *Protein Sci.* 3, 2207–2216 (1994).
180. Chou, P. Y. & Fasman, G. D. Prediction of  $\beta$ -turns. *Biophys. J.* 26, 367–383 (1979).
181. Zimmerman, S. S. & Scheraga, H. A. Influence of local interactions on protein structure. I. Conformational energy studies of N-Acetyl-N'-Methylamides of Pro-X and X-Pro dipeptides. *Biopolymers* 16, 811–843 (1977).
182. Ostergaard, H., Henriksen, A., Hansen, F. G. & Winther, J. R. Shedding light on disulfide bond formation: Engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J.* 20, 5853–5862 (2001).
183. Maret, W. & Weed, A. Binding, transport and storage of metal ions in biological cells. *RSC Met. Ser. No. 2, Cambridge, UK.* 2, pp 644–645 (2014).
184. Thurlkill, R. L., Grimsley, G. R., Scholtz, J. M. & Pace, C. N. pK values of the ionizable groups of proteins. *Protein Sci.* 15, 1214–1218 (2006).

185. Tsilikounas, E., Rao, T., Gutheil, W. G. & Bachovchin, W. W. <sup>15</sup>N and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of the catalytic histidine in chloromethyl ketone-inhibited complexes of serine proteases. *Biochemistry* 35, 2437–2444 (1996).
186. Garcin, E. B. *et al.* Structural and mechanistic insights into unusual thiol disulfide oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 287, 1688–1697 (2012).
187. Guddat, L. W. *et al.* Structural analysis of three His32 mutants of DsbA: Support for an electrostatic role of His32 in DsbA stability. *Protein Sci.* 6, 1893–1900 (1997).
188. Heras, B. *et al.* DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 215–225 (2009).
189. Messens, J. *et al.* The oxidase DsbA folds a protein with a nonconsecutive disulfide. *J. Biol. Chem.* 282, 31302–31307 (2007).
190. Zapun, A., Missiakas, D., Rains, S. & Creighton, T. E. Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*? *Biochemistry* 34, 5075–5089 (1995).
191. Geitner, A., Varga, E., Wehmer, M. & Schmid, F. X. Generation of a highly active folding enzyme by combining a Parvulin-Type prolyl isomerase from SurA with an unrelated chaperone domain. *J. Mol. Biol.* 425, 4089–4098 (2013).
192. Warwicker, J. & Gane, P. J. Calculation of Cys 30 ΔpK<sub>a</sub>'s and oxidising power for DsbA mutants. *FEBS Lett.* 385, 105–108 (1996).

## 7. Anhang

### 7.1. Herleitung der Gleichgewichtskonstante (K) von Redoxreaktionen

Die Gleichgewichtskonstante ( $K$ ) ergibt sich aus dem Redoxgleichgewicht der M7-Varianten mit einem zweiten Redoxpaar (z.B. Glutathion):



$$K = \frac{\text{M7}_{\text{OX}} \cdot \text{GSH}^2}{\text{M7}_{\text{RED}} \cdot \text{GSSG}} \quad 7\text{-II}$$

In der Auftragung der Redox Titration  $\text{GSH}^2/\text{GSSG}$  als Abszisse ( $x$ ) gegen den relativen Anteil reduziertes  $\text{M7}_{\text{RED}}$   $R$  (siehe Gleichung 7-III) als Ordinate ( $y$ ) erhält man  $K$  aus dem Fit nach Hawkins *et al.* (1971)<sup>127</sup> (siehe Gleichung 7-V).

$$R = \frac{\text{M7}_{\text{RED}}}{\text{M7}_{\text{RED}} + \text{M7}_{\text{OX}}} \quad 7\text{-III}$$

Der Fit leitet sich aus den Gleichungen 7-II und 7-III her. Gleichung 7-II wird nach  $\text{M7}_{\text{RED}}$  umgestellt und in Gleichung 7-III eingesetzt:

$$R = \frac{\frac{\text{M7}_{\text{OX}} \cdot \text{GSH}^2}{K \cdot \text{GSSG}}}{\frac{\text{M7}_{\text{OX}} \cdot \text{GSH}^2}{K \cdot \text{GSSG}} + \text{M7}_{\text{OX}}} \quad 7\text{-IV}$$

Nach Ausklammern von  $\left(\frac{\text{M7}_{\text{OX}}}{K}\right)$  ergibt sich Gleichung 7-V und somit die Fit-Gleichung 7-V.

$$R = \frac{\frac{\text{GSH}^2}{\text{GSSG}}}{\frac{\text{GSH}^2}{\text{GSSG}} + K} \quad 7\text{-V}$$

$$y = \frac{x}{x + K} \quad 7\text{-VI}$$

Die Gleichgewichtskonstante ( $K$ ) aus dem Redoxgleichgewicht zwischen M7-Redoxvarianten und DTT wurde ebenfalls mit dem Fit 7-V ermittelt.

### 7.2. Vergleich des Peptidrückgrats von M7 mit DsbA, Thioredoxin und Top7

In Tabelle 7.2- I werden die  $\phi$  ( $\phi$ )- und  $\psi$  ( $\psi$ )-Dieederwinkel (in °) der Reste N- (in schwarz) und C-terminal (in blau) um das N-Cap (in orange) von  $\alpha_1$ -Helix in M7 und Top7, sowie um die CXXC-Sequenz von Thioredoxin und DsbA dargestellt. Für jeden Rest beschreibt der erst genannte Wert den phi- und der zweite den psi-Winkel. Die Bestimmung der Winkel erfolgte über Pymol anhand folgender pdb-Dateien: M7 - 2JVF; DsbA<sub>OX</sub> - 1A2M; DsbA<sub>RED</sub> - 1A2L; Trx<sub>OX</sub> - 1XOA; Trx<sub>RED</sub> - 1XOB; Top7 - 1QYS.

Tabelle 7.2- I:  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel (in °) der Reste um das N-Cap von M7, Trx, DsbA und Top7

M7	Val	Ser	Thr	Gly	Lys <sub>25</sub>	Glu	Leu	Glu	Arg
	-151 138	-121 106	-160 -66	112 131	78 -35	-62 -31	-54 -54	-56 -49	-58 -49
DsbA	Phe	Ser	Phe	Phe	Cys <sub>30</sub>	Pro	His	Cys	Tyr
ox	-156 -180	-155 142	-73 -15	-101 42	-140 106	-49 -49	-67 -27	-73 -38	-60 -51
DsbA	Phe	Ser	Phe	Phe	Cys <sub>30</sub>	Pro	His	Cys	Tyr
RED	-140 -174	-161 123	-60 5	-97 -29	-73 127	-62 -46	-56 -47	-59 -32	-63 -54
Trx	Trp	Ala	Thr	Trp	Cys <sub>32</sub>	Gly	Pro	Cys	Lys
ox	-151 173	-127 143	-70 -18	-91 -12	-77 131	-56 -60	-67 -19	-71 -47	-64 -32
Trx	Trp	Ala	Thr	Trp	Cys <sub>32</sub>	Gly	Pro	Cys	Lys
RED	-148 170	-144 149	-64 -22	-79 -6	-105 130	-61 -57	-56 -35	-63 -46	-63 -34
Top7	Thr	Val	Thr	Thr	Glu <sub>25</sub>	Ser	Leu	Gln	Lys
	-140 113	-119 170	-159 81	-177 -37	69 -7	-100 -51	-77 1	-84 -40	-63 -25

### 7.3. Sequenz, Molekulargewicht und $\epsilon_{280nm}$ verwendeter Proteine und Peptide

Im Folgenden ist die vollständige DNA-Sequenz von M7 (grün) im pET15b Vektor dargestellt. Hervorgehoben sind die Sequenzen der T7-Primer (cyan), des Hexahistidin-tags (gelb) und die Thrombinschnittstelle (grau).

DNA Sequenz CPHC-Tetrapeptid: **TGC CCA CAT TGC**

DNA Sequenz CGPC-Tetrapeptid: **TGC GGT CCA TGC**

```

TTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGAC
GTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA
TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTT
CCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGT
AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGA
GAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCG
TGTTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGT
CACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCA
TGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCC
TGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCAGCAACAATTAAT
AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGA
TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT
CGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC
ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTA
ATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTTGATTTTCGTCCA
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTT
GCAAACAAAAAACACCCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGT
AACTGGCTTACAGCAGAGCGCAGATAACAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAA
CTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG
TCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCAC
ACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
AGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGGAGCGTGCATTTTTGTGATG
CTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGTGCTGCC
TTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGA
TACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTA
TTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCC
GCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACAC

```

CCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCT  
 GCATGTGTGACAGGTTTTTACCCTGCATCACCAGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTTCGT  
 GAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGC  
 TTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTTT  
 TGTTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCC  
 GGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTC  
 AATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTCGCATGCAGATCCGGA  
 ACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTCAGACTTTACGAAACACGAAACCGAAGACCATTTCATGTTG  
 TTGCTCAGGTCCAGACGTTTTTGCAGCAGCAGTCCGTTACGTTCCGCTCGCATCGGTGATTCATTTGCTAAC  
 CAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGCCGACCCGTGCCAGGACC  
 CAACGCTGCCCGAGATGCGCCGCTGCGGCTGCTGGAGATGGCGGACGCGATGGATATGTTCTGCCAAGGGTTGG  
 TTTGCGCATTACAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGCTCCAATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCC  
 GCCGGCTTCCATTACAGGTGAGGTGGCCCGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAGGTATAG  
 GGCGGCGCCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCATGTGCTGCGCGAGGCGGCATAAAATCGCCGTGACGATCAGCGG  
 TCCAGTGATCGAAGTTAGGCTGGTAAGAGCCGCGAGCGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTTCGTCATCTACCTG  
 CCTGGACAGCATGGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGCGAGAAGAATCATAATGGGGAAGGCCAT  
 CCAGCCTCGCGTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCAGCGCGTCCGCGCCATGCCGCGATAATGGCCTGCTT  
 CTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAG  
 CGACAGGCCGATCATCGTTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTG  
 TCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCACCAGGAGGA  
 GCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAAT  
 TGCGTTGCGCTCACTGCCCGTTTTCCAGTCGGGAAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGC  
 GGGGAGAGGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTG  
 CCTTACCAGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCAGCAGGGCAAAAATCCTGTT  
 TGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGTTATCGTTCGATCCACTACCGAGATATCCGCAC  
 CAACGCGCAGCCCGGATCGGTAATGGCGCGCATTGCCAGCCAGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCCGCGAG  
 TGGAACGATGCCCTCATTAGCATTTCAGTGGTTTTGTTGAAAACCCGGACATGGCACTCCGCTTCCGCTT  
 CCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGACGAGCCGCGGAGACAGAAC  
 TTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGT  
 CTTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAAATAACGCCGGAACATTAGTGC  
 AGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGA  
 GAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCTTCGTTTACCATCGACACCACCAGCTGGCACCCA  
 GTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGC  
 CAATCAGCAACGACTGTTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCG  
 CTTCCACTTTTTTCCCGCTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTACCACGCGGGAAAACGGTCTGATAAGAGA  
 CACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGC  
 GCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGAC  
 TCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAG  
 GAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAAACAAGCGCTCATGAGCCCG  
 AAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTG  
 ATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGG  
 AATTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTAAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGC  
 AGCTCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTCCGCGCGGAGCCATATGAAAAGTGGATATCACCATCAAA  
 ATTCAGCGTGTATGGCCAGAAATCGAAATGATATCCGCGTGCAGACCGGTAAGAAGCTGGAACGTGCGCTGCAG  
 GAACTGAAAAAAGCGCTGGCGCGCGGGCGCGGTAATGTTAGATTACCATCAGCGCGGAAAAATGATGACAG  
 GCGAAAAGAACTGCTGGAAGTATTGCGCGTCTGCTGCAGAAACTGGGCTATAAAGATATCAACGTGCGCGTTAAT  
 GGCACC GAAGTGAAAATCGAAGTTTCGCGTTTTAAGGATCCGGCTGCTAACAAAAGCCCGAAAAGGAAGCTGAGTTGGC  
 TGCTGCC ACCGCTGAGCAATAACTAG CATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGGAGGGTTTTTTTGGCTGAA  
 AGGAGGAACTATATCCGGATATCCCGCAAGAGGCCCGGCGAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCC  
 AGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTTCATACCGGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTT  
 AACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAA

In Tabelle 7.3- I werden die Aminosäuresequenzen des M7(wt)-Proteins, der Redoxvarianten von M7, der verwendeten CXXC-Peptide, sowie von DsbA (wt ohne Signalpeptid) gezeigt. Alle Proteine waren mit einem N-terminalen Hexahistidin-*tag* (gelb markiert) und einer Thrombinschnittstelle (grau markiert) zwischen *tag* und Protein versehen. Diese sind exemplarisch für die Sequenz des M7(wt) dargestellt. Alle übrigen Sequenzen repräsentieren die Proteine nach der Proteolyse durch Thrombin. Die Sequenz der eigentlichen M7(wt)-Struktur beginnt am ersten Lysin nach der

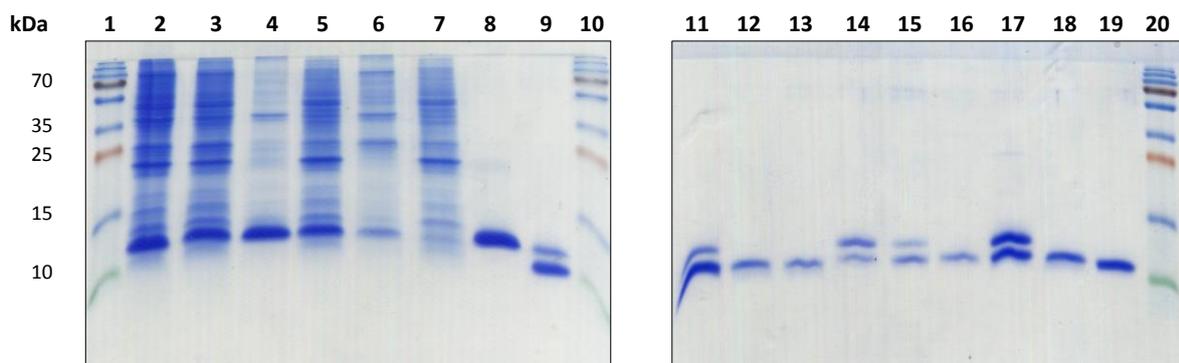
Thrombinschnittstelle. Die CXXC-Tetrapeptide von DsbA (CPHC) und Trx (CGPC) sind unterstrichen und in Fettschrift dargestellt. Alle verwendeten Peptide besaßen N-terminal eine Acetylierung (Ac-) und waren C-terminal amidiert (-NH<sub>2</sub>). Desweiteren sind die Molekulargewichte (*M*) und Extinktionskoeffizienten bei 280 nm unter reduzierenden Bedingungen ( $\epsilon_{280\text{nm}}$ ) aufgeführt. Die dargestellten Molekulargewichte entsprechen der Proteinmasse nach der Abspaltung des Hexahistidin-tags (Sequenzbeginn am GSH- der ehemaligen Thrombinschnittstelle). Die Nomenklatur der M7-Redoxvarianten ist unter 4.1 nachzulesen.

**Tabelle 7.3- I: Sequenz, Molekulargewicht, Extinktionskoeffizient genutzter Proteine und Peptide**

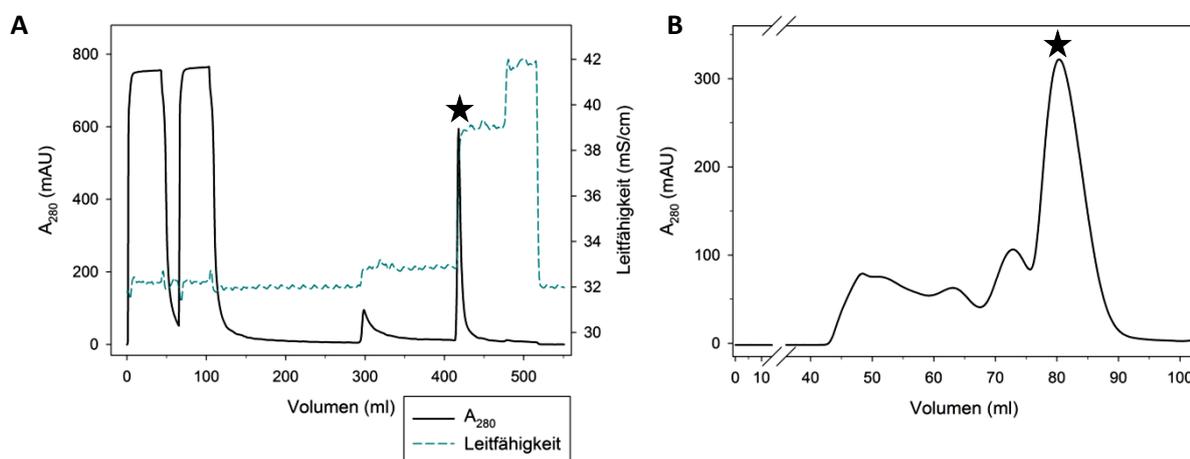
Variante	Aminosäuresequenz	M [Da]	$\epsilon_{280\text{nm}}$ [M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ] (reduziert)
<b>Wild Typ-Proteine</b>			
<b>M7(wt)</b>	M G S S <b>H H H H H H</b> S S <b>G L V P R G S H</b> M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T G K E L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	10 820.4	1 227
<b>DsbA(wt)</b>	G S H M A Q Y E D G K Q Y T T L E K P V A G A P Q V L E F F S F F <b>C P H C</b> Y Q F E E V L H I S D N V K K K L P E G V K M T K Y H V N F M G G D L G K D L T Q A W A V A M A L G V E D K V T V P L F E G V Q K T Q T I R S A S D I R D V F I N A G I K G E E Y D A A W N S F V V K S L V A Q Q E K A A A D V Q L R G V P A M F V N G K Y Q L N P Q G M D T S N M D V F V Q Q Y A D T V K Y L S E K K	21 544.5	22 920
<b>Substitution-Varianten von M7</b>			
<b>M7<sub>D23</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S <b>C P H C</b> L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	10 845.5	1 227
<b>M7<sub>D24</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T <b>C P H C</b> E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	10 833.4	1 227
<b>M7<sub>D25</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T G <b>C P H C</b> R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	10 761.4	1 227
<b>M7<sub>T23</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S <b>C G P C</b> L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	10 765.4	1 227
<b>M7<sub>T24</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T <b>C G P C</b> E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	10 753.4	1 227

Variante	Aminosäuresequenz	M [Da]	$\epsilon_{280\text{nm}}$ [M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ] (reduziert)
<b>M7<sub>T25</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T G <b>C G P C</b> R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	10 681.3	1 227
<b>Insertion-Varianten von M7</b>			
<b>M7<sub>Di23</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S <b>C P H C</b> T G K E L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	11 260.9	1 227
<b>M7<sub>Di24</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T <b>C P H C</b> G K E L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	11 260.9	1 227
<b>M7<sub>Di25</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T G <b>C P H C</b> K E L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	11 260.9	1 227
<b>M7<sub>Di26</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T G K <b>C P H C</b> E L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	11 260.9	1 227
<b>M7<sub>Ti26</sub></b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T G K <b>C G P C</b> E L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	11 180.9	1 227
<b>M7<sub>Di26</sub> C27S</b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T G K <b>S P H C</b> E L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	11 244.9	1 227
<b>M7<sub>Di26</sub> C30S</b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T G K <b>C P H S</b> E L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	11 244.9	1 227
<b>M7<sub>Di26</sub> C30S/ C33S</b>	G S H M K V D I T I K I Q R D G Q E I E I D I R V S T G K <b>S P H S</b> E L E R A L Q E L E K A L A R A G A R N V Q I T I S A E N D E Q A K E L L E L I A R L L Q K L G Y K D I N V R V N G T E V K I E V R V	11 228.8	1 227
<b>CXXC-Peptide</b>			
<b>DsbA<sub>4</sub></b>	Ac- <b>CPHC</b> -NH <sub>2</sub>	499.6	/
<b>Trx<sub>4</sub></b>	Ac- <b>CGPC</b> -NH <sub>2</sub>	419.5	/
<b>DsbA<sub>7</sub></b>	Ac- <b>ACPHCAY</b> -NH <sub>2</sub>	804.9	1 280
<b>Trx<sub>7</sub></b>	Ac- <b>ACPHCAY</b> -NH <sub>2</sub>	724.8	1 280
<b>Di23- Peptide</b>	Ac-VS <b>CPHC</b> TG-NH <sub>2</sub>	844.0	/
<b>Di23- Peptide</b>	Ac-TG <b>CPHC</b> KE-NH <sub>2</sub>	927.1	/
<b>Di23- Peptide</b>	Ac-GK <b>CPHC</b> EL-NH <sub>2</sub>	915.0	/

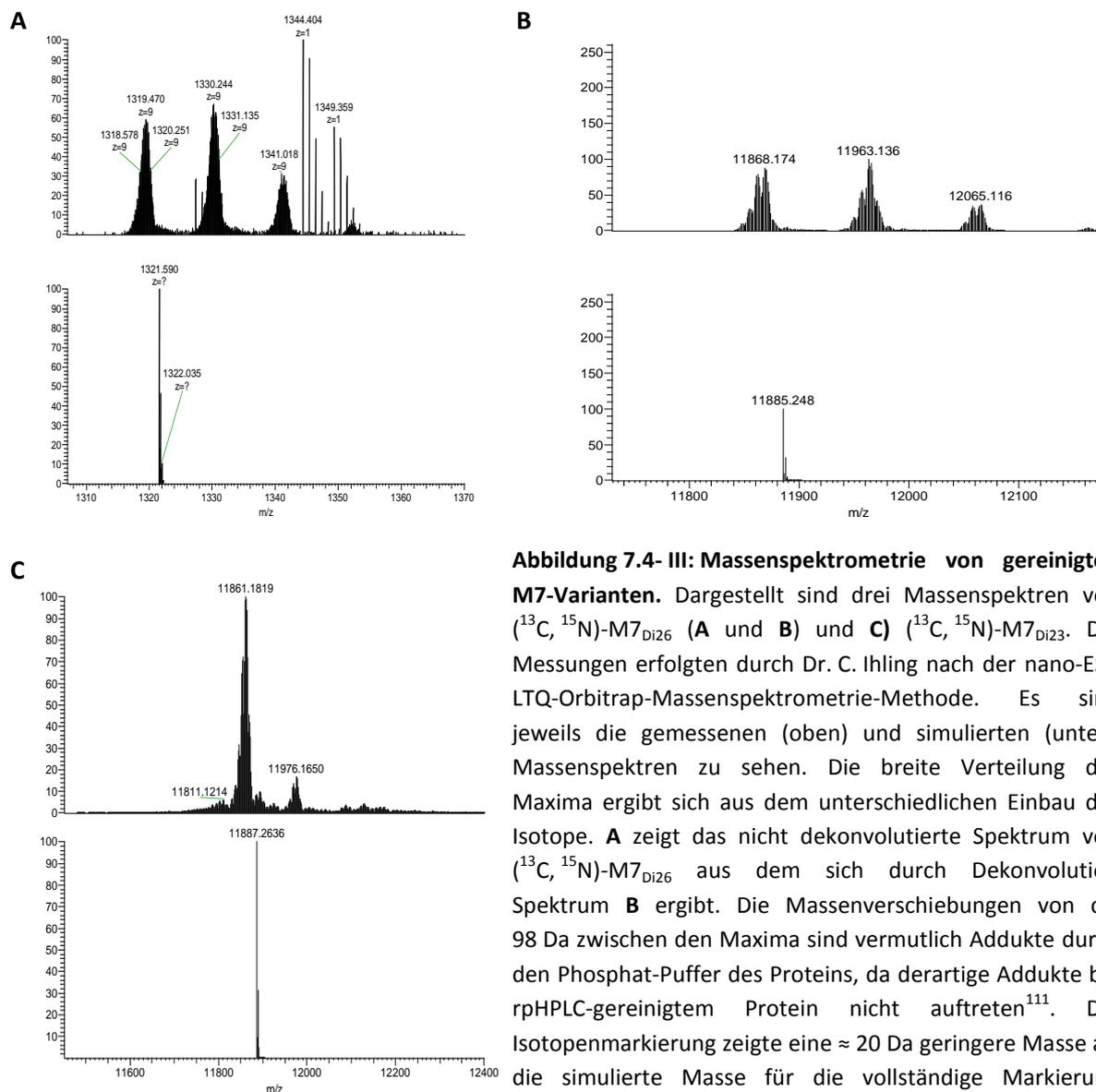
## 7.4. Präparation der M7-Varianten – Chromatogramme, Übersichtsgel und Spektren



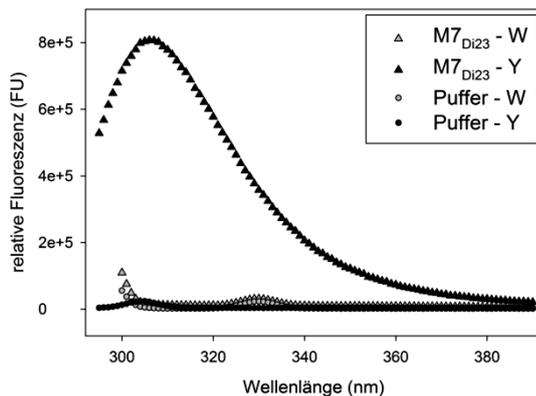
**Abbildung 7.4- I: SDS-PAGE zum Reinigungsverlauf der M7<sub>D123</sub>-Präparation.** Gezeigt wird die reduzierende SDS-PAGE (6-%igem Sammel- und 16-%igem Trenngel) der (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N)-M7<sub>D123</sub>-Präparation in Coomassiefärbung aus Kapitel 4.2.1. Wie auch in diesem Fall, beinhalteten Reinigungen oft die Unterteilung in Haupt- und Nebenfraktion, um möglichst hochkonzentrierte Chargen zu erhalten. Desweiteren wurde eine 2. His-tag-Abspaltung durchgeführt, um die Proteinausbeute zu erhöhen. (1) Marker; (2) Zellaufschluss; (3) Überstand Zellaufschluss; (4) Pellet Zellaufschluss; (5) Überstand Hitzefällung; (6) Pellet Hitzefällung; (7) 1. IMAC Durchfluss; (8) 1. IMAC Elution; (9) 1. His-tag-Abspaltung; (10) Marker; (11) 1. His-tag-Abspaltung; (12) 2. IMAC Durchfluss Hauptfraktion; (13) 2. IMAC Durchfluss Nebenfraktion; (14) 2. IMAC Elution Hauptfraktion; (15) 2. His-tag-Abspaltung; (16) 3. IMAC Durchfluss; (17) 3. IMAC Elution; (18) SEC M7<sub>D123</sub> Dimer; (19) SEC M7<sub>D123</sub> Monomer; (20) Marker.



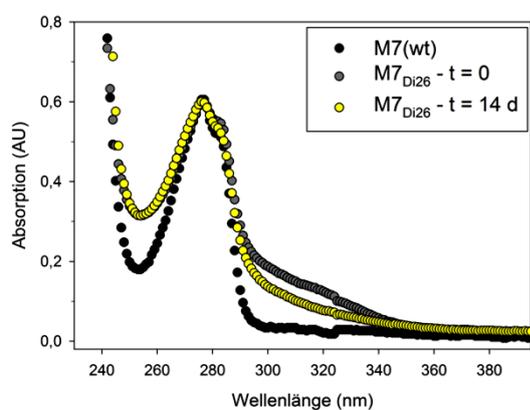
**Abbildung 7.4- II: IMAC und SEC von M7<sub>D123</sub>.** **A)** Gezeigt wird die präparative Reinigung von M7<sub>D123</sub> über eine 5 mL (CV) HisTrap bei 20 °C. Die Detektion fand über Absorption bei 280 nm statt (schwarze Linie). Desweiteren ist die Leitfähigkeit dargestellt (blaue gestrichelte Linie), die den Stufengradienten der Elution wiedergibt. Die HisTrap wurde in Laufpuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 7.5; RT) äquilibriert. Das Beladen der Säule mit dem Ansatz fand bei 2 mL/min statt (0 - 110 mL). Die Säule wurde hiernach mit  $\geq 30$  CV Laufpuffer (5 mL/min) gewaschen. Die Elution mit Elutionspuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH 7.5; RT) erfolgte stufenweise in drei isokratischen Abschnitten: **i)** 9 % ( $\cong$  63 mM Imidazol) über 20 CV; **ii)** 65 % ( $\cong$  330 mM Imidazol) über 6 CV; **iii)** 100 % ( $\cong$  500 mM Imidazol) über 6 CV. Der Fluss betrug bei der Elution 3 mL/min. Die Wertfraktion mit dem Zielprotein eluierte in Stufe **ii** (Sternchen). **B)** Die Gelfiltration (SEC S75 16/60 mit 120 mL CV) fand im SEC-Laufpuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl; pH 7.0; RT) mit 0.7 mL/min Fluss bei 20 °C statt. Detektiert wurde die Absorption bei 280 nm. Die Dimerfraktion eluiert um 73 mL und das Monomer um 81 mL (Sternchen). Zwischen 43 und 68 mL eluieren Verunreinigungen und Oligomere Spezies (> Dimer) des Zielproteins.



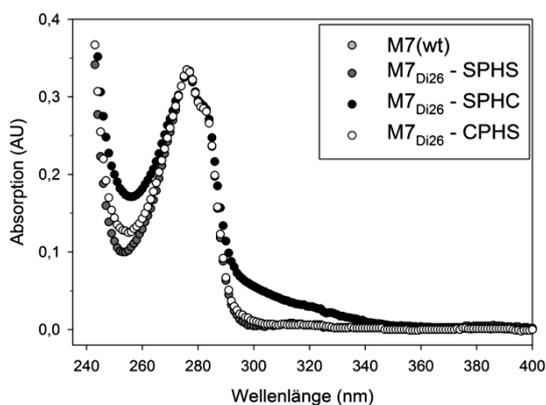
**Abbildung 7.4- III: Massenspektrometrie von gereinigten M7-Varianten.** Dargestellt sind drei Massenspektren von ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )-M7<sub>D126</sub> (**A** und **B**) und **C**) ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )-M7<sub>D123</sub>. Die Messungen erfolgten durch Dr. C. Ihling nach der nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie-Methode. Es sind jeweils die gemessenen (oben) und simulierten (unten) Massenspektren zu sehen. Die breite Verteilung der Maxima ergibt sich aus dem unterschiedlichen Einbau der Isotope. **A** zeigt das nicht dekonvolutierte Spektrum von ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )-M7<sub>D126</sub> aus dem sich durch Dekonvolution Spektrum **B** ergibt. Die Massenverschiebungen von ca. 98 Da zwischen den Maxima sind vermutlich Addukte durch den Phosphat-Puffer des Proteins, da derartige Addukte bei rpHPLC-gereinigtem Protein nicht auftreten<sup>111</sup>. Die Isotopenmarkierung zeigte eine  $\approx 20$  Da geringere Masse als die simulierte Masse für die vollständige Markierung (11 885.3 Da). Dies entspricht einer Markierungseffizienz von  $\approx 97$  %. **C** zeigt das konvolutierte Spektrum von ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )-M7<sub>D123</sub>. Die Markierungseffizienz beträgt  $\approx 96$  %. Bei der Massenverschiebung von ca. 115 Da handelt es sich wohl ebenfalls um ein Addukt mit dem Proteinpuffer.



**Abbildung 7.4- IV: Fluoreszenz-Spektroskopie als Reinheitskontrolle.** Dargestellt sind die Fluoreszenz-Spektren von (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N)-M7<sub>D123</sub> nach der Proteinreinigung. Es wurden die Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 274 nm (Tyrosin bzw. Y) und 295 nm (selektiv Tryptophan bzw. W) nach 3.2.7.3 aufgenommen. Bei der Anregung von 295 nm gibt es neben dem Ramansignal des Puffers kein zusätzliches Fluoreszenzsignal, das auf tryptophanhaltige Proteine hinweisen.

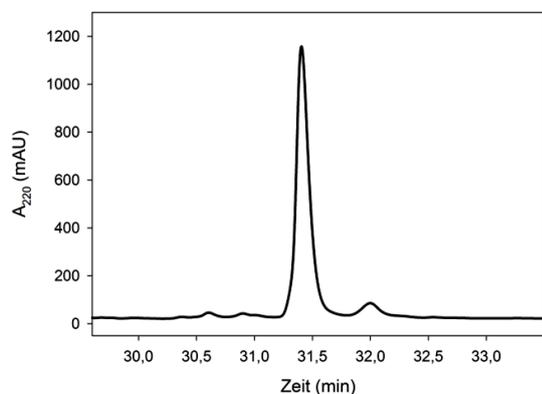


**Abbildung 7.4- V: Me<sup>2+</sup>-Komplexierung durch EDTA-Dialyse.** Dargestellt sind die Absorptionsspektren von M7(wt) und M7<sub>D126</sub> vor und nach 14-tägiger Dialyse gegen 10 mM EDTA-Puffer. Dies diente der Überprüfung einer möglichen Metallionen-Bindung durch das Protein. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Spektren auf die Absorption bei 274 nm von M7<sub>D126</sub> nach 14 Tagen Dialyse normiert. Durch die Dialyse wurde die Proteinprobe leicht aufkonzentriert, so dass über die UV/Vis-Absorption kein Rückschluss auf mögliche Präzipitation möglich war. Ultrazentrifugation (200 000 x g; 1 h) führte zu keiner Änderung in den UV/Vis-Spektren. Präzipitate waren während der Dialyse nicht sichtbar.



**Abbildung 7.4- VI: Absorptionsvergleich zwischen M7(wt) und den M7<sub>D126</sub>-Varianten.** Dargestellt ist der Vergleich der Absorptionsspektren von M7(wt) und den M7<sub>D126</sub>-Varianten (M7<sub>D126</sub>; M7<sub>D126</sub> - SPHS; M7<sub>D126</sub> - SPHC; M7<sub>D126</sub> - CPHS). Normiert wurde auf die M7(wt) Absorption bei 274 nm. Deutlich wird, dass das zusätzliche Absorptionssignal (siehe 4.2.2) nur bei Variante M7<sub>D126</sub> - SPHC auftritt. Die Doppelserin-Mutante und M7<sub>D126</sub> - CPHS entsprechen in ihrer Absorption dem M7(wt).

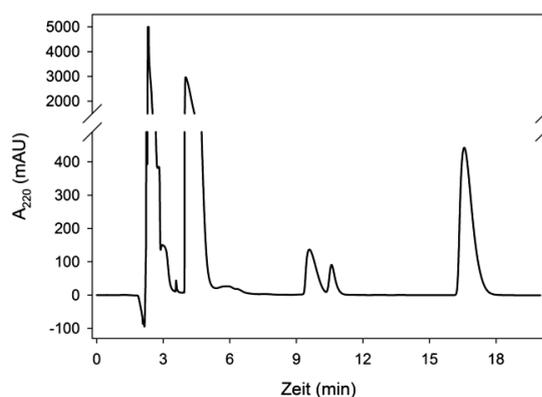
## 7.5. Trennung von Redoxspezies mittels rpHPLC



**Abbildung 7.5- I: Diastereomeranteil des DsbA<sub>7</sub>-Peptid.**

Dargestellt ist die rpHPLC-Trennung der Diastereomere von reduzierten DsbA<sub>7</sub> (C18-Säule). 10 μM DsbA<sub>7</sub> (100 μL) wurden aufgetragen. Das gezeigte DsbA<sub>7</sub> stammte aus der manuellen Peptidsynthese. Zwei Diastereomer-Fractionen wurden über Massenspektrometrie identifiziert: **i)** 93 % des Gesamtintegrals bei 31.4 min und **ii)** 7 % bei 32.0 min. Als Laufmittel dienten A (Wasser; 0.1 % (v/v) TFA) und B (ACN; 0.1 % (v/v) TFA). Die Säule wurde mit einem Fluss von 1 mL/min betrieben. Detektiert wurde die Absorption bei 220 nm. Die Trennung erfolgte im Gradienten:

0 – 21 min                    2 % B (isokratisch)  
21 – 38 min                2 – 50 % B



**Abbildung 7.5- II: Trennung der Redoxspezies von DTT und Glutathion.**

Gezeigt wird die Elution von 50 mM GSH (4 min); 300 μM GSSG (9.6 min); 800 μM DTT<sub>RED</sub> (10.6 min) und 5 mM DTT<sub>OX</sub> (16.6 min) auf der rpHPLC (C18). Die Auftrennung erfolgt im isokratischen Gradienten mit 2 % Laufmittel B (ACN; 0.1 % (v/v) TFA) und 98 % A (Wasser; 0.1 % (v/v) TFA). Die Säule wurde bei 30 °C mit einem Fluss von 1 mL/min betrieben. 100 μL Probe wurden aufgetragen. Detektiert wurde die Absorption bei 220 nm.

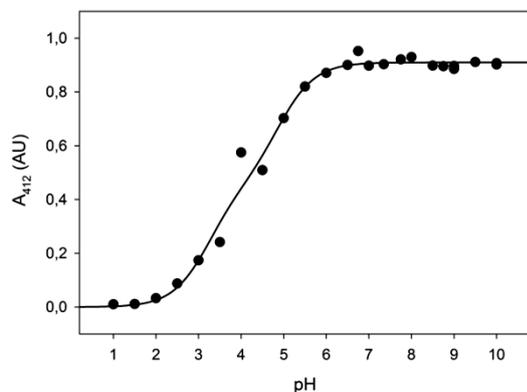
**Tabelle 7.5- I: Übersicht über die Gleichgewichtskonstanten und Redoxpotentiale der Varianten**

Variante	Glutathion als Redoxpartner		DTT als Redoxpartner	
	E° (mV)	K (M)	E° (mV)	K
<b>Wildtyp-Proteine</b>				
Thioredoxin*	-271 ± 3 <sup>38</sup>	11.2	/	/
DsbA*	-122 ± 1 <sup>39</sup>	1.2 × 10 <sup>-4</sup>	/	/
<b>Insertions-Proteine</b>				
M7 <sub>Di23</sub>	-256 <sup>111</sup>	3.4	-255 ± 2	9.4 × 10 <sup>-3</sup>
M7 <sub>Di24</sub>	-246 ± 1	1.6	-243 ± 1	3.4 × 10 <sup>-3</sup>
M7 <sub>Di25</sub>	-245 ± 1	1.5	/	/
M7 <sub>Di26</sub>	-208 ± 2	8.0 × 10 <sup>-2</sup>	/	/
M7 <sub>Ti26</sub>	/	/	-178 ± 1	2.4 × 10 <sup>-5</sup>
<b>Substitutions-Proteine</b>				
M7 <sub>D23</sub>	-221 ± 1	2.3 × 10 <sup>-1</sup>	/	/
M7 <sub>T23</sub>	-208 ± 2	8.6 × 10 <sup>-2</sup>	/	/
<b>CXXC-Peptid</b>				
Trx-Peptid**	/	/	-201 ± 1	1.4 × 10 <sup>-4</sup>
DsbA-Peptid**	/	/	-227 ± 2	1.0 × 10 <sup>-3</sup>

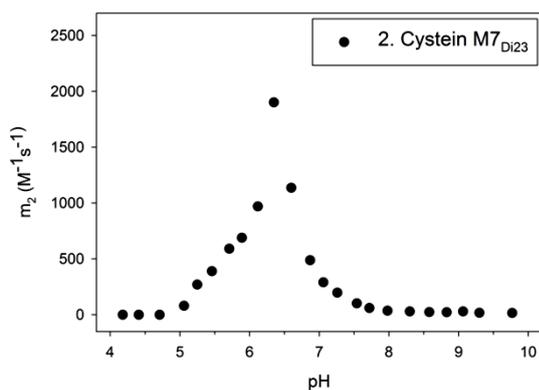
\* Redoxpotentiale für Thioredoxin und DsbA wurden in dieser Arbeit nicht bestimmt

\*\* Trx-Peptid umfassen sowohl das Tetrapeptid (Trx<sub>4</sub>) als auch das Heptapeptid (Trx<sub>7</sub>); DsbA-Peptid umfassen das Tetra- (DsbA<sub>4</sub>), das Hepta- (DsbA<sub>7</sub>) und die Oktapeptide (Di23, Di25, Di26).

## 7.6. Bestimmung der $pK_a$ -Werte von DTNB und Cystein

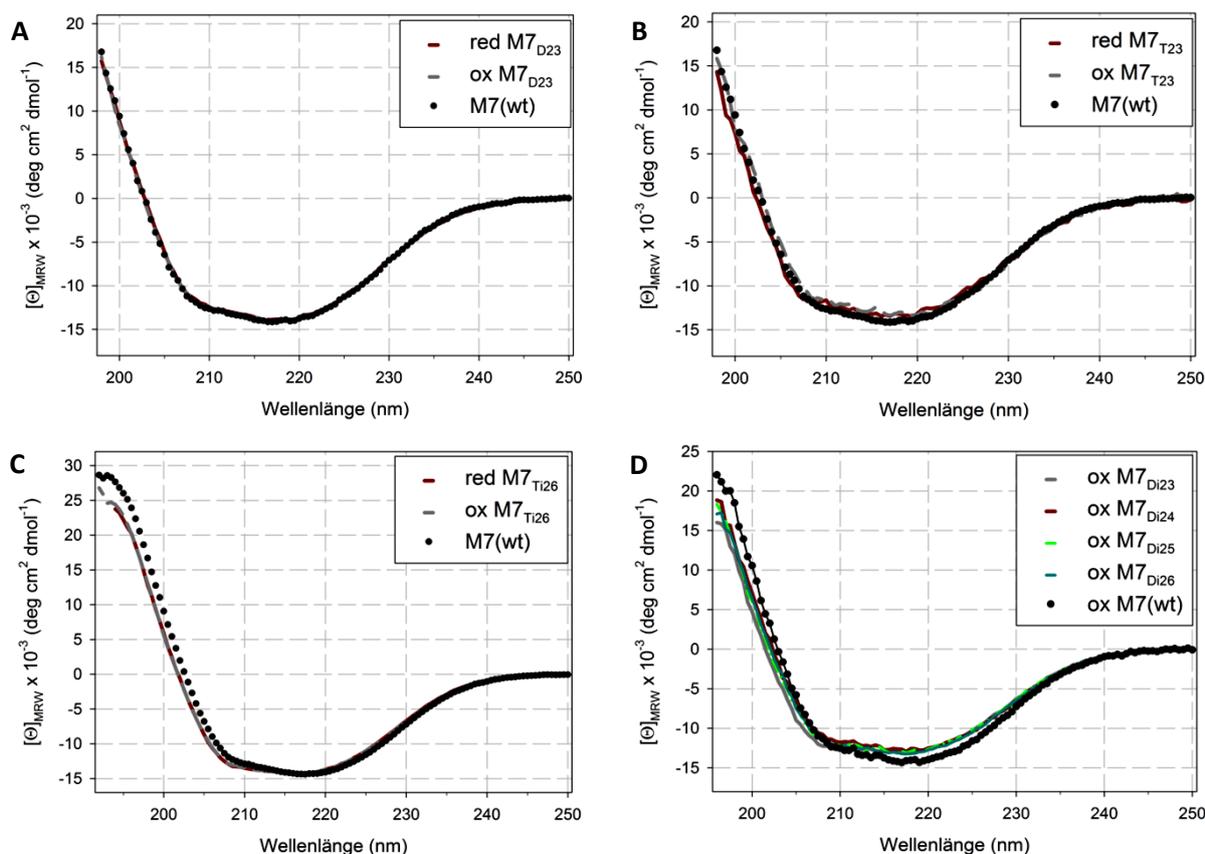


**Abbildung 7.6-I: pH-Abhängigkeit der 2-Nitro-5-thiobenzoat ( $TNB^{2-}$ ) Absorption.** Gezeigt wird die Absorption bei 412 nm des  $TNB$ -Anions im pH-Bereich 1 bis 10 (20 °C). 1 mM DTNB wurden quantitativ durch 100 mM DTT zu 2 mM  $TNB^{2-}$  umgesetzt (1 h, 20 °C; Komplexpuffer; pH 7,0). Verdünnung der 2 mM  $TNB^{2-}$ -Lösung auf 60  $\mu$ M im Komplexpuffer (10 mM Borat; 10 mM Citrat; 10 mM Phosphat; 200 mM NaCl; 20 °C) mit entsprechendem pH. Fit der Funktion nach Gleichung 3-XX (siehe 3.5.3.1) mit resultierenden  $pK_a$ -Werten 3,4 und 5,1. Die Messung wurde am Spektrophotometer (Schichtdicke 1 cm) durchgeführt. Messung durch W. Hannemann (2017)<sup>110</sup>.



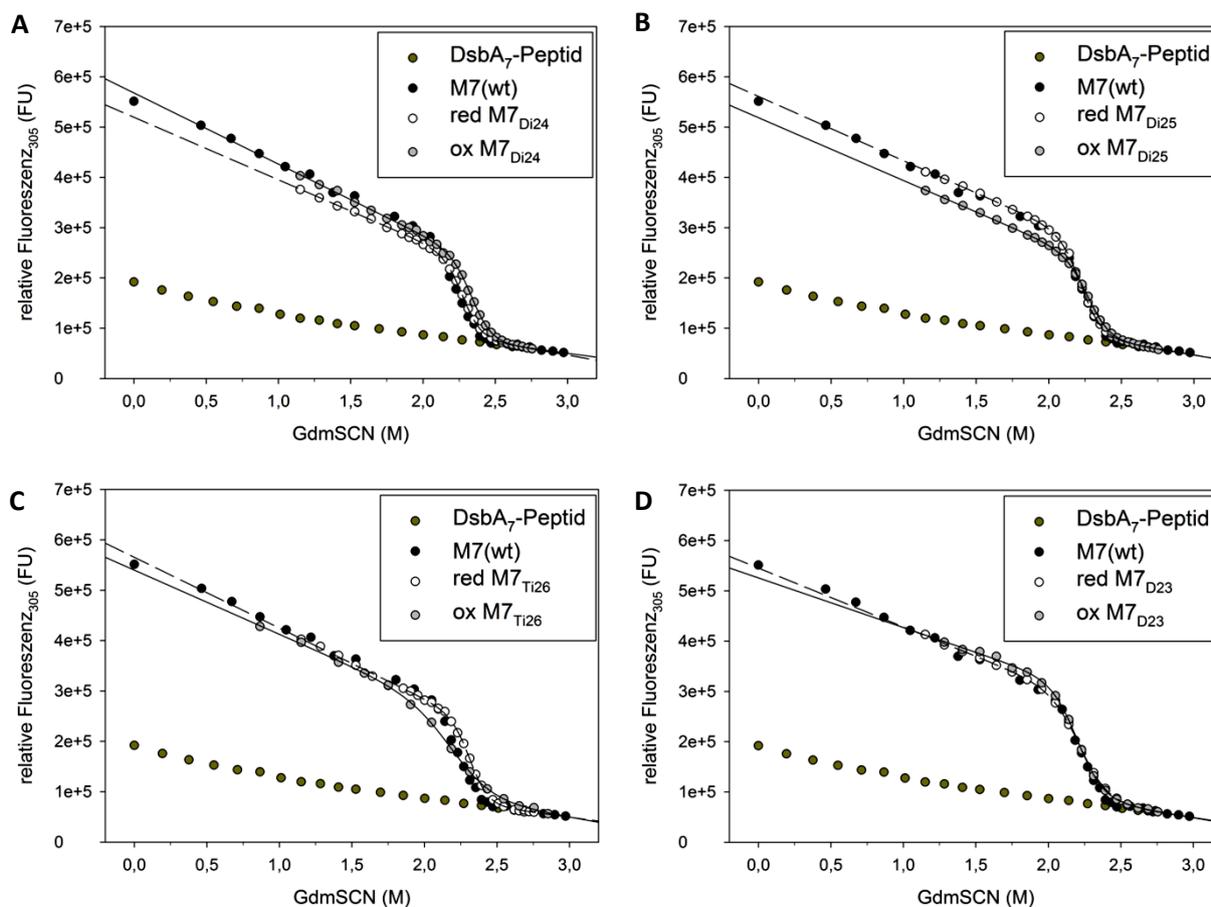
**Abbildung 7.6-II: Kinetik des 2. Cysteins von  $M7_{Di23}$  aus der Reaktion mit DTNB.** Dargestellt wird die Gleichgewichtskonstante ( $m_2$ ) aus der Reaktion von 5  $\mu$ M reduzierten  $M7_{Di23}$  mit 0,18 mM DTNB als Funktion vom pH bei 20 °C. Die Gleichgewichtskonstante ( $m$ ) ergibt sich nach Gleichung 3-XX, die folgend in die 2. Ordnung Geschwindigkeitskonstante  $m_2$  umgewandelt wird (siehe 3.5.3.1.). Ab pH  $\approx$  6,5 sinkt die Kinetik exponentiell. Die exponentielle Abnahme deutet auf die Wechselwirkung mit einer ionisierbaren Gruppe hin, deren  $pK_a$ -Wert bei  $\approx$  6,5 liegt.

## 7.7. Fern-UV-CD-Spektren der M7-Varianten

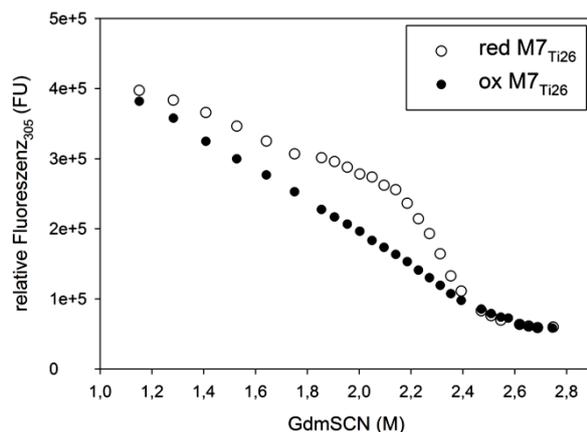


**Abbildung 7.7- I: Fern-UV-CD-Spektren der Redoxvarianten.** Gezeigt werden verschiedene M7-Redoxvarianten in ihrer oxidierten und reduzierten Form im Vergleich zum M7(wt) (●): **A)** Substitutionsvarianten M7<sub>D23</sub> (7.3 μM) und **B)** M7<sub>T23</sub> (1.8 μM) jeweils gegen M7(wt) (5.2 μM); **C)** Thioredoxin-Insertionsvariante M7<sub>T126</sub> (6.8 μM) gegen M7(wt) (7.7 μM) und **D)** die oxidierten DsbA-Insertionsvarianten M7<sub>Di23</sub> (16.2 μM), M7<sub>Di24</sub> (12.1 μM), M7<sub>Di25</sub> (10.9 μM), M7<sub>Di26</sub> (13.4 μM) gegen den M7(wt) (12.7 μM). Die Varianten zeigten kaum Unterschiede innerhalb der Redoxformen und im Vergleich zum M7(wt). Im Gegensatz zur reduzierten Form der DsbA-insertionsvarianten (siehe 4.4.1) scheinen lediglich für deren oxidierte Form (**D)** geringe Änderungen in der Sekundärstruktur zum M7(wt) möglich. Ursache für den geringen Unterschied in den M7<sub>T23</sub>-Spektren (**A)** könnte der Messfehler sein, der durch die geringe Proteinkonzentration von 1.8 μM verursacht wird. Alle Spektren wurden um ihr Puffersignal korrigiert. Die Spektroskopie wurde in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.0 bei 20 °C in 1 mm- und 2 mm-Küvetten mit folgenden Parametern durchgeführt: ≥ 30 Akkumulationen; 50 nm/min Schrittgeschwindigkeit; 0.5 nm Schrittweite; 0.5 s Datenintegration; Dynodenspannung < 600 Volt.

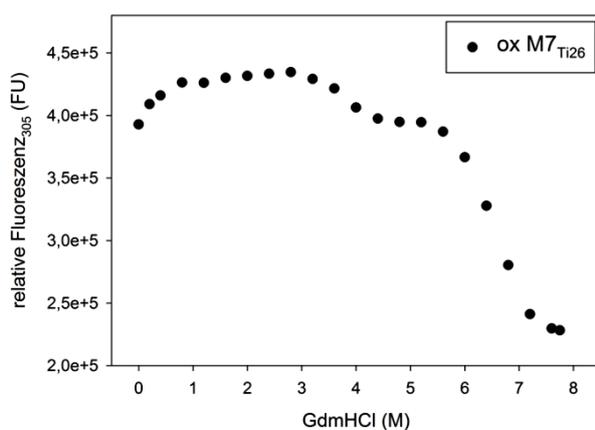
## 7.8. Chemisch-induzierte Denaturierungsübergänge



**Abbildung 7.8- I: Chemisch induzierte Denaturierungsübergänge der M7-CXXC-Varianten im Vergleich zum M7(wt) und dem tyrosinhaltigen DsbA<sub>7</sub>-Peptid.** Dargestellt wird die relative Fluoreszenz bei 305 nm in Abhängigkeit der GdmSCN-Konzentration von **A) M7<sub>Di24</sub>**; **B) M7<sub>Di25</sub>**; **C) M7<sub>Ti26</sub>** und **D) M7<sub>D23</sub>**. Die Anregungswellenlänge lag bei 274 nm. Gemessen wurde bei pH 7.0 und 20 °C. Die Übergänge der CXXC-Varianten wurden in ihrer oxidierten und reduzierten Form von 1 bis 2.8 M GdmSCN bestimmt, die für M7(wt) und das DsbA<sub>7</sub>-Peptid wurden von 0 bis 3 M GdmSCN gemessen. Die Analytenkonzentrationen betragen 10 bis 15 µM. Die Übergänge der beiden Redoxformen der CXXC-Varianten wurden nach Gleichung 3-XV (siehe 3.5.2.2) angepasst. Hier wird der Fit der oxidierten Form mit einer durchgängigen Linie und die reduzierte Form mit einer gestrichelten Linie dargestellt. Auf Grund von Konzentrationsunterschieden (siehe 3.3.2) wurden alle Übergänge auf das denaturierte Plateau von DsbA<sub>7</sub>-Peptid normiert. Dafür muss das pufferabhängige Ramansignal bei 305 nm beachtet und abgezogen werden.



**Abbildung 7.8- II: GdmSCN induzierter Denaturierungsübergang von M7<sub>T126</sub>.** Dargestellt wird die relative Fluoreszenz bei 305 nm in Abhängigkeit der GdmSCN-Konzentration von oxidierten und reduzierten M7<sub>T126</sub>. Die Anregungswellenlänge lag bei 274 nm. Gemessen wurde bei pH 7.0 und 20 °C. Die Analytenkonzentration betrug  $\approx 10 \mu\text{M}$ . Für die oxidierte Form ist kein natives Plateau erkennbar, weshalb kein  $\Delta\text{G}$ -Wert aus diesem Übergang bestimmbar war.



**Abbildung 7.8- III: GdmCl induzierter Denaturierungsübergang von oxidierten M7<sub>T126</sub>.** Gezeigt wird die relative Fluoreszenz bei 305 nm in Abhängigkeit der GdmCl-Konzentration. Die Anregungswellenlänge lag bei 274 nm. Gemessen wurde bei pH 7.0 und 20 °C. Die Analytenkonzentration betrug  $10 \mu\text{M}$ . Es sind deutlich zwei Übergänge bei  $\approx 3,5$  und  $\approx 6,5$  M zu beobachten.

Tabelle 7.8- I: Übersicht über  $\Delta G$ -, m- und  $D_{1/2}$ -Werte der Wildtyp-Proteine und der CXXC-Varianten

Varianten	20 °C						30 °C					
	red			ox			red			ox		
	$\Delta G_{n \rightarrow d}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	m (kJ·mol <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> )	$D_{1/2}$ (M)	$\Delta G_{n \rightarrow d}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	m (kJ·mol <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> )	$D_{1/2}$ (M)	$\Delta G_{n \rightarrow d}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	m (kJ·mol <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> )	$D_{1/2}$ (M)	$\Delta G_{n \rightarrow d}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	m (kJ·mol <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> )	$D_{1/2}$ (M)
<b>Wildtyp-Proteine</b>												
DsbA <sup>73</sup>	-65 ± 4*	-28 ± 2*	2.4*	-50 ± 4*	-26 ± 2*	1.9*	-48 ± 3*	-23 ± 1*	2.1*	-34 ± 1*	-20 ± 1*	1.7*
Thioredoxin <sup>82</sup> bei 25 °C	-25 ± 1*	-16 ± 1*	1.5*	-41 ± 2*	-16 ± 1*	2.5*		n.b.			n.b.	
M7	-81 ± 2	-36 ± 1	2.3		/			n.b.			n.b.	
M7 + 5 mM TCEP	-81 ± 2	-35 ± 1	2.3		/			n.b.			n.b.	
<b>Insertions-Proteine</b>												
M7 <sub>D123</sub>	-82 ± 2	-35 ± 1	2.3	-69 ± 1	-30 ± 1	2.3	-78 ± 2	-34 ± 1	2.3	-75 ± 1	-32 ± 1	2.3
M7 <sub>D124</sub>	-86 ± 1	-38 ± 1	2.3	-81 ± 2	-35 ± 1	2.3	-89 ± 3	-39 ± 1	2.3	-82 ± 3	-35 ± 2	2.3
M7 <sub>D125</sub>	-76 ± 1	-34 ± 1	2.2	-73 ± 1	-32 ± 1	2.3	-80 ± 3	-36 ± 1	2.2	-72 ± 3	-32 ± 1	2.3
M7 <sub>D126</sub>	-77 ± 1	-34 ± 1	2.2	-42 ± 1	-19 ± 1	2.2	-85 ± 2	-38 ± 1	2.2	-71 ± 2	-32 ± 1	2.2
M7 <sub>T126</sub>	-89 ± 3	-38 ± 1	2.3	-36 ± 2**	-16 ± 1	2.2		n.b.			n.b.	
<b>Substitutions-Proteine</b>												
M7 <sub>D23</sub>	-60 ± 2	-27 ± 1	2.2	-55 ± 2	-25 ± 1	2.2		n.b.			n.b.	

Die Werte, insofern nicht anders angegeben, stammen aus GdmSCN-induzierten Denaturierungsübergängen bei pH 7.0

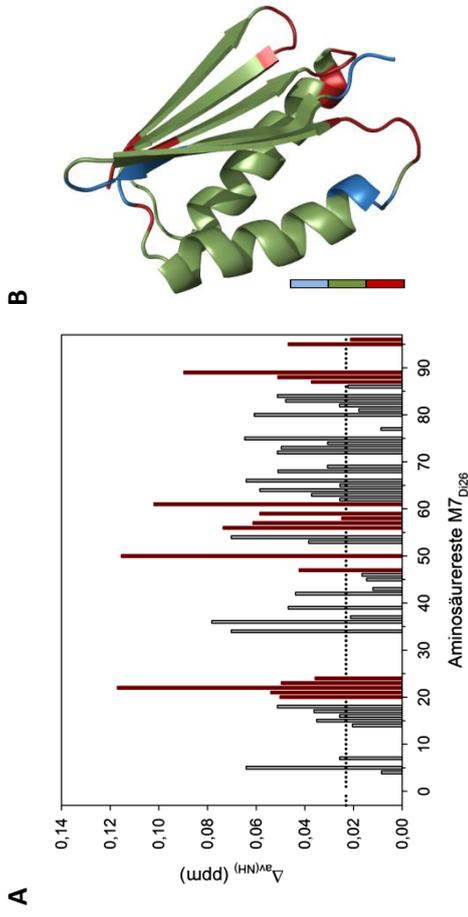
\* DsbA(wt) und Trx(wt)-Literaturwerte wurden über GdmCl-induzierte Denaturierungen bei pH 7.0 ermittelt

/ M7(wt) besitzt keine Cysteine, die oxidiert bzw. reduziert vorliegen können

\*\*  $\Delta G$ -Wert von M7<sub>T126 ox</sub> entstammt dem Renaturierungsübergang (siehe 4.3.4)

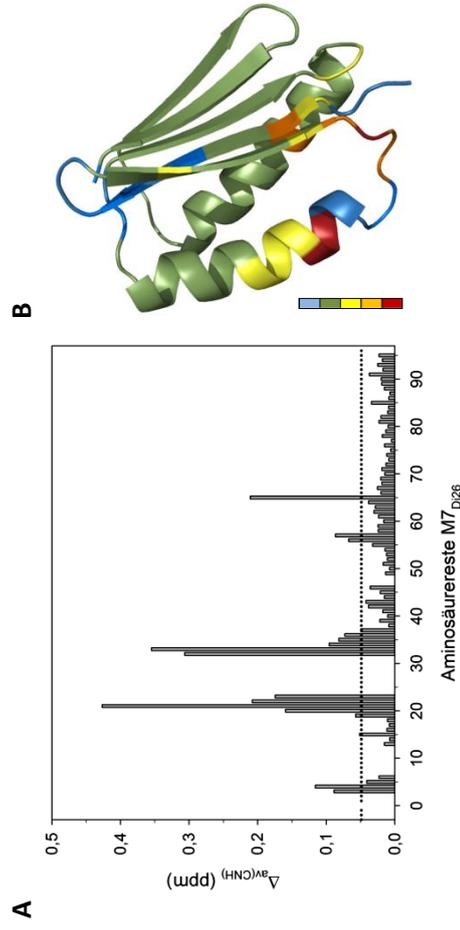
n.b. nicht bestimmt

## 7.9. NMR-spektroskopische Vergleiche der M7-Varianten



**C**  
**G**<sub>4</sub>**S****H****M**|**K****V****D****I****T**<sub>5</sub>**I****K****I****Q****R**<sub>10</sub>**D****G****Q****E****I****L****E****I****D****R**<sub>20</sub>**V****S****T****G****K**<sub>25</sub>**C****P****H****C****E****L****E****R****A****L****A****R****A**<sub>40</sub>**A****L****A****R****A**<sub>45</sub>**G****A****R****N****V**<sub>50</sub>  
**Q****I****T****I****S**<sub>55</sub>**A****E****N****D****E**<sub>60</sub>**Q****A****K****E****L****E****L****I****A**<sub>70</sub>**R****L****L****Q****K**<sub>75</sub>**L****G****Y****K****D**<sub>80</sub>**I****N****V****R**<sub>85</sub>**N****G****T****E****V**<sub>90</sub>**K****I****E****V****R**<sub>95</sub>**V**

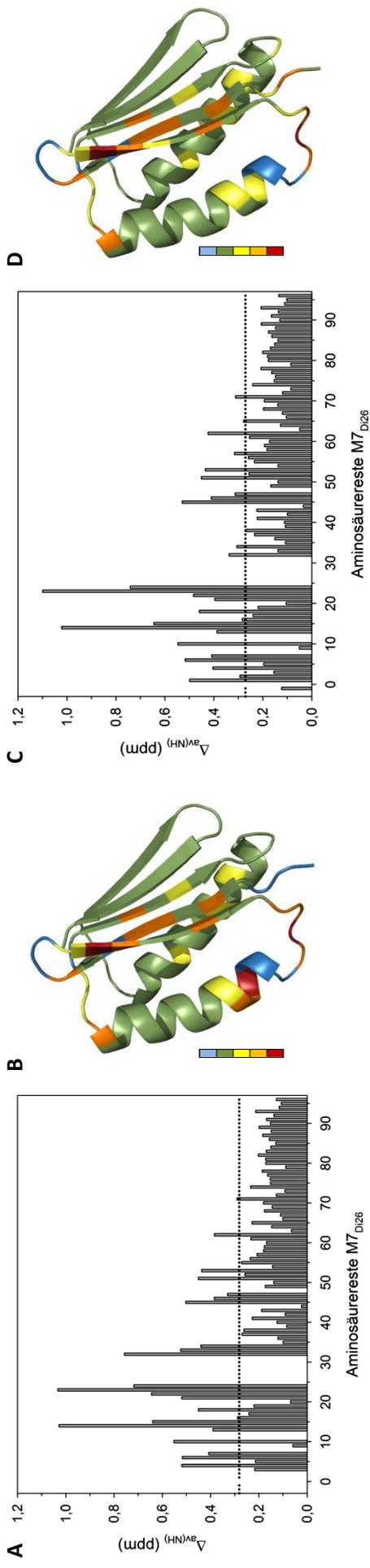
**Abbildung 7.9- I: Strukturvergleich zweier Proben oxidierten M7<sub>D126</sub> mittels NMR-Spektroskopie. A** Dargestellt wird für die einzelnen Reste von M7<sub>D126</sub> die Differenz der chemischen Verschiebung zweier oxidiert Proben aus zwei unterschiedlichen Proteinpräparationen. Angegeben wird die durchschnittliche chemische Verschiebung der <sup>15</sup>N- und <sup>1</sup>H<sup>N</sup>-Kerne ( $\Delta_{av(NH)}$ ) nach Gleichung 3-XXV (siehe 3.5.4). Die Messungen wurden bei 20 °C in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 % D<sub>2</sub>O, 0.05 % NaN<sub>3</sub>, pH 7.0 mit 600  $\mu$ M M7<sub>D126</sub> durchgeführt. Die gepunktete Linie bei 0.023 ppm entspricht dem  $\emptyset(\Delta_{av(NH)})$ -Wert. Dieser setzt sich aus den  $\Delta_{av(NH)}$ -Werten der Reste zusammen, die dem  $\beta$ -Faltblatt und den  $\alpha$ -Helices des M7(wt) entsprechen, d.h. ohne Loop-Regionen. Der  $\Delta_{av(NH)}$ -Wert liegt bei  $\approx$  0.075 ppm. **B** Die festgelegten Strukturbereiche sind mittels Farbskala in der M7(wt)-NMR-Struktur (pdb: 2JVF) dargestellt. Blau: Reste nicht zuordenbar; Grün: Reste für die  $\emptyset(\Delta_{av(NH)})$ -Wert Bestimmung ( $\approx$  0.023 ppm); Rot: Loop-Regionen mit einem  $\Delta_{av(NH)}$  von  $\approx$  0.075 ppm. **C** Sequenz von M7<sub>D126</sub> in der Farbgebung von **(B)**. Die M7-Struktur beginnt am ersten Lys (K<sub>1</sub>).



**C**  
**G**<sub>4</sub>**S****H****M**|**K****V****D****I****T**<sub>5</sub>**I****K****I****Q****R**<sub>10</sub>**D****G****Q****E****I****L****E****I****D****R**<sub>20</sub>**V****S****T****G****K**<sub>25</sub>**C****P****H****C****E****L****E****R****A****L****A****R****A**<sub>40</sub>**A****L****A****R****A**<sub>45</sub>**G****A****R****N****V**<sub>50</sub>  
**Q****I****T****I****S**<sub>55</sub>**A****E****N****D****E**<sub>60</sub>**Q****A****K****E****L****E****L****I****A**<sub>70</sub>**R****L****L****Q****K**<sub>75</sub>**L****G****Y****K****D**<sub>80</sub>**I****N****V****R**<sub>85</sub>**N****G****T****E****V**<sub>90</sub>**K****I****E****V****R**<sub>95</sub>**V**

**Abbildung 7.9- II: Strukturvergleich der Redoxzustände von M7<sub>D126</sub> mittels NMR-Spektroskopie. A** Dargestellt wird für die einzelnen Reste von M7<sub>D126</sub> die Differenz der chemischen Verschiebung vom oxidierten und reduzierten Zustand bzw. die durchschnittliche chemische Verschiebung der <sup>13</sup>C $\alpha$ , <sup>13</sup>C $\beta$ , <sup>15</sup>N- und <sup>1</sup>H<sup>N</sup>-Kerne ( $\Delta_{av(CNH)}$ ) nach Gleichung 3-XXVI (siehe 3.5.4). Die Messungen wurden bei 20 °C in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 % D<sub>2</sub>O, 0.05 % NaN<sub>3</sub>, pH 7.0 durchgeführt. Die gepunktete Linie bei 0.048 ppm entspricht dem  $\emptyset(\Delta_{av(CNH)})$ -Wert. **B** Die  $\Delta_{av(CNH)}$ -Werte sind mittels Farbskala in der M7(wt)-NMR-Struktur (pdb: 2JVF) dargestellt. Blau: Reste nicht zuordenbar; Grün:  $\Delta_{av(CNH)} < 0.048$  ppm; Gelb:  $\Delta_{av(CNH)} > 0.048$  ppm; Orange:  $\Delta_{av(CNH)} > 0.10$  ppm; Rot:  $\Delta_{av(CNH)} > 0.25$  ppm. **C** Sequenz von M7<sub>D126</sub> in der Farbgebung von **(B)**. Die M7-Struktur beginnt am ersten Lys (K<sub>1</sub>).



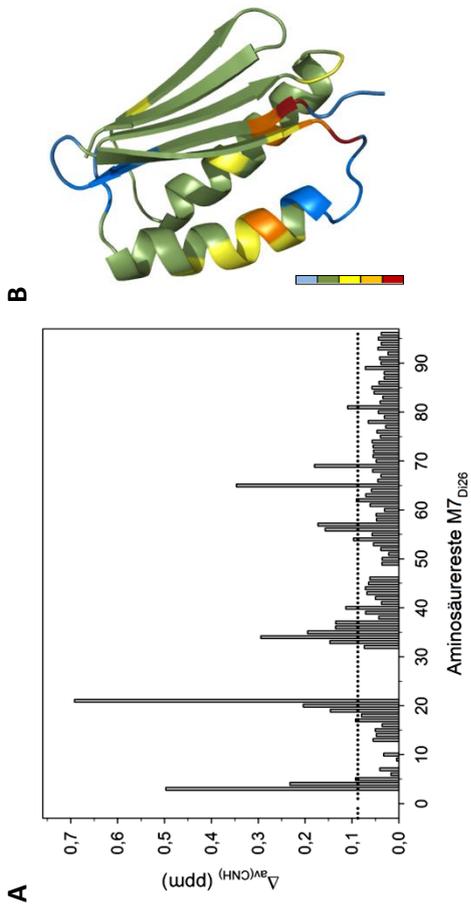


**E** G<sub>4</sub>S<sub>4</sub>H<sub>4</sub>M<sub>4</sub>I<sub>4</sub>K<sub>4</sub>V<sub>4</sub>D<sub>4</sub>I<sub>4</sub>T<sub>4</sub>IK<sub>4</sub>IQR<sub>10</sub>DG<sub>15</sub>E<sub>15</sub>EIDIR<sub>20</sub>VSTG<sub>25</sub>CPHCF<sub>30</sub>LER<sub>35</sub>Q<sub>35</sub>ER<sub>40</sub>ALARA<sub>45</sub>GR<sub>50</sub>RNV<sub>55</sub>Q<sub>55</sub>IS<sub>55</sub>AE<sub>60</sub>Q<sub>60</sub>KEI<sub>65</sub>LE<sub>65</sub>L<sub>65</sub>ELIA<sub>70</sub>LLQK<sub>75</sub>LGYKD<sub>80</sub>INVRV<sub>85</sub>NGTEV<sub>90</sub>KIEVR<sub>95</sub>V

**F** G<sub>4</sub>S<sub>4</sub>H<sub>4</sub>M<sub>4</sub>I<sub>4</sub>K<sub>4</sub>V<sub>4</sub>D<sub>4</sub>I<sub>4</sub>T<sub>4</sub>IK<sub>4</sub>IQR<sub>10</sub>DG<sub>15</sub>E<sub>15</sub>IDIR<sub>20</sub>STG<sub>25</sub>CPHCF<sub>30</sub>LR<sub>35</sub>Q<sub>35</sub>ER<sub>40</sub>ALARA<sub>45</sub>GR<sub>50</sub>RNV<sub>55</sub>Q<sub>55</sub>IS<sub>55</sub>AE<sub>60</sub>Q<sub>60</sub>KEI<sub>65</sub>LE<sub>65</sub>L<sub>65</sub>ELIA<sub>70</sub>LLQK<sub>75</sub>LGYKD<sub>80</sub>INVRV<sub>85</sub>NGTEV<sub>90</sub>KIEVR<sub>95</sub>V

**Abbildung 7.9- IV: Strukturvergleich der Redoxformen von M7(wt) mit dem M7(D126) mittels NMR-Spektroskopie.** Dargestellt wird für die einzelnen Reste von M7<sub>D126</sub> die durchschnittliche chemische Verschiebung der Amid <sup>15</sup>N- und <sup>1</sup>H<sup>N</sup>-Kerne ( $\Delta_{av}^{(NH)}$ ) nach Gleichung 3-XXV (siehe 3.5.4) für den Vergleich von oxidierten M7<sub>D126</sub> gegen den M7(wt) (A, B, E) und reduzierten M7<sub>D126</sub> gegen den M7(wt) (C, D, F). Die Messung von M7<sub>D126</sub> (ox/red) wurden bei 20 °C und pH 7.0 durchgeführt. M7(wt) wurde bei 25 °C und pH 6.5 gemessen<sup>149</sup>. Die Proteine lagen in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 bis 8 % D<sub>2</sub>O, 0.05 % NaN<sub>3</sub> vor. Die gepunktete Linie bei 0.28 ppm (A) und 0.27 ppm (C) entspricht dem  $\phi(\Delta_{av}^{(GNH)})$ -Wert. **B** bzw. **D**) stellen die  $\Delta_{av}^{(NH)}$ -Werte mittels Farbskala in der M7(wt)-NMR-Struktur (pdb: 2JVF) dar. Blau: Reste nicht zuordenbar; **B**) Grün:  $\Delta_{av}^{(NH)} < 0.28$  ppm; Gelb:  $\Delta_{av}^{(NH)} > 0.28$  ppm; Orange:  $\Delta_{av}^{(NH)} > 0.40$  ppm; Rot:  $\Delta_{av}^{(NH)} > 0.27$  ppm; Gelb:  $\Delta_{av}^{(NH)} < 0.27$  ppm; Orange:  $\Delta_{av}^{(NH)} > 0.40$  ppm; Rot:  $\Delta_{av}^{(NH)} > 0.27$  ppm. **E**) Aminosäuresequenz von M7<sub>D126</sub> in der Farbgebung von (B) bzw. **F**) Sequenz von M7<sub>D126</sub> in der Farbgebung von (D). Die M7-Struktur beginnt am Lys<sub>1</sub> (K<sub>1</sub>).

**C** G-4SHM|KVD<sub>5</sub>IKIQR<sub>10</sub>DGQEI<sub>15</sub>EID<sub>20</sub>VS\*<sup>†</sup>TGK<sub>25</sub>CPHCE<sub>30</sub>LE/A<sub>35</sub>TELE<sub>40</sub>ALARA<sub>45</sub>GARNV<sub>50</sub>  
 QITI<sub>55</sub>ENDE<sub>60</sub>QAKEL<sub>65</sub>LEL<sub>70</sub>RLLQK<sub>75</sub>LGYYK<sub>80</sub>NVRV<sub>85</sub>NGTEV<sub>90</sub>KIEVR<sub>95</sub>V



**Abbildung 7.9- V: Strukturvergleich zwischen oxidierten M7<sub>D126</sub> und M7<sub>D123</sub> mittels NMR-Spektroskopie.** A) Dargestellt wird die Differenz der chemischen Verschiebung von oxidierten M7<sub>D126</sub> und M7<sub>D123</sub> der <sup>13</sup>Ca-, <sup>13</sup>Cβ-, <sup>15</sup>N- und <sup>1</sup>H<sup>N</sup>-Kerne ( $\Delta\nu_{(CNH)}$ ) nach Gleichung 3-XXVI. Die Messungen wurden bei 20 °C in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 % D<sub>2</sub>O, 0.05 % NaN<sub>3</sub>, pH 7.0 durchgeführt. Die gepunktete Linie bei 0.089 ppm entspricht dem  $\emptyset(\Delta\nu_{(CNH)})$ -Wert. **B)** Die ermittelten  $\Delta\nu_{(CNH)}$ -Werte sind mittels Farbskala in der M7 (wt)-NMR-Struktur (pdb: 2JVF) dargestellt. Blau: Reste nicht zuordenbar oder unterschiedliche Sequenz von M7<sub>D123</sub> und M7<sub>D126</sub>; Grün:  $\Delta\nu_{(CNH)} < 0.10$  ppm; Gelb:  $\Delta\nu_{(CNH)} > 0.10$  ppm; Orange:  $\Delta\nu_{(CNH)} > 0.20$  ppm; Rot:  $\Delta\nu_{(CNH)} > 0.4$  ppm. **C)** Sequenz von M7<sub>D126</sub> in der Farbgebung von **(B)**. Der Stern (\*) symbolisiert die Position des CPHC-Tetrapeptids in M7<sub>D123</sub>. Von Position 23 bis 29 sind die Sequenzen von M7<sub>D123</sub> und M7<sub>D126</sub> nicht identisch und damit nicht vergleichbar. Die M7-Struktur beginnt am ersten Lys (K<sub>1</sub>).

### 7.10. Liste chemischer Verschiebungen von M7-Varianten

Tabelle 7.10- I: Übersicht der chemischen Verschiebungen des M7(wt) und der Redoxformen von M7<sub>D126</sub> und M7<sub>D123</sub>

Nr.	AS		M7 <sub>D126</sub> OX (in ppm)				M7 <sub>D126</sub> RED (in ppm)				AS		M7 <sub>D123</sub> OX (in ppm)				M7 <sub>D123</sub> RED (in ppm)				
	M7	M7(wt) <sup>#</sup>	NH	N	Ca	Cβ	NH	N	Ca	Cβ	M7D126	M7D123	NH	N	Ca	Cβ	NH	N	Ca	Cβ	
-4	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-3	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-2	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-1	M	8.14	122.0	-	-	-	8.29	122.44	56.02	35.65	M	M	8.01	122.15	56.28	35.52	-	-	-	-	-
1	K	8.28	123.3	-	-	-	8.78	125.79	55.18	33.90	K	K	8.37	123.76	54.43	34.70	-	-	-	-	-
2	V	8.22	123.4	-	-	-	8.63	123.07	60.68	34.30	V	V	8.77	111.29	58.48	36.00	-	-	-	-	-
3	D	8.45	126.2	8.75	126.54	52.96	8.65	126.64	53.25	43.76	D	D	8.91	121.83	53.01	43.22	-	-	-	-	56.42
4	I	9.27	124.8	8.55	124.07	59.74	8.70	124.63	59.99	40.93	I	I	8.48	123.27	58.88	40.99	7.00	107.59	49.49	38.58	-
5	T	9.07	123.1	8.78	123.54	61.60	8.83	123.80	61.63	71.17	T	T	8.78	123.64	61.25	70.99	8.79	123.66	58.85	68.57	-
6	I	9.47	127.1	8.74	126.88	61.08	8.74	126.90	61.14	39.96	I	I	8.71	126.81	61.09	40.02	8.72	126.51	58.61	37.45	-
7	K	9.24	127.2	8.95	129.69	55.38	8.95	129.70	-	-	K	K	8.98	129.69	55.23	34.87	8.98	129.69	52.82	32.39	-
8	I	9.27	125.3	-	-	-	-	-	-	-	I	I	8.53	125.89	60.73	38.45	-	-	-	-	-

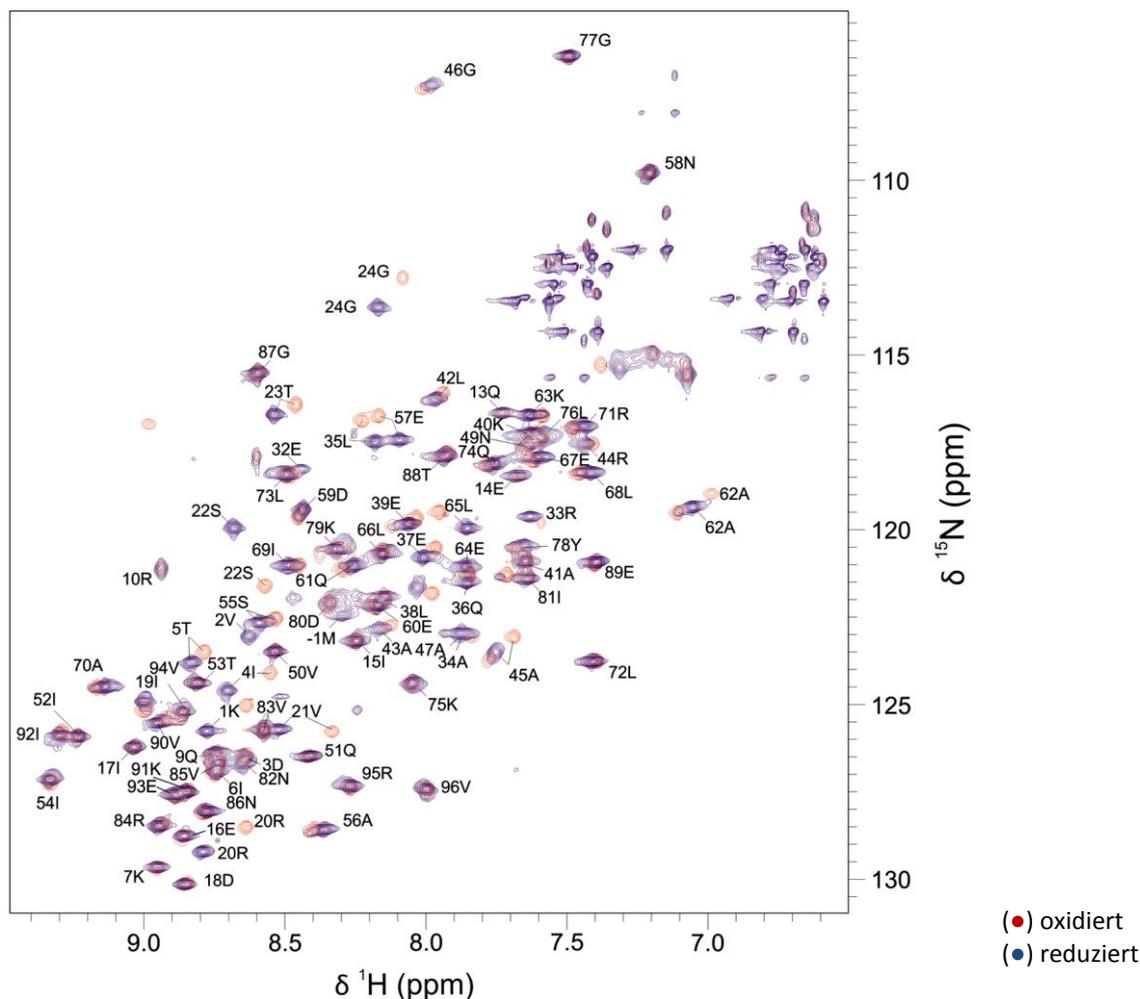
Nr.	AS <sub>M7</sub>		M7(wt) <sup>#</sup> (in ppm)		AS <sub>M7D126</sub>		M7 <sub>D126 OX</sub> (in ppm)				M7 <sub>D126 RED</sub> (in ppm)				AS <sub>M7D123</sub>		M7 <sub>D123 OX</sub> (in ppm)				M7 <sub>D123 RED</sub> (in ppm)			
			NH	N			NH	N	Cα	Cβ	NH	N	Cα	Cβ			NH	N	Cα	Cβ	NH	N	Cα	Cβ
9	Q	8.68	126.2	126.43	8.75	126.43	-	-	-	-	8.74	126.40	-	-	Q	8.76	126.44	54.44	31.75	-	-	-	-	
10	R	8.76	124.9	121.09	8.93	121.09	-	-	-	-	8.93	121.13	-	-	R	8.94	120.77	57.19	28.61	-	-	-	-	
11	D	9.09	124.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	8.60	117.53	55.20	39.66	-	-	-	-	
12	G	8.69	109.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	7.52	105.28	44.87	-	-	-	-	-	
13	Q	7.89	119.3	116.66	7.73	116.66	57.58	30.30	30.30	7.73	116.68	57.64	30.30	30.30	Q	7.68	116.48	57.56	30.12	-	-	-	-	
14	E	8.66	123.8	118.48	7.67	118.48	54.74	33.21	33.23	7.68	118.49	54.75	33.23	33.23	E	7.64	118.40	54.57	33.15	-	-	-	-	
15	I	8.96	126.0	123.19	8.25	123.19	59.91	41.25	41.45	8.24	123.20	59.87	41.45	41.45	I	8.25	123.25	59.75	41.37	-	-	-	-	
16	E	8.66	127.0	128.78	8.86	128.78	54.73	32.49	32.53	8.85	128.77	54.72	32.53	32.53	E	8.87	128.74	54.59	32.50	-	-	-	-	
17	I	9.26	127.5	126.24	9.03	126.24	59.97	40.79	40.80	9.03	126.25	60.00	40.80	40.80	I	9.06	126.41	59.68	41.00	-	-	-	-	
18	D	8.72	127.0	130.13	8.84	130.13	53.31	43.97	43.94	8.85	130.18	53.32	43.94	43.94	D	8.79	129.94	53.08	44.15	-	-	-	-	
19	I	9.31	125.0	125.15	9.00	125.15	60.44	39.74	39.95	9.00	124.95	60.48	39.95	39.95	I	8.96	124.90	60.42	40.31	-	-	-	-	
20	R	8.65	129.0	128.52	8.63	128.52	54.17	32.64	32.27	8.79	129.24	54.46	32.27	32.27	R	8.53	127.56	53.58	33.00	-	-	-	-	
21	V	9.01	124.4	125.79	8.33	125.79	61.84	32.85	33.96	8.52	125.76	60.60	33.96	33.96	V	7.89	125.35	64.42	32.40	-	-	-	-	
22	S	9.35	119.3	121.66	8.57	121.66	56.93	65.62	66.05	8.68	119.97	56.89	66.05	66.05	S	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	T	7.49	111.0	116.46	8.46	116.46	62.48	69.40	63.15	8.54	116.73	63.15	63.15	63.15	T	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	G	8.94	110.1	112.80	8.08	112.80	44.79	-	-	8.17	113.66	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	K	8.43	122.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	59.87	-	-	-	-	-	
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	62.15	69.29	-	-	-	-	
30	E	7.90	119.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	8.27	115.49	62.15	69.29	-	-	-	-	
31	L	8.09	123.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	7.80	109.69	44.98	-	-	-	-	-	
32	E	7.98	118.9	116.99	8.98	116.99	60.48	28.89	29.05	8.44	118.26	60.25	29.05	29.05	E	9.08	116.46	60.43	28.88	-	-	-	-	
33	R	7.72	118.8	118.97	6.98	118.97	58.55	29.89	29.73	7.63	119.67	59.02	29.73	29.73	R	-	-	57.98	29.74	-	-	-	-	
34	A	8.30	122.8	123.09	7.68	123.09	55.22	18.00	18.01	7.87	122.99	55.24	18.01	18.01	A	8.24	123.07	55.03	18.31	-	-	-	-	
35	L	8.29	117.0	116.73	8.16	116.73	57.56	40.54	40.49	8.18	117.53	57.57	40.49	40.49	L	8.54	116.85	57.66	40.41	-	-	-	-	
36	Q	7.77	120.5	121.30	7.71	121.30	59.17	28.33	28.30	7.85	121.49	-	28.30	28.30	Q	7.45	121.19	59.18	28.19	-	-	-	-	
37	E	8.34	120.7	120.53	7.96	120.53	59.08	29.09	29.06	8.01	120.80	59.21	29.06	29.06	E	7.77	120.72	59.45	29.15	-	-	-	-	
38	L	8.52	121.9	121.97	8.15	121.97	58.22	41.72	41.74	8.14	121.92	58.22	41.74	41.74	L	8.20	121.88	58.10	41.78	-	-	-	-	
39	E	8.03	119.1	119.70	8.03	119.70	60.46	29.32	29.32	8.06	119.85	60.48	29.32	29.32	E	8.15	119.86	60.34	29.25	-	-	-	-	
40	K	7.77	116.9	117.28	7.61	117.28	59.44	32.55	32.55	7.63	117.26	59.44	32.55	32.55	K	7.52	116.95	59.12	32.32	-	-	-	29.95	

Nr.	AS M7	M7(wt) <sup>#</sup> (in ppm)		AS M7D126			M7 <sub>D126</sub> OX (in ppm)			M7 <sub>D126</sub> RED (in ppm)			AS M7D123	M7 <sub>D123</sub> OX (in ppm)			M7 <sub>D123</sub> RED (in ppm)				
		NH	N	NH	α	β	NH	N	α	β	NH	N		α	β	NH	N	α	β		
41	A	7.96	120.7	A	7.64	120.85	54.72	18.38	7.65	120.98	54.76	18.37	A	7.61	120.74	54.62	18.30	7.62	120.78	52.71	15.95
42	L	8.04	115.7	L	7.94	116.11	56.56	42.30	7.96	116.28	56.69	42.28	L	8.01	116.22	56.45	42.38	7.99	116.21	54.05	39.94
43	A	7.95	121.7	A	8.12	122.73	54.03	18.39	8.17	122.84	54.11	18.49	A	8.18	123.11	54.16	18.25	8.17	123.02	51.65	15.81
44	R	7.40	117.7	R	7.41	117.54	56.99	30.41	7.44	117.56	57.00	-	R	7.45	117.20	56.79	30.28	7.46	117.21	54.23	27.97
45	A	8.31	126.0	A	7.77	123.69	53.74	18.94	7.75	123.52	53.77	-	A	7.72	123.14	53.65	18.96	7.73	123.22	51.18	16.47
46	G	8.53	108.2	G	8.01	107.40	46.05	-	7.98	107.27	46.17	-	G	7.93	106.93	46.03	-	7.95	106.93	43.65	-
47	A	8.29	122.7	A	7.83	123.09	55.18	-	7.85	122.97	-	-	A	7.82	122.73	52.70	19.02	7.84	122.80	50.25	16.60
48	R	8.79	119.1	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	56.18	31.67	-	-	-	-
49	N	7.74	116.5	N	7.64	117.62	53.06	41.60	7.63	117.55	53.10	41.61	N	7.60	117.45	52.96	41.60	-	-	-	-
50	V	8.72	123.3	V	8.53	123.54	60.62	35.09	8.53	123.51	60.64	35.11	V	8.53	123.58	60.51	35.00	-	-	-	-
51	Q	9.04	126.0	Q	8.41	126.48	54.39	31.96	8.41	126.49	54.42	32.02	Q	8.40	126.42	54.31	31.95	-	-	-	-
52	I	9.55	126.8	I	9.23	125.93	59.76	41.39	9.23	125.95	59.79	41.42	I	9.23	125.68	59.66	41.33	-	-	-	-
53	T	9.40	123.5	T	8.81	124.42	61.56	70.38	8.81	124.36	61.57	70.42	T*	8.83	124.19	61.49	70.20	-	-	58.91	67.81
54	I	9.51	126.8	I	9.33	127.27	60.03	41.04	9.33	127.18	60.07	41.06	I*	9.26	127.10	59.77	41.28	9.27	126.84	57.35	38.75
55	S	8.90	122.1	S	8.53	122.61	57.23	64.05	8.59	122.69	57.26	64.07	S*	8.46	122.34	57.27	63.91	8.45	122.34	54.61	61.43
56	A	8.71	129.1	A	8.39	128.62	49.84	22.91	8.36	128.56	49.82	23.17	A*	8.43	128.70	49.71	22.30	8.45	128.58	47.49	19.93
57	E	8.51	116.7	E	8.22	116.92	57.93	31.20	8.09	117.46	57.96	31.27	E*	8.47	115.85	57.81	31.03	8.43	116.24	55.39	28.72
58	N	7.34	108.7	N	7.20	109.77	52.05	40.40	7.21	109.82	52.03	40.49	N*	7.20	109.77	52.03	40.21	7.19	109.81	49.55	37.73
59	D	8.69	120.0	D	8.45	119.64	57.10	40.47	8.44	119.45	57.07	40.52	D	8.47	120.00	57.13	40.35	8.48	120.02	54.69	37.90
60	E	8.41	121.9	E	8.18	122.20	59.94	28.86	8.17	122.11	59.97	28.90	E	8.21	122.31	59.85	28.82	8.21	122.23	57.44	26.35
61	Q	8.62	121.1	Q	8.29	121.13	58.26	30.83	8.26	121.08	58.31	30.78	Q	8.36	121.33	58.15	30.98	8.35	121.36	55.79	28.37
62	A	7.62	120.3	A	7.10	119.51	55.86	17.63	7.05	119.38	55.82	17.61	A	7.25	119.95	55.84	17.53	7.24	119.92	51.52	15.13
63	K	7.66	116.5	K	7.58	116.73	59.72	32.49	7.63	116.82	59.71	32.53	K	7.48	116.87	59.69	32.30	7.50	116.90	54.37	27.79
64	E	8.04	121.0	E	7.84	121.28	59.45	29.60	7.86	121.09	59.41	29.48	E	7.77	121.66	59.35	29.65	-	-	-	-
65	L	8.24	120.2	L	7.95	119.49	57.05	41.53	7.85	119.94	56.49	40.96	L	8.09	118.89	57.99	42.48	-	-	-	-
66	L	8.29	120.5	L	8.15	120.63	58.95	41.31	8.15	120.72	59.01	41.27	L	8.14	120.39	58.80	41.30	-	-	-	-

Nr.	AS <sub>M7</sub>		M7(wt) <sup>#</sup> (in ppm)		AS <sub>M7D126</sub>		M7 <sub>D126</sub> OX (in ppm)				M7 <sub>D126</sub> RED (in ppm)				AS <sub>M7D123</sub>		M7 <sub>D123</sub> OX (in ppm)				M7 <sub>D123</sub> RED (in ppm)			
	NH	N	NH	N	NH	N	NH	N	Ca	Cβ	NH	N	Ca	Cβ	NH	N	NH	N	Ca	Cβ	NH	N	Ca	Cβ
67	7.77	117.8	E	7.62	118.03	59.58	29.06	7.60	117.80	59.59	29.07	E	7.65	118.16	59.51	28.95	-	-	-	-	-	-	-	-
68	7.70	118.4	L	7.45	118.42	57.95	42.74	7.42	118.40	57.97	42.70	L	7.55	118.43	57.85	42.72	-	-	-	-	-	-	-	-
69	8.54	120.1	I	8.45	121.02	63.99	36.44	8.49	121.05	63.99	36.45	I	8.35	120.73	63.41	36.08	-	-	-	-	-	-	-	-
70	9.40	124.1	A	9.16	124.54	56.25	17.17	9.14	124.53	56.28	17.20	A	9.19	124.56	56.18	17.00	-	-	-	-	-	-	-	-
71	7.88	117.0	R	7.47	117.10	59.42	30.10	7.44	117.08	59.44	30.14	R	7.54	117.12	59.34	29.95	-	-	-	-	-	-	-	-
72	7.53	123.2	L	7.39	123.77	58.21	41.89	7.41	123.79	58.24	41.88	L	7.34	123.68	58.13	41.72	-	-	-	-	-	-	-	-
73	8.59	118.1	L	8.48	118.45	58.20	41.06	8.49	118.44	58.22	41.08	L	8.40	118.40	58.10	40.95	-	-	-	-	-	-	-	-
74	8.10	118.0	Q	7.77	118.13	59.03	28.26	7.76	118.12	59.06	28.29	Q	7.86	118.35	58.97	28.17	-	-	-	-	-	-	-	-
75	8.24	123.9	K	8.05	124.40	59.46	32.12	8.05	124.42	59.48	32.11	K	8.06	124.42	59.36	32.00	-	-	-	-	-	-	-	-
76	7.79	117.0	L	7.59	117.42	55.10	42.37	7.59	117.31	55.11	42.41	L	7.53	117.44	54.97	42.31	-	-	-	-	-	-	-	-
77	7.71	106.1	G	7.49	106.47	45.27	-	7.49	106.47	45.29	-	G	7.50	106.45	45.16	-	7.50	106.42	-	-	-	-	-	-
78	7.94	120.7	Y	7.68	120.50	58.80	37.77	7.65	120.48	58.84	37.78	Y	7.68	120.57	58.68	37.54	-	-	-	-	-	-	-	-
79	8.39	120.1	K	8.30	120.54	56.35	34.91	8.32	120.59	56.37	34.93	K	8.30	120.53	56.23	34.88	-	-	-	-	-	-	-	-
80	8.58	122.0	D	8.34	122.16	53.97	40.02	8.33	122.12	53.99	40.04	D	8.30	121.85	53.92	39.94	-	-	-	-	-	-	-	-
81	7.86	120.8	I	7.64	121.31	60.62	40.69	7.64	121.45	60.69	40.67	I	7.67	121.31	60.76	40.28	-	-	-	-	-	-	-	-
82	8.88	125.8	N	8.63	126.49	52.69	41.31	8.65	126.63	52.73	41.32	N	8.64	126.63	52.62	41.18	-	-	-	-	-	-	-	-
83	8.78	125.2	V	8.57	125.77	61.56	34.72	8.57	125.77	61.57	34.68	V	8.57	125.56	61.46	34.68	-	-	-	-	-	-	-	-
84	9.11	127.8	R	8.94	128.44	55.10	32.85	8.95	128.51	55.10	32.86	R	8.91	128.33	55.02	32.67	-	-	-	-	-	-	-	-
85	8.91	126.3	V	8.74	126.65	62.28	33.46	8.73	126.69	62.25	33.33	V	8.73	126.75	62.16	33.27	-	-	-	-	-	-	58.00	-
86	8.99	127.6	N	8.79	128.07	51.85	39.43	8.78	128.08	51.87	39.45	N	8.80	128.18	51.74	39.31	8.81	128.77	49.30	36.85	-	-	-	-
87	8.85	115.5	G	8.59	115.56	47.75	-	8.60	115.56	47.77	-	G	8.62	115.67	47.65	-	8.62	115.63	45.19	-	-	-	-	-
88	8.11	117.4	T	7.92	117.86	62.36	68.20	7.93	117.93	62.32	68.17	T	7.92	117.72	62.31	68.10	7.93	117.78	60.00	65.77	-	-	-	-
89	7.68	121.1	E	7.40	120.98	54.13	33.06	7.39	120.95	54.17	33.00	E	7.42	121.15	54.04	32.80	7.42	121.10	51.68	30.29	-	-	-	-
90	9.13	125.7	V	8.92	125.46	60.39	35.66	8.95	125.49	60.44	35.66	V	8.91	125.25	60.33	35.55	-	-	-	-	-	-	-	-
91	9.06	127.0	K	8.84	127.46	54.67	35.14	8.85	127.51	54.71	35.00	K	8.84	127.48	54.57	35.01	-	-	-	-	-	-	-	-
92	9.48	125.6	I	9.29	125.82	60.02	41.35	9.30	125.94	60.06	41.33	I	9.27	125.93	59.96	41.31	-	-	-	-	-	-	-	-
93	9.18	127.8	E	8.88	127.65	54.88	33.03	8.89	127.60	54.91	33.12	E	8.88	127.51	54.77	33.16	-	-	-	-	-	-	-	-
94	9.01	125.0	V	8.86	125.33	60.85	34.44	8.86	125.23	60.86	34.50	V	8.85	125.04	60.76	34.42	-	-	-	-	-	-	-	-
95	8.41	127.1	R	8.27	127.39	54.79	32.42	8.27	127.29	54.77	32.50	R	8.29	127.36	54.64	32.50	-	-	-	-	-	-	-	-
96	7.81	127.4	V	7.99	127.42	64.42	33.32	8.00	127.44	-	-	V	8.03	127.51	64.31	33.37	-	-	-	-	-	-	-	-

# chemische Verschiebungen für M7(wt) aus der Diplomarbeit von C. Stordeur (2007)<sup>149</sup>  
\* Reste von reduzierten M7<sub>D123</sub>, die zwei (²) oder drei (³) mögliche Konformationen aufweisen





**Abbildung 7.11- II:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von  $\text{M7}_{\text{Di26}}$ .** Dargestellt sind die chemischen Verschiebungen der  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -Kerne von oxidierten (rot) und reduzierten  $\text{M7}_{\text{Di23}}$  (blau). Die Messungen fanden bei 20 °C statt mit 650  $\mu\text{M}$  Protein in 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0.05 % Natriumazid; 8 %  $\text{D}_2\text{O}$ ; pH 7.0 und 15  $\mu\text{M}$  DSS- $\text{d}_6$  als Referenz. Reduzierende Bedingungen wurden mit 10 mM deuterierten DTT erzeugt. Die NMR-Spektroskopie und die Zuordnung der Kreuzsignale zu den entsprechenden Aminosäuren von  $\text{M7}_{\text{Di26}}$  wurden von S. Gröger und M. Baumann (AG Balbach; Institut für Physik der MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

## 7.12. Abkürzungsverzeichnis und fremdsprachige Begriffe

active site	Aktive Zentrum in Enzymen
Agilent	Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, USA)
Amresco	Amresco LLC (Solon, USA)
AppliChem	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Applied Biosystems™	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG (Bonn)
Applied Photophysics	Applied Photophysics Ltd. (Leatherhead; UK)
APV	APV Deutschland GmbH Maschinenfabrik (Lübeck)
AS	Aminosäure
ASA	<i>accessible surface area</i>
AU	Absorption Units
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
Beckman	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
Becton	Becton, Dickinson and Company (Heidelberg)

BFM	Biofeuchtmasse
Bioinformatics Org.	Bioinformatics Organization (Massachusetts, USA)
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Brand	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Braun	B. Braun Biotech International GmbH (Melsungen)
Bruker	Bruker Corporation (Karlsruhe)
Bühler	Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Carl Zeiss	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
CD-Spektroskopie	Circular Dichroismus- Spektroskopie
Cortecnet	Cortecnet (Paris, Frankreich)
CV	<i>column volume</i> bzw. Säulenvolumen
CVM	CVM Chemie-Vertrieb Magdeburg GmbH & Co. KG (Schönebeck)
Da bzw. kDa	Dalton bzw. Kilodalton
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Duchefa	Duchefa Biochemie (Haarlem)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Elemental Scientific	Elemental Scientific, Inc., (Omaha, USA)
Eppendorf	Eppendorf AG (Hamburg)
ESI	Elektronensprayionisation
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (lateinisch "und andere")
Eurofins	Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg)
Fisher	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
FU	Fluoreszenz Units bzw. Messereignisse pro Sekunde
GE	General Electric Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat
Hamilton	Hamilton Germany GmbH (Planegg-Martinsried)
Hellma	Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim)
Heraeus	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Hirschmann	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt)
Horiba	Horiba Jobin Yvon GmbH (Unterhaching)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IgG-HRP	Immunglobulin G - <i>horseradish peroxidase</i>
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
Implen	Implen GmbH (München)
Intas	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen)
IRIS	IRIS Biotech GmbH (Marktrechwitz)
Jasco	Jasco Labor- und Datentechnik (Gross-Umstadt)
Jouan	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG (Bonn)
kb	Kilobase
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LEM	<i>linear extrapolation method</i>
LMW	<i>low molecular weight</i> Marker
M	Molekulargewicht
M & N	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
Merck	Merck KgaA (Darmstadt)
Mettler-Toledo	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
Microsoft	Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim)
MLU Halle-Wittenberg	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
MP	MP Biomedicals GmbH (Eschwege)
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
n. reduzierend	nicht reduzierend
NEB	New England BioLabs (Ipswich, USA)
NHI	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
Novabiochem	Merck KgaA (Darmstadt)
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bzw. Absorption bei $\lambda = 600$ nm

PBS-Puffer	<i>phosphate buffered saline</i> Puffer
PDB	Protein Data Bank
pdb	Proteinstrukturdatei aus der Protein Data Bank
Peqlab	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Pfeiffer	Pfeiffer Vacuum GmbH (Wien, Österreich)
Phenomenex	Phenomenex Ltd. (Aschaffenburg)
Qiagen	Qiagen GmbH (Hilden)
Raytest	Raytest GmbH (Straubenhardt)
rel. Fluoreszenz	relative Fluoreszenz
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
Roche	F. Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz)
Roth	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
RT	Raumtemperatur
Santa Cruz	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg)
Sarstedt	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
Schrödinger	Schrödinger LLC (Mannheim)
Scientific Industries	Scientific Industries Inc. (New York, USA)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> – Größenausschlusschromatografie
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Spectra	Spectra Stable Isotopes (Columbia, USA)
SOC-Medium	<i>super optimal broth</i> Medium
T7	Phage T7
TBS-Puffer	<i>tris buffered saline</i> Puffer
TEA-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Technische Glaswerke	Technische Glaswerke Ilmenau GmbH (Ilmenau)
Terumo	Terumo Deutschland GmbH (Eschborn)
Thermo	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG (Bonn)
TNB <sup>2-</sup>	5-Thio-2-nitrobenzoat
TPP	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Trt	Triphenylmethyl
U	Unit
UV/Vis	Ultraviolett / <i>Visible</i>
V	Volumen
Vacuubrand	Vacuubrand GmbH & Co. KG (Wertheim)
(v/v)	Volumenprozent
VWR	VWR International GmbH (Darmstadt)
WBB	Wasserstoffbrückenbindung
Whatman	Whatman GmbH (Dassel)
Weigert	Chemische Fabrik Dr. Weigert GmbH & Co. KG (Mühlenhagen)
WTW	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weilheim)
(w/v)	Masseprozent

## 8. Publikationen, Poster und Vorträge

### Zukünftige Publikationen

Voigtmann and Lilie, The CXXC Motif – structure and redox properties of oxidoreductases.

Manuskript eingereicht

### Poster

Martin Voigtmann, Stefan Gröger and Hauke Lilie, Implementation of a redox activity into the structural protein M7, *27th Faltertage*, Halle 2016

Martin Voigtmann, Wiebke Hannemann and Hauke Lilie, Engineering an artificial oxidoreductase - Implementation of the CXXC tetrapeptide into the structural protein M7, *67th Mosbach Kolloquium*, 2016

Martin Voigtmann, Stefan Gröger and Hauke Lilie, Implementation of a redox activity into the structural protein M7, *26th Faltertage*, Halle 2015

Martin Voigtmann, Wiebke Hannemann, Felix Nicolaus and Hauke Lilie, Implementation of a redox activity into the structural protein M7, *25th Faltertage*, Regensburg 2014

Martin Voigtmann, Wiebke Hannemann and Hauke Lilie, Engineering an Artificial Oxidoreductase, 3rd *International Meeting GRK 1026*, Halle 2013

### Vorträge

Design and characterization of redox-active variants of the structural protein M7, *27th Faltertage*, Halle 2016

Implementation of a redox activity into the structural protein M7, *25th Faltertage*, Halle 2014

Designing a redox-active M7, *Spring Meeting GRK 1026*, Meißen 2013

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Familienname Voigtmann  
Vorname Martin  
Geburtstag/ -ort 20.03.1985  
Erfurt  
Nationalität Deutsch  
Anschrift Paulusgasse 6; Top 36+37  
1030 Wien  
Österreich

### Schulausbildung

2001 - 2004 Integrierte Gesamtschule Erfurt, Abitur  
1995 - 2001 Regelschule 7 Erfurt, Realschulabschluss

### Hochschulausbildung

11/2010 - 10/2011 Diplomaarbeit „Charakterisierung von B3-MICA als Immunotoxin“ in der AG Lilie; Institut für Proteinbiochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Note: 1.1  
10/2005 - 10/2011 Studium Biochemie Diplom an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### Promotion

06/2012 – 01/2018 Thema „Die Konstruktion einer artifiziellen Oxidoreduktase - Implementierung des CXXC-Tetrapeptids in das Strukturprotein M7“ in der AG Lilie; Institut für Proteinbiochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### Berufliche Erfahrung

seit 02/2017 Projektleiter der Prozessanalytik bei Böhlinger Ingelheim RCV (Wien) in Kooperation mit der BOKU Wien  
11/2015 - 04/2016 Wissenschaftler am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) Halle (Saale)  
02/2012 - 04/2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Chemie und Biologie an der Universität von Umeå, Schweden

## **10. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Weiter erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Bewerbung eines Doktorgrades eingereicht habe. Ich selbst habe mich noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Wien, den 28.01.2018

Martin Voigtmann

## 11. Danksagung

Die Promotionszeit kommt mir rückblickend wie eine lange spannende Reise vor. Auf das geleistete bin ich stolz, aber mir ist bewusst, dass ich die Arbeit, so in der Form, nicht ohne die immense Unterstützung von so vielen hätte anfertigen können. Dem Kollegen dem ich als erstes Danken will, ist allen voran Hauke Lilie, Ideengeber und Mentor meiner Promotion. Die Diskussionen in unseren Seminaren sind für mich noch immer der Standard, wie ein produktives Treffen aussehen muss. Ebenfalls besonderen Dank an Ralph Golbik und Roman Dalügge für die Unterstützung in all den Jahren. Desweiteren haben viele Studenten am Projekt mitgearbeitet. Hier danke ich Wiebke Hannemann, die mit Abstand den größten Anteil hatte. Ebenso Felix Nicolaus, Anita May, Christian Schultheiss, Philipp Skorupa und Julius Nietzsche. Aus anderen Arbeitsgruppen danke ich Stefan Gröger und Monika Baumann für ihren großen Einsatz in der NMR-Spektroskopie, Christian Ihling für die Massenspektroskopie und Martin Herzberger für die Atomspektroskopie. In der Peptidsynthese unterstütze mich die geduldige Steffanie Kaufmann. Besonderen Dank für die enge Zusammenarbeit gilt den Arbeitsgruppen des Instituts für Biochemie und Biotechnologie, speziell allen Kollegen aus der AG Lilie, der AG Schwarz und der AG Kiefhaber, im Besonderen für die geniale Zeit: Steffen Damm und Peter Enke. Ebenfalls zu nennen ist die Naturstoffsynthesegruppe im IPB, die mir zum Ende der Promotion für einige Monate einen Platz zum Arbeiten gegeben hat. Die Zeit im IPB war kurz, aber ihr, Danilo und Co., habt mir gezeigt, welch Spaß es sein kann in einem neuem Arbeitsumfeld tätig zu werden.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Hier allen voran meiner großartigen Mutti und meiner Liebe Madlen. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für mein Wehklagen und auch für mein Selbstmitleid. Ihr habt mich aufgebaut, mir Mut gemacht und Zweifel zerstreut. Euer Zuspruch hat diese Promotion erst ermöglicht. Auch an all meine Freunde ein riesen Dankeschön. Ihr habt meinen Kopf des Öfteren entlüftet, ob mit Feiern, knallharten Sport (oh ja Marcus), wundervollen Reisen, mit Gespräche und gemütlichen Abenden. Besonderen Dank hier auch an dich Karina, meine treue Begleiterin über so viele Jahre.

Es war eine fantastische Zeit, die Ich immer glücklich in Erinnerung behalten werde und ich freue mich auf alles was nun folgt.