

Aus der Naturwissenschaftlichen Fakultät I,  
Institut für Biochemie und Biotechnologie,  
Abteilung Technische Enzymologie

## **Limitierte Proteolyse zur Analyse lokaler und globaler Änderungen der Proteinstruktur am Beispiel von Ribonucleasen**

**H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

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

von

Herrn Dr. rer. nat. Ulrich Arnold

geboren am 30.10.1965 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Bernd Wiederanders, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. Ulrich Hahn, Universität Hamburg

eingereicht: 28. September 2007

verteidigt: 13. Mai 2008

Probevorlesung: 12. Juni 2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000013762**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013762>]



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	7
<b>2. Proteinstabilität und Proteinfaltung</b>	8
2.1. Proteindenaturierung	8
2.2. Modelle der Proteinfaltung	10
2.3. Thermodynamische Stabilität	12
2.4. Proteinfaltung	16
2.4.1. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und der Freien Aktivierungsenthalpie	16
2.4.2. Gewinnung struktureller Einblicke in das Faltungsgeschehen	20
2.5. Bedeutung lokaler Strukturregionen für die Stabilität und den Entfaltungsprozess	24
<b>3. Proteasen</b>	27
3.1. Klassifizierung von Proteasen	27
3.2. Proteasen <i>in vivo</i>	29
3.2.1. Intrazelluläre Proteasen	29
3.2.1.1. Proteasom	30
3.2.1.2. Caspasen und Calpaine	31
3.2.1.3. Cathepsine und lysosomaler Proteinabbau	31
3.2.2. Extrazelluläre Proteasen	33
3.3. Proteasen <i>in vitro</i>	35
3.3.1. Biotechnologische Nutzung von Proteasen	35
3.3.2. Proteasen zur biochemischen Charakterisierung von Proteinen	37
3.3.2.1. Proteinsequenzierung / peptide mapping	37
3.3.2.2. Lokalisierung flexibler Strukturbereiche	38
3.3.2.3. Subzelluläre Lokalisierung von Proteinen und Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen	40
<b>4. Ribonuclease A</b>	41
4.1. Ribonuclease A als Modellprotein	41
4.1.1. Faltung und Entfaltung von RNase A	43
4.1.2. Untersuchungen zur Stabilität und Faltung von Mitgliedern der RNase A-Superfamilie	45
4.1.3. Proteolysestudien zu RNase A	47
4.1.4. RNasen als Therapeutikum	48

<b>5. Zusammenfassung der Forschungsergebnisse zur Diskriminierung lokaler und globaler Strukturänderungen von Proteinen mittels Proteolyse am Beispiel von RNase A und RNase A-Varianten</b>	49
5.1. Quantifizierung der Proteolyseempfindlichkeit nativer Proteine	49
5.2. Einfluss von Modifizierungen der Primärstruktur auf die Proteolyseempfindlichkeit nativer Proteine	52
5.2.1. Erhöhung der Proteolyseresistenz durch Aminosäuresubstitutionen	52
5.2.2. Spezifische Abbaubarkeit von Proteinen durch Einführung von potenziellen Spaltstellen	53
5.2.3. Einfluss von Aminosäuremodifizierungen auf die Proteolyseempfindlichkeit	55
5.3. Limitierte Proteolyse zum Nachweis von Konformationsänderungen	55
5.3.1. Einfluss von Konformationsänderungen auf die proteolytische Fragmentierung	55
5.3.1.1. Proteolyse von RNase A unter thermischer Denaturierung	57
5.3.1.2. Proteolyse von RNase A unter GdnHCl-induzierter Denaturierung	58
5.3.1.3. Proteolyse von RNase A unter TFE-induzierter Denaturierung	59
5.3.1.4. Proteolyse von RNase B unter denaturierenden Bedingungen	60
5.3.2. Einfluss von Konformationsänderungen auf die Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse	62
5.4. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion	66
5.5. Einfluss von Strukturänderungen auf die Entfaltungsreaktion bzw. die Proteolyseempfindlichkeit unter denaturierenden Bedingungen	70
5.6. Auswirkung von Struktur- und Konformationsänderungen auf die Proteolyseempfindlichkeit von Proteinen <i>in vivo</i>	71
<b>6. Resümee</b>	77
<b>7. Literatur</b>	79
<b>8. Anhang</b>	94
8.1. Anmerkungen	94
8.2. Anlagen	98

## Abkürzungsverzeichnis

ASA	lösungsmittelzugängliche Oberfläche ( <i>solvens accessible surface area</i> )
BPTI	<i>bovine pancreatic trypsin inhibitor</i>
CD	Circulardichroismus
CFIS	<i>chain folding initiation site</i>
CMA	<i>chaperone-mediated autophagy</i>
CMP (2', 3' - bzw. 2',3'cCMP)	(2', 3' - bzw. 2',3' zyklisches) Cytidinmonosphat
Con A	Concanavalin A
D	Denaturans
[D] <sub>0,5</sub>	Denaturanskonzentration am Übergangsmittelpunkt
dmP	5',5'-dimethylprolin
EC	<i>Enzyme commission</i>
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GlcNAc	N-Acetylglucosaminrest
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
I	Intermediat, ggf. mit Index „N“ ( <i>native-like</i> )
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
Man	Mannosylrest
MS	Massenspektrometrie ( <i>mass spectrometry</i> )
N	nativer Zustand
Nip	Nipecotinsäure
NMR	Kernresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
P	Protease
P <sub>1</sub> , ..., P <sub>i</sub> , P <sub>1'</sub> , ..., P <sub>i'</sub>	Aminosäurereste im Substrat nach (Schechter and Berger 1967)
PPIase	Peptidylprolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase
RNase	Ribonuclease
RP	<i>reversed-phase</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
S <sub>1</sub> , ..., S <sub>i</sub> , S <sub>1'</sub> , ..., S <sub>i'</sub>	Substratbindungsstellen der Protease nach (Schechter and Berger 1967)
TFE	Trifluorethanol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	<i>transition state</i>
U	entfalteter Zustand
U <sub>s</sub> <sup>I</sup> , U <sub>s</sub> <sup>II</sup> , U <sub>m</sub> , U <sub>f</sub> , U <sub>vf</sub>	entfaltete Spezies von Ribonuclease A, die sich in der Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltungsreaktion unterscheiden
Xaa	beliebiger Aminosäurerest, ggf. mit Index, z.B. Xaa <sub>N</sub> für N-terminale Aminosäure

## Kinetische und thermodynamische Parameter sowie Konstanten

wiederkehrende Indices: f – Faltungsreaktion, u – Entfaltungsreaktion, N – natives Protein, U – entfaltetes Protein, (H<sub>2</sub>O) – in Abwesenheit von Denaturans, [D] – bei einer entsprechenden Denaturanskonzentration, m – am Wendepunkt der Übergangskurve (Übergangsmittelpunkt)

A	Messsignal der Proteinkonzentration, ggf. mit Index (0 – zum Zeitpunkt $t=0$ , $t$ – zum Zeitpunkt $t$ )
$C_p$	molare Wärmekapazität
$\Delta C_p$	Differenz der molaren Wärmekapazitäten des entfalteteten und des nativen Proteins
$\Phi_f$	Phi-Wert (Jackson <i>et al.</i> 1993; Fersht 2000)
$f_N$	Anteil an nativem Protein im Gleichgewicht
G	freie Enthalpie
$\Delta G$	Differenz der freien Enthalpien des entfalteteten und des nativen Proteins, ggf. mit Index (0 – unter Standardbedingungen, 0' – unter biochemischen Standardbedingungen)
$\Delta G^\ddagger$	freie Reaktionsenthalpie der Faltungs- (f) bzw. Entfaltungsreaktion (u)
$h$	Plancksches Wirkungsquantum ( $\approx 6,626 \times 10^{-34}$ J s)
H	Enthalpie
$\Delta H$	Differenz der Enthalpien des entfalteteten und des nativen Proteins
$\Delta H^\ddagger$	Reaktionsenthalpie
k	Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion, ggf. mit Index (f – Faltung, u – Entfaltung, obs – beobachtbar, p – Proteolyse, int – intrinsisch, op – <i>opening</i> , cl – <i>closing</i> , cat – Katalyseschritt)
K	Gleichgewichtskonstante, ggf. mit Index (M – Michaelis-Menten-Konstante, op – für eine Öffnungsreaktion)
$k_B$	Boltzmann-Konstante ( $\approx 1,38 \times 10^{-23}$ J K <sup>-1</sup> )
$\kappa$	Transmissionskoeffizient
m	Anstieg, ggf. mit Index (N bzw. U – Anstieg der Basislinie des nativen bzw. des entfalteteten Proteins in der Übergangskurve, f bzw. u – Anstieg des Faltungs- bzw. Entfaltungsastes im <i>chevron plot</i> , $\Delta G$ – Anstieg der $\Delta G$ vs. [D]-Kurve, ‡ – Anstieg der $\Delta G^\ddagger$ vs. [D]-Kurve)
R	universelle Gaskonstante (8,314472 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
S	Entropie
$\Delta S$	Differenz der Entropien des entfalteteten und des nativen Proteins
$\Delta S^\ddagger$	Reaktionsentropie
t	Zeit
T	Temperatur
v	Reaktionsgeschwindigkeit
y	Messsignal, ggf. mit Index (N – für das native Protein, U – für das entfaltetete Protein, 0 – in Abwesenheit von Denaturans bzw. bei 0 K)

Aminosäuren werden im Drei- bzw. Einbuchstabencode angegeben. Im Text verwendete Anglizismen und lateinische Begriffe sind kursiv kenntlich gemacht. Teilweise sind diese Begriffe Bestandteil der deutschen Fachsprache in zusammengesetzten Wörtern und sind in diesen ebenfalls durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

Die mit (Anlage A) angegebenen Referenzen befinden sich im Kapitel 8.2

# 1 Einleitung

Proteine (aus dem Griechischen *proteios* = von herausragender Bedeutung, begrifflich 1839 von Gerardus Johannes Mulder eingeführt), auch als Eiweiße bezeichnet, gewinnen in der menschlichen Gesellschaft immer mehr an Bedeutung. Während historisch gesehen Proteine v.a. als Nahrungsmittel – der menschliche Organismus kann einige, so genannte essentielle Aminosäuren nicht selbst synthetisieren und ist auf eine Aufnahme derselben über die Nahrung angewiesen – oder Wertstoffe (z.B. Seide) dienen, kommt ihnen in der jüngeren Geschichte eine wachsende Bedeutung als Werkzeuge in der Biotechnologie zu. Vielfältige Applikationen von Enzymen, d.h. von Proteinen, die in der Lage sind, chemische Reaktionen zu katalysieren, führen zu beträchtlichen Stoff- und damit verbundenen finanziellen Umsätzen ([www.europabio.org/](http://www.europabio.org/), [www.dib.org/](http://www.dib.org/)).<sup>Ann. 1\*</sup> Außerdem wurde eine Vielzahl von Proteinen als Verursacher von Krankheiten erkannt, andere werden hingegen als Therapeutika in der Medizin eingesetzt.

Nicht nur *in vivo* unterliegen Proteine einem Synthese–Abbau–Kreislauf, auch beim Einsatz von Enzymen für biotechnologische Verfahren kommt es häufig durch Reaktionsbedingungen, die jenseits der Toleranzgrenze liegen, zur Inaktivierung, die normalerweise mit einer strukturellen Reorganisation verbunden ist. Daher ist es von großem (akademischen, ökonomischen und medizinischen) Interesse, die Mechanismen, die dem Inaktivierungsprozess von Proteinen zugrunde liegen, zu ergründen. In jüngerer Zeit rückten scheinbar ungeordnete Segmente der Proteinmoleküle verstärkt in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen, da zahlreiche Studien ihre herausragende Rolle für die biologische Funktion der Proteine, aber auch für ihre Stabilität angezeigt haben. Obwohl Faltungsprozesse Proteinen erst das Erlangen ihrer nativen Konformation ermöglichen, stehen unter Anwendungsaspekten v.a. Entfaltungsprozesse im Fokus des Interesses, da sich an diese häufig irreversible Modifizierungsreaktionen wie z.B. chemische Modifizierungen, Aggregationen oder – bei nur teilgereinigten Enzymen, Zellextrakten oder ganzen Zellen – der proteolytische Abbau anschließen (Plaza del Pino *et al.* 2000). Die Analyse von Strukturen geringerer Ordnung und von Entfaltungsprozessen auf der submolekularen Ebene und noch dazu unter nativen oder nativähnlichen Bedingungen, wie sie *in vivo* vorliegen, entzieht sich jedoch den meisten konventionellen biophysikalischen

---

\* Anmerkungen finden sich im Kapitel 8.1

Messmethoden. Im Gegensatz zu diesen „markieren“ Proteasen flexible Bereiche der Proteinstruktur durch Hydrolyse der Peptidbindungen, was sie zu einem idealen Werkzeug für das Studium lokaler und globaler Entfaltungsprozesse macht.

In der vorliegenden Arbeit sind neben theoretischen Betrachtungen zu Aspekten der Proteinestabilität und zur Bedeutung und Nutzung von Proteasen meine eigenen Arbeiten sowie die Ergebnisse von Arbeiten von Diplomanden und Doktoranden, die unter meiner Betreuung entstanden sind, zum Thema „Limitierte Proteolyse zur Analyse lokaler und globaler Änderungen der Proteinstruktur am Beispiel von Ribonucleasen“ zusammengefasst.

## 2 Proteinestabilität und Proteinfaltung

### 2.1 Proteindenaturierung

*In vivo* erfolgt die Proteinsynthese während der Translation an den Ribosomen im Zytosol der Zellen. Wie jedoch die synthetisierten Polypeptidketten ihre native Konformation erreichen, ist noch weitgehend unverstanden. Die Gesamtkonzentration an Makromolekülen in der Zelle beträgt ungefähr  $350 \text{ mg ml}^{-1}$  (Zimmerman and Minton 1993; Ellis 2001), ist also ähnlich der Konzentration von Proteinen in Kristallen. Damit Proteine unter diesen Bedingungen ohne proteolytischen Abbau oder Aggregation falten können, sind eine Vielzahl von Helferproteinen (molekulare Chaperone u.a.) vorhanden (Ellis 2001). Der Erhalt der biologischen Funktion von Proteinen ist eng an den Erhalt ihrer nativen dreidimensionalen Struktur, der Tertiärstruktur (bei oligomeren Proteinen auch der Quartärstruktur), gebunden, in der die relevanten Strukturbereiche (Aminosäureseitenketten und/oder Bereiche des Peptidrückgrats) in eine zur Ausübung der biologischen Funktion erforderlichen räumlichen Anordnung gebracht werden. Während die Information zur Erlangung der dreidimensionalen nativen Struktur in der Abfolge der Aminosäuren in der Polypeptidkette, d.h. in der Primärstruktur, enthalten ist („Faltungscodierung“, Anfinsen 1973), bestimmen die Milieubedingungen (Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, Konzentration von Liganden etc.) die Ausbildung bzw. den Erhalt der nativen Struktur. Diese wird zwar durch eine Vielzahl kovalenter und nicht-kovalenter Bindungen bzw. Wechselwirkungen stabilisiert, jedoch wirkt insbesondere der Entropieverlust (Einschränkung der Bewegungsfreiheit der entfalteten Polypeptidkette) dieser Strukturausbildung entgegen, so dass die Energiedifferenz zwischen nativem und entfaltetem Protein letztendlich mit  $20\text{--}60 \text{ kJ mol}^{-1}$  gering ist (Richards 1997).

Der Verlust der nativen räumlichen Anordnung der Polypeptidkette, d.h. der nativen Konformation, führt zum Verlust der biologischen Aktivität, ein Prozess, der als Denaturierung bezeichnet wird. Historisch gesehen beschrieb der Begriff der Denaturierung zunächst den Aktivitätsverlust und blieb damit auf Enzyme, d.h. Proteine, die in der Lage sind, chemische Reaktionen zu katalysieren, beschränkt. Später wurde eine Vielzahl von Prozessen mit dem Begriff „Denaturierung“ beschrieben, neben der Abnahme der Löslichkeit, d.h. der Aggregation, u.a. auch chemische Modifizierungen und das Lösen bzw. Neuknüpfen kovalenter Bindungen (Kauzmann 1959). Da die meisten dieser detektierbaren Veränderungen jedoch eher eine Folge des Verlusts der nativen Struktur sind und nicht den Prozess des Verlierens direkt beschreiben, wurde von C. Tanford begrifflich definiert, dass Denaturierung als ein „... major change from the original native structure, without alteration of the amino acid sequence, *i.e.*, without severance of any of the primary chemical bonds ...“ zu verstehen ist (Tanford 1968), d.h. eine durch äußere Einflüsse hervorgerufene Änderung der Quartär-, Tertiär- und/oder Sekundärstruktur durch Zerstörung der nativen nicht-kovalenten Wechselwirkungen und Bindungen ohne Veränderungen der Primärstruktur oder kovalenter Bindungen. Denaturierungen können dabei reversibel, d.h. umkehrbar („Renaturierung“), oder irreversibel ablaufen; der letztere Prozess wird häufig durch Koagulation oder Aggregation verursacht. Der Begriff der Entfaltung beschreibt ebenso den Prozess der Denaturierung, wobei hier auch – bezogen auf das Proteinmolekül – lokale, d.h. räumlich begrenzte, und globale, d.h. das gesamte Proteinmolekül betreffende, Prozesse unterschieden werden. Steht der Verlust der biologischen Aktivität im Fokus der Betrachtungen, so spricht man genauer von Inaktivierung. Da die biologische Funktion meist nur durch wenige Aminosäuren im Proteinmolekül (aktives Zentrum) vermittelt wird, ist es möglich, dass die Inaktivierung und lokale Entfaltungsereignisse nicht zusammenfallen. Betreffen letztere nicht das aktive Zentrum, so kann das lokal entfaltete Proteinmolekül noch voll oder zumindest partiell aktiv sein. Andererseits ist gerade für eine effiziente Katalyse eine sehr genaue räumliche Anordnung der funktionellen Gruppen im Proteinmolekül erforderlich, so dass häufig eine Inaktivierung (unter nicht-nativen Bedingungen) beobachtet wird, bevor eine Denaturierung im obigen Sinn z.B. mittels spektroskopischer Methoden detektiert werden kann.

## 2.2 Modelle der Proteinfaltung

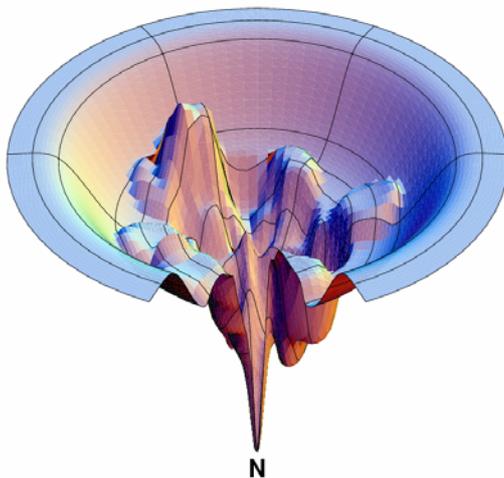
Da die Entfaltung der Polypeptidkette unter nicht-nativen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, Dielektrizitätskonstante, Detergenzien, Grenzflächen) spontan abläuft, ist an und für sich zu erwarten, dass auch die Faltung der entfalteten Polypeptidkette zur nativen Konformation spontan erfolgen sollte. Da der „Faltungscode“ nach Anfinsen eher thermodynamischer Natur ist (Yon 2002), d.h. das Gleichgewicht zwischen nativem und entfaltetem Zustand betrifft (s.u.), beschreibt er nicht oder nur unzureichend die Kinetik und Art und Weise der Proteinfaltung. Die zufällige „Suche“ der entfalteten Polypeptidkette nach der nativen Konformation würde jedoch aufgrund der möglichen Anordnungen der Polypeptidkette eine viel zu große Zeit in Anspruch nehmen, so dass eine „gesteuerte Faltung“ (*guided protein folding*) postuliert wurde (Levinthal 1968). Dass eine Polypeptidkette tatsächlich in der Lage ist, spontan die native Konformation anzunehmen, wurde durch Anfinsen am Beispiel der Ribonuclease A aus Rinderpancreas (RNase A) gezeigt (Anfinsen *et al.* 1961). Dabei bildete sich aus (mittels  $\beta$ -Mercaptoethanol und 8 M Harnstoff) denaturierter RNase A (in Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)–HCl-Puffer, pH 8,2) unter Luftzufuhr aktive, durch spektroskopische Methoden vom Ausgangsprodukt nicht unterscheidbare RNase A, was bedeutet, dass die Information zur Ausbildung in der Polypeptidkette enthalten ist. Dabei faltete nicht nur die Polypeptidkette in ihre native Konformation sondern es wurden auch die vier Disulfidbrücken vollständig und in ihrer korrekten Anordnung ausgebildet.

Die anfängliche Vorstellung zur Energetik des komplexen Prozesses der Proteinfaltung (dem nativen = energieärmsten Zustand steht der energiereiche entfaltete Zustand gegenüber) und zu deren sequenziellem und hierarchischem Ablauf hat sich im Lauf der Zeit deutlich geändert und für die o.g. „gesteuerte Faltung“ wurden verschiedene Modelle entwickelt:

- Klassische Nukleation („Kernbildung“): Benachbarte Reste der Sequenz bilden zuerst native Sekundärstrukturen, die als Nukleus dienen und von denen aus die Strukturbildung voranschreitet.
- Nukleation/Kondensation: In der Aminosäuresequenz voneinander entfernte Reste bilden einen lockeren Nukleus, von dem aus die Strukturbildung voranschreitet und der im Zug der Strukturbildung selbst erst „verfestigt“ wird.
- Rahmen-, Diffusions-/Kollisions-, *chain folding initiation site-* (CFIS) Mechanismus: Es kommt anfänglich zur lokalen Ausbildung nativer Sekundärstrukturen (Intermediate),

die nachfolgend zur Tertiärstruktur verschmelzen (als Beispiel für CFIS sei hier RNase A genannt; Rabow and Scheraga 1993; Wedemeyer *et al.* 2002).

- hydrophober Kollaps: Ausgangspunkt ist eine schnelle Kollabierung der Polypeptidkette durch Zusammenlagerung der hydrophoben Seitenketten, die im nativen Proteinmolekül im Inneren verborgen sind (Intermediate). Die Umordnung zur nativen Tertiärstruktur erfolgt aus den Intermediaten (als Beispiel sei hier Barstar, der intrazelluläre Inhibitor der Barnase genannten RNase aus *Bacillus liquefaciens* erwähnt; Nölting *et al.* 1997).
- Puzzle (*jigsaw*): Es existiert kein bevorzugter Faltungsweg, d.h., jedes Molekül faltet nach einem individuellen Muster.
- Faltungstrichter (*folding funnel*, Abb. 1): Die Faltung beginnt aus einem Ensemble entfalteter Proteinmoleküle heraus über parallele Wege (Intermediate) in einer „Energielandschaft“; der Übergangszustand ist ein Ensemble an Strukturen. Dieses gegenüber den hierarchischen Modellen als *new view* bezeichnete Modell erweitert jene durch eine größere Zahl energetisch möglicher Faltungswege, schränkt aber das sehr freie Puzzlemodell wieder etwas ein.



**Abb. 1:** Energielandschaft nach dem *new view* (*folding funnel*; Dill and Chan 1997). Dabei wird die Enthalpie des Proteins gegen die Entropie der Polypeptidkette aufgetragen, was anzeigt, dass sich die Faltung zum nativen Zustand (N) auf Kosten der Entropie (geringe Freiheit) vollzieht. *In vivo*-Bedingungen (Clark 2004) bleiben dabei unberücksichtigt.

Für eine Vielzahl v.a. kleiner Proteine, die nach einem so genannten Zweizustandsmodell, d.h. ohne detektierbare Intermediate, falten (*two-state folder*), besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Kontaktordnung (*contact order*), d.h. dem Abstand von im nativen Proteinmolekül in Kontakt stehender Aminosäurereste, und ihrer Faltungsgeschwindigkeit. Da Aminosäurereste in  $\alpha$ -Helices eine höhere Kontaktordnung als in  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufweisen wird bei helikalen Proteinen häufig eine höhere Geschwindigkeitskonstante der Faltungsreaktion ( $k_f$ ) detektiert (Dobson *et al.* 1998; Plaxco *et al.* 1998). Disulfidbrücken, die eventuell im Protein ausgebildet sind, können durch eine entropische Destabilisierung des entfalteten Proteins Abweichungen von der obigen Regel

hervorrufen. Mit zunehmender Größe der Proteine steigt im Normalfall auch die Komplexität des Faltungsgeschehens. Die Existenz hoher, v.a. enthalpisch bedingter Energiebarrieren führt zur Akkumulation partiell gefalteter Spezies (Intermediate) und die Notwendigkeit der Überwindung der Barrieren im Zuge der Reorganisation führt zu einer Verlangsamung der Proteinfaltung. Für die Untersuchung von Faltungsprozessen (*protein folding problem*) werden daher vorwiegend kleine Eindomänenproteine wie z.B. RNase A, Barstar, Lysozym, Tendamistat oder der Chymotrypsininhibitor 2 verwendet.

### 2.3 Thermodynamische Stabilität

Die thermodynamische Stabilität beschreibt die Energiedifferenz zwischen dem Protein im nativen, gefalteten (N) und denaturierten, entfalteten Zustand (U, von *unfolded*), wobei N strukturell relativ homogen, U hingegen sehr heterogen ist. Aufgrund nur geringer Energiebarrieren können sich die verschiedenen entfalteten Spezies schnell ineinander umwandeln, wobei die Geschwindigkeitskonstanten der Rotation um die Bindungsachsen und der globalen Fluktuationen mit ca.  $10^{11} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $10^6 \text{ s}^{-1}$  den im Levinthal-Paradox zugrunde gelegten Werten entsprechen (Dobson *et al.* 1998; Dobson 2000). Die Energiedifferenzen zwischen N und U können experimentell durch temperatur-, druck- oder chemisch induzierte Entfaltung nativer Proteine bestimmt werden. Die Vorstellungen zum Mechanismus der denaturierenden Wirkung chemischer Denaturanzien (Bindung an die Polypeptidkette, wodurch es zur Störung der intramolekularen Wechselwirkung kommt) wurden v.a. durch die Arbeiten von Schellman geprägt (Schellman 2002); die erforderlichen Gleichungen zur Auswertung der experimentell erhaltenen Daten wurden von verschiedenen Autoren ent- und weiterentwickelt (Santoro and Bolen 1988; Clarke and Fersht 1993; Pace *et al.* 1998). Grundlage der Betrachtungen ist die Freie Enthalpie (G, früher auch als GIBBS-Energie bezeichnet, engl. *free GIBBS energy*). Diese setzt sich aus einem enthalpischen (H) und einem entropischen Term (T·S) zusammen:

$$G = H - T \cdot S \quad (1)$$

Da diese Werte jedoch nicht als Absolutwerte sondern nur als Differenzen experimentell bestimmt werden können gilt

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

Für chemische Reaktionen der allgemeinen Form



gilt, dass die Freie Enthalpie des gesamten Systems gleich der Freie Enthalpien der Produkte abzüglich der Freie Enthalpien der Ausgangsstoffe ist. Somit gilt

$$\Delta G = \Delta G^0 - R \cdot T \cdot \ln \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} \quad (4)$$

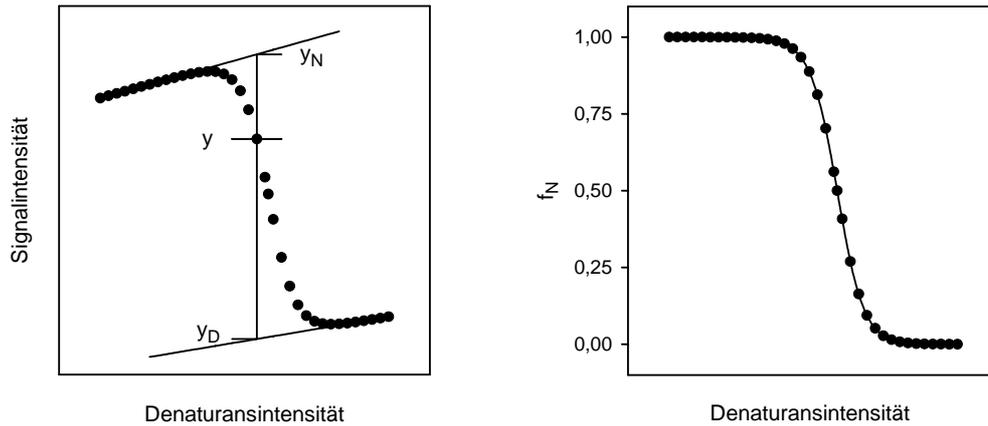
wobei  $\Delta G^0$  die Freie Enthalpie unter Standardbedingungen darstellt,  $R$  die universelle Gaskonstante ( $8,3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) und  $T$  die absolute Temperatur.<sup>Anm. 2</sup> Da im Gleichgewicht die Änderungen der Freien Reaktionsenthalpien der Hinreaktion gleich denen der Rückreaktion sind, ist  $\Delta G = 0$  und somit

$$\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln K \quad (5)$$

wobei  $K$  die Gleichgewichtskonstante der obigen Reaktion darstellt. Da bei Berechnungen zur thermodynamischen Stabilität jedoch immer Gleichgewichtszustände betrachtet werden, soll aus Gründen der Übersichtlichkeit in der vorliegenden Arbeit – wie allgemein üblich – auf den Index „<sup>0</sup>“ (bzw. „<sup>0</sup>“, s. Anm. 2) verzichtet werden.

Die Beschreibung der Entfaltung von kleinen Proteinen im Gleichgewicht nach dem so genannten Zweizustandsmodell ist oftmals möglich (Gl. 6; *n.b.*, es handelt sich hierbei um zwei thermodynamisch deutlich verschiedene Zustände, die jeweils makroskopisch einen Durchschnittswert mikroskopisch ähnlicher Zustände darstellen). Das Auftreten kinetischer Intermediate steht, wenn diese thermodynamisch instabil sind und daher nicht messbar populiert werden, nicht zu dem Zweizustandsmodell im Widerspruch. Kriterien zur Anwendbarkeit des Zweizustandsmodells wurden bereits von Lumry *et al.* (Lumry and Biltonen 1966) zusammengefasst und beziehen sich v.a. auf die Kongruenz der Änderung unterschiedlicher optischer Eigenschaften der Proteine (Nah- bzw. Fern-UV-Circulardichroismus (CD), Fluoreszenz, Absorption) während der Entfaltung (Abb. 2).





**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Signaländerung eines Proteins in Abhängigkeit von der Denaturansintensität (links) und die mit Hilfe der Gl. 7 oder 10 und  $f_N = (y - y_D) / (y_N - y_D)$  daraus ermittelten  $f_N$ -Werte (rechts).

Für die Auswertung von Daten zur thermischen Denaturierung verwendet man nach Pace *et al.* (Pace *et al.* 1998) Gl. 7

$$y = \frac{(y_N^0 + m_N \cdot T) - (y_U^0 + m_U \cdot T) \cdot \exp\left(\frac{\Delta H_m}{R \cdot T} \cdot \frac{T - T_m}{T_m}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_m}{R \cdot T} \cdot \frac{T - T_m}{T_m}\right)} \quad (7)$$

wobei  $y$  das Messsignal,  $y_N^0$  und  $y_D^0$  die (extrapolierten) Messsignale des nativen bzw. entfaltenen Proteins bei 0 K,  $m_N$  und  $m_U$  die Anstiege der linearen Signaländerungen im prä- bzw. posttransitionalen Bereich,  $T_m$  die Temperatur am Übergangsmittelpunkt (Wendepunkt) und  $\Delta H_m$  die Differenz der Enthalpien von entfaltetem und nativem Protein bei  $T_m$  (van't Hoff-Enthalpie) darstellen. Eine alternative Darstellung zur Bestimmung von  $\Delta H_m$  und  $T_m$  bietet die so genannte van't Hoff-Darstellung, bei der  $\ln K$  gegen  $1/T$  aufgetragen wird. Aus der Übergangskurve wird hierfür aus dem Verhältnis von [U] und [N] nach  $f_N = [N] / ([N] + [D])$  der Anteil an nativem Protein berechnet und daraus mit  $K = (1 - f_N) / f_N$  die Gleichgewichtskonstante als Funktion der Temperatur. Aus (2) und (6) ergibt sich die van't Hoff-Gleichung

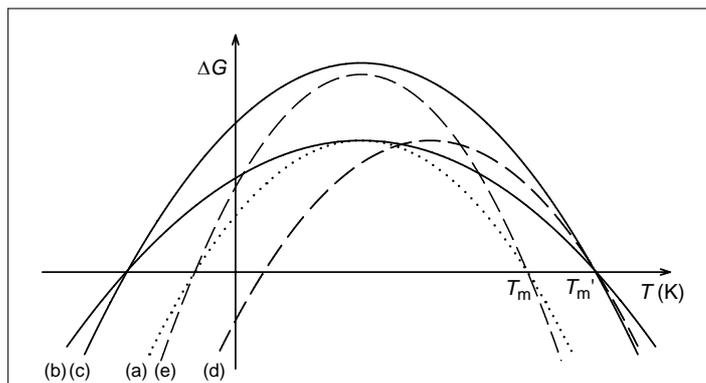
$$\ln K = -\Delta H_m / (R \cdot T) + \Delta S / R \quad (8)$$

aus der am Übergangsmittelpunkt ( $[U] = [N]$  und daraus folgend  $K = 1$  bzw.  $\ln K = 0$ )  $\Delta H_m$  bzw.  $T_m$  ermittelt werden kann. Mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung

$$\Delta G = \Delta H_m \cdot (1 - T / T_m) - \Delta C_p \cdot \{(T_m - T) + T \cdot \ln(T / T_m)\} \quad (9)$$

bei der  $\Delta C_p$  die molare Wärmekapazitätsänderung, d.h. die Differenz der molaren Wärmekapazitäten des entfalteten und des nativen Proteins, bezeichnet, kann man  $\Delta G$  bei einer beliebigen Temperatur berechnen. Dazu benötigt man jedoch noch den Wert für  $\Delta C_p$ , der mittels Differential Scanning Calorimetry oder durch die Aufnahme chemisch induzierter Übergangskurven bei verschiedenen Temperaturen (Pace and Laurents 1989) bestimmt werden kann. Aus mittels Differential Scanning Calorimetry ermittelten Übergangskurven kann neben  $\Delta C_p$  die Enthalpie  $\Delta H$  (mit dem Index „cal“ für „kalorimetrisch“) ermittelt werden; die Übereinstimmung von  $\Delta H_{\text{cal}}$  und  $\Delta H_m$  ist ein hinreichendes Kriterium für einen Zweizustandsprozess der Proteinfaltung (Jackson and Fersht 1991). Da die Wärmekapazität der entfalteten Polypeptidkette größer als die des nativen Proteins ist, ist  $\Delta C_p$  positiv und kann mit etwa  $50 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  pro Aminosäurerest abgeschätzt werden (Makhatadze and Privalov 1990).

Für den Verlauf von  $\Delta G$  vs.  $T$  ergibt sich eine Kurve (Abb. 3), aus der erkennbar ist, dass Proteine auch bei niedrigen Temperaturen denaturieren (Kältedenaturierung); eine Stabilitäts-erhöhung ist entsprechend Abb. 3 durch eine Erhöhung von  $T_m$  und/oder  $\Delta H_m$  und/oder durch eine Verringerung von  $\Delta C_p$  möglich, was zu einer Verschiebung der Kurve zu höheren Temperaturen und zu größeren  $\Delta G$ -Werten bzw. zu einer Abflachung der Kurve führt.



**Abb. 3:** Abhängigkeit der Freien Enthalpie eines fiktiven Proteins von der Temperatur (a). Eine Erhöhung der Stabilität ( $\Delta G$ ) ist durch eine Verringerung von  $\Delta C_p$  (b) oder eine Erhöhung von  $T_m$  ( $T_m'$ ; c) möglich. Zudem ist eine Verschiebung von  $T_m$  (nach  $T_m'$ ) möglich (d), wobei jedoch die Kältedenaturierung bereits bei höheren Temperaturen als bei (a) einsetzt. Eine Erhöhung von  $\Delta H_m$  führt zur Erhöhung von  $\Delta G$ , ohne dass  $T_m$  verändert wird (e). Nach (Vieille and Zeikus 2001).

Aufgrund der nicht selten auftretenden Aggregationsanfälligkeit von Proteinen bei erhöhten Temperaturen und der Unsicherheiten bei der Krümmung der  $\Delta G$  vs.  $T$ -Kurve wird häufig

eine Bestimmung der Werte für  $\Delta G^{(H_2O)}$ , d.h. für  $\Delta G$  in Abwesenheit von Denaturans, aus chemisch induzierten Übergangskurven bevorzugt (*n.b.*, der Index „H<sub>2</sub>O“ ist für das Anzeigen der Abwesenheit von Denaturans üblich, jedoch nicht korrekt, da er ein quasi ungepuffertes System bei pH 7 suggeriert). Hierbei wird aus der linearen Abhängigkeit von  $\Delta G$  von der Denaturanskonzentration ([D]) im Übergangsbereich (*transition zone*) linear auf  $\Delta G$  in Abwesenheit von Denaturans extrapoliert (Greene and Pace 1974, *linear extrapolation method, linear free energy model*). Jedoch gibt es auch einige Fälle, bei denen die auf diese Weise ermittelten  $\Delta G^{(H_2O)}$ -Werte für verschiedene Denaturanzien voneinander abweichen, da es zu zusätzlichen Interaktionen zwischen bestimmten Denaturanzien und dem Protein kommen kann, was zu einer Krümmung der  $\Delta G$  vs. [D]-Kurve führt (*binding model of denaturation*; Tanford 1970; Schellman 1994; 2002). Für die Auswertung von Daten aus chemisch induzierten Übergangskurven verwendet man die durch Clarke und Fersht (Clarke and Fersht 1993) mit  $\Delta G^{[D]} = m_{\Delta G} \cdot ([D]_{0,5} - [D])$  modifizierte Gleichung von Santoro und Bolen (Santoro and Bolen 1988)

$$y = \frac{(y_N^0 + m_N[D]) + (y_U^0 + m_U[D]) \cdot \exp\left(\frac{-m_{\Delta G}([D]_{0,5} - [D])}{R \cdot T}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-m_{\Delta G}([D]_{0,5} - [D])}{R \cdot T}\right)} \quad (10)$$

wobei  $m_{\Delta G}$ , welches proportional zur Änderung der solvenszugänglichen Oberfläche des Proteins unter nativen und Entfaltungsbedingungen ist (Bieri and Kiefhaber 2000), die Abhängigkeit von  $\Delta G$  von [D] und damit ein Maß der Kooperativität darstellt;  $\Delta G^{[D]}$  ist  $\Delta G$  bei einer bestimmten Denaturanskonzentration und  $[D]_{0,5}$  die Denaturanskonzentration am Wendepunkt der Übergangskurve, d.h. die Denaturanskonzentration, bei der  $[U] = [N]$  und daher  $f_N = 0,5$  ( $f_N = (y - y_D) / (y_N - y_D)$ ).

## 2.4 Proteinfaltung

### 2.4.1 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und der Freien

#### Aktivierungsenthalpie

$\Delta G < 0$  ist jedoch noch keine Garantie dafür, dass eine Reaktion spontan mit einer messbaren Geschwindigkeit abläuft. Die Geschwindigkeit hängt vom Mechanismus des Prozesses, d.h. von der zu überwindenden Energiebarriere zwischen Anfangs- und Endzustand, ab. Die Geschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zur Freien Aktivierungsenthalpie der Reaktion, d.h. der Energiedifferenz zwischen dem Übergangszustand der Reaktion (TS, *transition state*) und dem jeweiligen Ausgangszustand. Bezogen auf die Protein(ent)faltung

bedeutet dies, dass thermodynamisch stabile Proteine durchaus kinetisch instabil sein können, was insbesondere *in vivo* für irreversible Folgereaktionen von Bedeutung ist. Andererseits können aber auch thermodynamisch instabile Proteine kinetisch so stabil sein, dass ihre thermodynamische Instabilität nicht zum Tragen kommt (Truhlar and Agard 2005). Der Faltungs- bzw. Entfaltungsprozess von Proteinen ist mit weit reichenden strukturellen Veränderungen verbunden, wobei der Übergangszustand meistens als strukturell nahe dem nativen Zustand betrachtet wird (Oliveberg *et al.* 1998; Otzen *et al.* 1999). Aufgrund der unter 2.2 ausgeführten Vorstellungen zur Proteinfaltung und den damit verbundenen multiplen (parallelen) Wegen vor allem vom entfalteten zum nativen Protein stellt der Übergangszustand ein Ensemble von ähnlichen Strukturen dar. Bei der Entfaltung stellt (aufgrund der strukturellen Nähe des Übergangszustands zum nativen Zustand und der Instabilität eventuell auftretender Intermediate unter denaturierenden Bedingungen) der N→TS-Schritt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar und daher werden Entfaltungsintermediate selten beobachtet werden. Bei der Faltung hingegen können Intermediate leichter populiert werden, da z.B. bei der Reorganisation lokal gebildeter (Sekundär-)Strukturen signifikante Energiebarrieren überwunden werden müssen. Nichtsdestotrotz gilt das Prinzip der mikroskopischen Reversibilität, d.h. in beiden „Richtungen“ werden die selben Intermediate durchlaufen; ihre Akkumulation und damit ihr Nachweis hängt jedoch von den geschwindigkeitsbestimmenden Schritten, d.h. von den Geschwindigkeitskonstanten ihrer Bildungs- und Zerfallsreaktion, ab. Bei einer Anzahl von Proteinen konnte die Bildung von Sekundärstrukturen in frühen Faltungsphasen detektiert werden.<sup>Anm. 3</sup>

Da sich der native und der entfaltete Zustand eines Proteins normalerweise u.a. in den o.g. spektroskopischen Eigenschaften sowie in der Flexibilität und der Solvenz Zugänglichkeit des Polypeptidrückgrats bzw. der Seitenketten der Aminosäurereste (*solvens accessible surface area*, ASA) unterscheiden, ist es möglich, die Umwandlung der Zustände ineinander bzw. in Intermediate zeitlich zu verfolgen. Die unterschiedliche Zugänglichkeit z.B. hat zur Folge, dass die Amidprotonen der Peptidbindungen unter nativen bzw. Entfaltungsbedingungen unterschiedlich schnell mit den Solvensprotonen austauschen (unter nativen Bedingungen sind viele Amidprotonen in Sekundärstrukturelemente eingebunden), was mittels Kernresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) verfolgt werden kann und quantitativ durch den *protection factor* beschrieben wird (Perrett *et al.* 1995). Die Unterschiede werden auch in dem *quench-flow* genannten Verfahren ausgenutzt, durch das mittels *pulse labeling* strukturelle Informationen über die transient auftretenden Intermediate erhalten werden (Baldwin 1993; Bai *et al.* 1995; Englander 2000). Die Unterschiede in der

Lösungsmittelzugänglichkeit und Flexibilität der beiden Zustände beeinflusst ebenso die proteolytische Angreifbarkeit. Native Proteine sind aufgrund der eingeschränkten Flexibilität der Polypeptidkette und der verminderten Zugänglichkeit der Peptidbindungen häufig wesentlich resistenter gegenüber Proteasen als im denaturierten Zustand (Price and Johnson 1990; Hubbard 1998; Fontana *et al.* 2004). Diese Unterschiede können sowohl für *pulse*-Experimente (Lang and Schmid 1986) zur Identifizierung (un)geschützter Bereiche und Verfolgung der Proteinfaltung als auch (kontinuierlich) zur Charakterisierung der Proteinfaltung genutzt werden (Imoto *et al.* 1986). Die Vorteile der Proteolyse für derartige Experimente liegen gegenüber spektroskopischen Methoden in der Charakterisierung der Ereignisse auf submolekularer Ebene, d.h. auf der Ebene einzelner Aminosäurereste, und der Verfolgbarkeit von Änderungen im prä- (und ggf. auch im post-)transitionalen Bereich. Generelle Vorteile liegen v.a. in der geringen erforderlichen Proteinmenge und -konzentration sowie in der einfachen apparativen Ausstattung.

Die kinetischen Übergänge von Eindomänenproteinen, die durch eine schnelle Änderung der Bedingungen (Temperatur- oder Denaturationskonzentrationsprung) von einem Zustand in einen anderen (z.B. N→U, U→N, U→I oder I→N, wobei I für Intermediat steht) werden üblicherweise nach einer Folge von Reaktionen 1. Ordnung ausgewertet, wobei auch parallele Reaktionen möglich sind. Die dabei erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden dienen als Grundlage zur Ermittlung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten. Für echte *two-state folder* (für Beispiele s. Jackson 1998) stellen die aus der beobachteten Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  ermittelbaren Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungs- ( $k_u$ ) bzw. Faltungsreaktion ( $k_f$ ) die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten dar (Bieri and Kiefhaber 2000); im Gleichgewicht gilt  $k_f \cdot [U] = k_u \cdot [N]$ , so dass neben  $K = [U]/[N]$  auch  $K = k_u/k_f$  gilt. Allerdings können auch bei Proteinen, die sich thermodynamisch wie *two-state folder* verhalten, transiente Intermediate auftreten, wobei bei einem kinetisch homogenen entfalteten Zustand die Anzahl kinetischer Spezies stets um 1 größer als die Zahl der beobachtbaren kinetischen Phasen ist. Die Anwendung der Abhandlungen zum Übergangszustand chemischer Reaktionen nach Eyring (*transition state theory*, Eyring 1935) auf die Problematik der Proteinfaltung liefert für die einzelnen Reaktionen (aus Gründen der Allgemeingültigkeit für alle Schritte wird auf die Indizes für die entsprechenden Reaktionen hier verzichtet)

$$\frac{k}{T} = \frac{\kappa \cdot k_B}{h} \cdot \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{R \cdot T}\right) \quad \text{bzw.} \quad \ln \frac{k}{T} = \ln \frac{\kappa \cdot k_B}{h} + \Delta S^\ddagger / R - \Delta H^\ddagger / (R \cdot T) \quad (11)$$

wobei  $k_B$  die Boltzmann-Konstante,  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum und  $\Delta G^\ddagger$  die Freie Aktivierungsenthalpie, d.h. die Differenz zwischen den Freien Enthalpien des Ausgangs- und des Übergangszustands, darstellen.  $\kappa$  ist der Transmissionskoeffizient, der die Wahrscheinlichkeit des Übergangszustands, zum Produkt weiter zu reagieren (und nicht zu Edukt zurück), beschreibt, und beträgt  $0 \leq \kappa \leq 1$  (<http://goldbook.iupac.org/>). Bei Proteinen kommt es aufgrund der Temperaturabhängigkeit von hydrophoben Wechselwirkungen bzw. aufgrund der Unterschiede in der molaren Wärmekapazität zwischen N, TS und U zu einer meist geringfügigen Abweichung von der Linearität in der  $\ln(k_u/T)$  vs.  $1/T$ -Auftragung (Eyring-Auftragung), jedoch zu einer deutlichen Abweichung für  $\ln(k_f/T)$  vs.  $1/T$  (Chen *et al.* 1989; Oliveberg *et al.* 1995; Dill and Chan 1997).<sup>Anm. 4</sup>

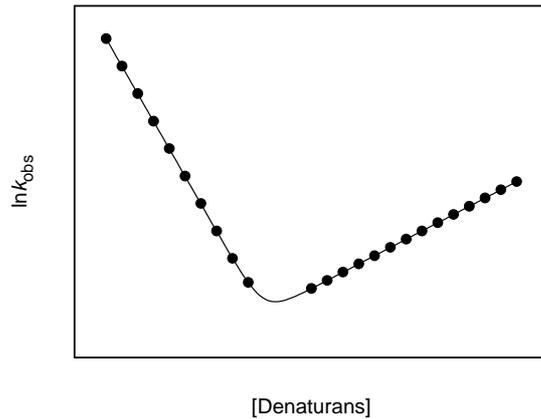
Genauso wie  $\Delta G$  eines Proteins linear von der Konzentration chemischer Denaturanzien abhängt (Schellman 2002 und Zitate darin), ändern sich auch die Freien Aktivierungsenthalpien linear mit der Denaturanskonzentration:

$$\Delta G^{\ddagger[D]} = \Delta G^{\ddagger(H_2O)} + m^\ddagger \cdot [D] \quad (12)$$

wobei  $\Delta G^{\ddagger[D]}$  und  $\Delta G^{\ddagger(H_2O)}$  die Freie Aktivierungsenthalpie bei einer bestimmten Denaturanskonzentration bzw. in Abwesenheit von Denaturans und  $m^\ddagger$  den Anstieg, der wiederum der Änderung der solvenszugänglichen Oberfläche zwischen Ausgangs- und Übergangszustand proportional ist, darstellen. Aus (12) folgt, dass sich – in logarithmischer Darstellung und bei konstanter Temperatur – auch die Geschwindigkeitskonstanten der entsprechenden Reaktionen linear mit der Denaturanskonzentration ändern:

$$\ln k^{[D]} = \ln k^{(H_2O)} + m^\ddagger \cdot [D]/(R \cdot T) \quad (13)$$

wobei  $k^{[D]}$  und  $k^{(H_2O)}$  die Geschwindigkeitskonstanten bei einer bestimmten Denaturanskonzentration bzw. in Abwesenheit von Denaturans darstellen. Die Auftragung  $\ln k_{\text{obs}}$  vs.  $[D]$  liefert einen so genannten *chevron plot* mit normalerweise linearen „Faltungs-“ und „Entfaltungsästen“ (Abb. 4). Der Vergleich kinetischer und thermodynamischer Daten ist eine weitere Möglichkeit, Proteine hinsichtlich der Anwendbarkeit des Zweizustandsmodells zu überprüfen (Jackson and Fersht 1991). Da  $\Delta G^{(H_2O)} = \Delta G_u^{\ddagger(H_2O)} - \Delta G_f^{\ddagger(H_2O)}$  gilt, muss auch  $m_{\Delta G} = m_u - m_f$  (bzw.  $m_{\Delta G} = m_u + |m_f|$ ) gelten; eine Nichtübereinstimmung zeigt das Auftreten von Intermediaten oder alternativen Faltungswegen an.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  von der Denaturanskonzentration (*chevron plot*).

## 2.4.2 Gewinnung struktureller Einblicke in das Faltungsgeschehen

Während native Proteine häufig gut einer strukturellen Charakterisierung zugänglich sind (neben den bereits erwähnten spektroskopischen Eigenschaften und der proteolytischen Empfindlichkeit liefern insbesondere Untersuchungen mittels NMR und die Röntgenkristallstrukturanalyse detaillierte Aussagen über den Aufbau der Moleküle) und der denaturierte Zustand als weitgehend ungeordnet betrachtet wird (u.U. können lokal nativ-ähnliche Reststrukturen auftreten, v.a. bei Vorhandensein von Disulfidbrücken), ist der Übergangszustand aufgrund seines transienten Charakters einer strukturellen Analyse wenig zugänglich. Immerhin liefert der Vergleich der kinetischen und thermodynamischen Daten eine Abschätzung darüber, inwieweit der Übergangszustand strukturell dem nativen Zustand ähnelt (Tanford 1970). Der hierfür charakteristische Tanford- $\beta$ -Wert ( $\beta_{\text{T}} = m_{\text{f}} / m_{\Delta\text{G}}$ , Fersht 1999) liegt zwischen 0 und 1. Für die meisten *two-state folder* wurde ein Wert zwischen 0,6 und 0,9 gefunden, was bedeutet, dass der Übergangszustand strukturell nahe am nativen Zustand liegt (Tanford 1970). Für den oben erwähnten *chevron plot* bedeutet dies, dass der Faltungsast i.d.R. steiler als der Entfaltungsast ist.

Eine weitere Möglichkeit, strukturelle Informationen über den Übergangszustand zu erhalten, bietet das *protein engineering*. Hierbei wird durch molekularbiologische Methoden (z.T. auch proteinchemische Methoden wie *selective pressure incorporation*, Budisa *et al.* 1999, oder *expressed protein ligation*, Evans *et al.* 1998; Muir *et al.* 1998) die Primärstruktur des zu untersuchenden Proteins gezielt und ortsspezifisch verändert. Der Einfluss dieser strukturellen Veränderungen auf die thermodynamische Stabilität bzw. das Faltungsverhalten lässt – neben der Bestimmung der Bedeutung des von der Mutation

betroffenen Aminosäurerests für die Aufrechterhaltung der nativen Konformation – Aussagen darüber zu, inwieweit der betroffene Aminosäurerest im Übergangszustand in einer nativ-ähnlichen Umgebung eingebettet ist.<sup>Ann. 5</sup>

Bei der Auftragung von  $\ln k_{\text{obs}}$  vs.  $[D]$  werden für die beiden Äste im *chevron plot* häufig Abweichungen von der Linearität beobachtet; ein derartiges „Abknicken“ wird als *rollover* bezeichnet (Parker and Marqusee 1999). Für die Faltungsreaktion werden oftmals unter nativ-ähnlichen Bedingungen Intermediate transient populiert, die dadurch zu einer Veränderung des Faltungsweges, verbunden mit dem Auftreten neuer kinetischer Phasen, führen. Diese Intermediate können zwischen U und N liegen (*on-pathway*), nur über U mit dem Faltungsweg von U zu N gekoppelt sein (*off-pathway*) oder auf parallelen Wegen von U nach N liegen (Bieri and Kiefhaber 2000). Eine weitere Ursache für nicht-lineare Abhängigkeiten im *chevron plot* kann die Heterogenität des entfaltenen Zustands sein (Bieri and Kiefhaber 2000). Solange die Interkonversion der verschiedenen entfaltenen Spezies untereinander schneller als die Faltung  $U \rightarrow N$  ist, kann U als homogen behandelt werden. Wenn jedoch die Interkonversion langsamer als die Faltung ist, führt dies zu einer kinetischen Heterogenität, wie erstmals durch Garel und Baldwin (Garel and Baldwin 1973) gezeigt werden konnte. Entfaltete RNase A lieferte über parallele Wege, die sich in den Geschwindigkeitskonstanten ihrer Reaktionsschritte unterscheiden, natives Protein, was zur Postulierung einer schnell faltenden ( $U_f$ ) und einer langsam faltenden ( $U_s$ ) Spezies führte. Als strukturelle Ursache für diesen Befund wurde für  $U_s$  eine *cis-trans*-Isomerisierung von Xaa-Pro-Peptidbindungen (korrekter: *trans*→*cis*-Isomerisierung) vorgeschlagen (Brandts *et al.* 1975), wobei Xaa einen beliebigen Aminosäurerest darstellt. Während in nativen Proteinen nur etwa 0,03% der Xaa-nicht-Pro-Peptidbindungen in *cis*-Konfiguration vorliegen, erhöht sich diese Zahl für Xaa-Pro-Bindungen auf 5,2% (Stewart *et al.* 1990; Weiss *et al.* 1998). In Peptiden beträgt das *trans:cis*-Verhältnis für Xaa-nicht-Pro-Peptidbindungen ca. 1000:1, für Xaa-Pro-Bindungen hingegen (in Abhängigkeit von der Aminosäure Xaa) ca. 5:1 (Grathwohl and Wüthrich 1981; Reimer *et al.* 1998). Da durch den Ringschluss im Prolinmolekül die sterische Behinderung der Seitenketten der beiden Aminosäurereste in beiden Konfiguration fast gleich ist, kommt es hier nicht zu einer deutlichen Bevorzugung der *trans*-Konfiguration. Während die (langsamere) *trans*→*cis*-Isomerisierung für alle Peptidbindungen ähnlich schnell verläuft ( $k$  ca.  $0,01 \text{ s}^{-1}$  bei  $25^\circ\text{C}$ ), ist die (schnellere) *cis*→*trans*-Isomerisierung von Xaa-Pro-Bindungen etwa 50–100 Mal langsamer als von Xaa-nicht-Pro-Peptidbindungen (Balbach and Schmid 2000). Aufgrund des erhöhten Anteils an *cis*-Konfiguration treten Proline häufig in *turns* genannten „Wendeschleifen“ der Proteinstruktur auf, die eine Umkehr der Orientierung der Polypeptidkette auf engstem Raum gestatten (MacArthur and

Thornton 1991). Die Substitution von *cis*-Pro durch andere Aminosäurereste führt nicht zwingend zum Verlust der *cis*-Konfiguration der entsprechenden Peptidbindung im gefalteten Protein, i.d.R. jedoch zu einem Stabilitätsverlust (Schultz and Baldwin 1992), da das Gleichgewicht (im entfalteten Zustand) zugunsten der *trans*-Konfiguration verschoben ist. Der Ersatz von *cis*-Pro durch Strukturanaloga, die die *cis*-Konfiguration favorisieren, führte dementsprechend zu einer Stabilisierung der entsprechenden Proteine bzw. Peptide (An *et al.* 1999; Mutter *et al.* 1999; Renner *et al.* 2001; Arnold *et al.* 2003). Die unterschiedlich starken Effekte von *cis*-Prolinresten auf die Stabilität bzw. Faltung von Proteinen führte zur Klassifizierung in 3 Typen (Levitt 1981):

- Typ I: Der Isomerisierungszustand hat keinen Einfluss auf die Stabilität und Faltung (z.B. Pro13 im *bovine pancreatic trypsin inhibitor* BPTI)
- Typ II: Der Isomerisierungszustand hat einen Einfluss auf die Stabilität, die Faltung wird durch die Isomerisierung beeinflusst, jedoch nicht limitiert (die konformationelle Faltung unterstützt vielmehr die Isomerisierung zur nativen Konfiguration; z.B. Pro2 und Pro9 in BPTI, Pro114 in RNase A)
- Typ III: Der Isomerisierungszustand hat einen Einfluss auf die Stabilität und die Faltung wird durch die Isomerisierung limitiert (z.B. Pro8 in BPTI, Pro93 in RNase A). Es ergibt sich eine starke Temperaturabhängigkeit der entsprechenden Geschwindigkeitskonstante (die Aktivierungsenergie beträgt ca. 80–100 kJ mol<sup>-1</sup>). Im *chevron plot* zeigen die Geschwindigkeitskonstanten „Prolin-abhängiger“ Phasen keine Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration, jedoch kann die Isomerisierung durch starke Säuren beschleunigt werden.

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung „Prolin-abhängiger“ Phasen bieten Enzyme, die die Isomerisierung von Xaa-Pro-Peptidbindungen katalysieren, so genannte Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerasen (PPIasen, Fischer *et al.* 1984; Schiene and Fischer 2000). Vergleicht man nun Faltungskinetiken in Ab- und Anwesenheit von PPIasen, so lässt sich aus einer Beschleunigung durch PPIasen auf eine Limitierung durch eine *cis-trans*-Isomerisierung schließen, wie erstmals für die langsamste Faltungsphase Harnstoffdenaturierter RNase A gezeigt werden konnte (Fischer and Bang 1985).<sup>Ann. 6</sup> Andererseits gibt es auch Proteine, bei denen im nativen Zustand Xaa-Pro-Bindungen isomerisieren, so dass hier ein Gemisch aus *cis*- und *trans*-Konfiguration vorliegt; die wohl bekanntesten Beispiele hierfür sind Pro117 und Pro47 der *Staphylococcus* Nuclease (Fox *et al.* 1986; Evans *et al.* 1987).

Als weitere Ursachen für das Auftreten nicht-linearer Äste im *chevron plot* werden auch die Verschiebung der Lage des Übergangszustands auf der Reaktionskoordinate hin zu dem

unter den entsprechenden Bedingungen jeweils instabileren Zustand (Hammond- oder Leffler-Verhalten; Hammond 1955; Evans *et al.* 1987; Pappenberger *et al.* 2000; <http://goldbook.iupac.org/>) oder das Auftreten von zahlreichen Hochenergieintermediaten diskutiert. Letztere führen quasi zu einem „breiten“ Übergangszustand, dessen Profil sich, da die jeweiligen Übergänge zwischen den Hochenergieintermediaten von der Denaturationskonzentration abhängig ist, in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration ändert, so dass unter den verschiedenen Bedingungen verschiedene Reaktionsschritte geschwindigkeitslimitierend werden (Otzen *et al.* 1999).

Eine effiziente Methode zur Charakterisierung der Stabilität und des Faltungsverhaltens von Intermediaten sowie zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen Faltungsmechanismen stellen *double-jump* Experimente dar. Bei so genannten N→D→N-Sprüngen wird natives Protein kurzzeitig entfaltet und wieder unter native Bedingungen gebracht. Aus der Abhängigkeit der Amplitude(n) der Rückfaltungsphase(n) können Schlüsse auf Entfaltungsintermediate oder Isomerisierungsreaktionen im entfalteten Protein gezogen werden, wie erstmals durch Brandts *et al.* am Beispiel der RNase A gezeigt werden konnte (Brandts *et al.* 1975). Im umgekehrten, *interrupted folding experiment* genannten Fall (D→N→D-Sprünge) wird entfaltetes Protein kurzzeitig unter Faltungsbedingungen gebracht und aus der Abhängigkeit der Amplituden der nachfolgenden Entfaltungsreaktion von der Inkubationszeit können wiederum Rückschlüsse auf Faltungsintermediate bzw. Faltungswege (sequentiell oder parallel) getroffen werden. Erstes Beispiel für derartige Experimente war wiederum RNase A (Cook *et al.* 1979; Schmid 1983). Durch derartige *interrupted folding experiments* konnte nicht nur bewiesen werden, dass die Faltung dieses Proteins auf parallelen Wegen erfolgt sondern auch, dass der Faltungsweg (ausgehend von  $U_s$ ) Intermediate beinhaltet.

Wie erwähnt werden die beobachtbaren Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  aus der Signaländerung nach (schneller) Änderung der Milieubedingungen erhalten, wobei  $k_{obs} = k_u + k_f$  gilt. Während also unter extrem denaturierenden Bedingungen  $k_{obs} \approx k_u$  bzw. umgekehrt unter extrem nativen Bedingungen  $k_{obs} \approx k_f$  gilt, tragen im Übergangsbereich, wo  $k_f$  und  $k_u$  ähnliche Werte besitzen, beide zu  $k_{obs}$  bei. Da die Signalamplitude die Signaldifferenz zwischen Ausgangs- und Endpunkt der Reaktionsbedingungen ist (s. Abb. 2), werden die intensivsten Amplituden bei extremen „Denaturanssprüngen“ von nativen zu denaturierenden Bedingungen (*baseline jumps*, s. Abb. 2) bzw. umgekehrt erhalten.<sup>Ann. 7</sup> Andererseits bedeutet dies, dass im Übergangsbereich die Amplitude der Faltungsreaktion mit steigender Denaturationskonzentration bzw. die der Entfaltungsreaktion mit sinkender Denaturationskonzentration abnimmt. Die messtechnische Konsequenz ist, dass unter diesen

Bedingungen zusätzlich zur häufig schlechter ermittelbaren Geschwindigkeitskonstante auch noch die dazugehörige Signalamplitude abnimmt, was eine genaue Bestimmung zusätzlich erschwert. Da für technische Applikationen normalerweise nicht die Proteinstabilität bzw. -entfaltungskinetik unter denaturierenden Bedingungen sondern unter nativen oder nativ-ähnlichen Bedingungen von Interesse ist, müssen die entsprechenden  $k_u$ -Werte aus den  $k_u$ -Werten, die unter Extrembedingungen erhalten wurden, nach Gl. 13 extrapoliert werden. Je nach Ausmaß der Extrapolierung sind die so erhaltenen Werte für  $k_u^{(H_2O)}$  entsprechend fehlerbehaftet (Tanford 1970). Durch eine Kopplung mit einer Folgereaktion, in der die entfaltenen Moleküle markiert werden, ist jedoch auch ein weiterer Bereich der nativ-ähnlichen Bedingungen Entfaltungsstudien experimentell zugänglich (H-D-Austausch, Mayo and Baldwin 1993; Bai *et al.* 1995, chemisches *labeling*, Sridevi and Udgaonkar 2002, Proteolyse, Imoto *et al.* 1986; Hubbard 1998; Park and Marqusee 2004). Auf diese Weise können nicht nur Entfaltungsprozesse unter nativ-ähnlichen Bedingungen untersucht werden sondern auch das Ausmaß der Extrapolierung und damit der Fehler für  $k_u^{(H_2O)}$  reduziert werden.

## 2.5 Bedeutung lokaler Strukturregionen für die Stabilität und den Entfaltungsprozess

Neben dem Vergleich von Proteinen und Mutanten davon liefern Untersuchungen an isolierten strukturellen Einheiten (Domänen, Sekundär- oder Supersekundärstrukturelemente) und der Vergleich von homologen Proteinen aus psychro-, meso-, thermo- und hyperthermophilen Organismen Informationen über den Beitrag lokaler Strukturregionen zur Stabilität und über ihre Bedeutung für den Faltungs- bzw. Entfaltungsprozess. Darüber hinaus sind derartige Untersuchungen von großer Relevanz für die biotechnologische Anwendung von Proteinen (insbesondere von Enzymen), da hier der Stabilitätsaspekt von besonderer Bedeutung ist (Bruins *et al.* 2001; Eijsink *et al.* 2005). Interessanterweise besteht eine hohe Sequenzidentität zwischen Enzymen aus thermophilen Organismen (Thermozyme, Vieille and Zeikus 2001) und ihren mesophilen Homologen, die Tertiärstrukturen sind übereinstimmend und die Katalysemechanismen (und damit die funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum) sind identisch (Vieille and Zeikus 1996). Eine erhöhte Stabilität geht oftmals mit einer erhöhten Rigidität einher; die spezifische Aktivität beider Enzymvarianten ist beim jeweiligen Temperaturoptimum jedoch vergleichbar (Vieille and Zeikus 2001). Obwohl insbesondere hydrophobe Wechselwirkungen und damit das

Innere (*core*) der Proteinmoleküle als entscheidend für den Faltungsprozess und die thermodynamische Stabilität angesehen werden (Chan and Dill 1990; Dill 1990), unterscheiden sich Thermozyeme von ihren mesophilen Pendanten oftmals gerade in oberflächennahen Bereichen (Vieille and Zeikus 2001). Trotz einer Vielzahl von Studien können bisher keine generellen Vorhersagen über einen möglichen Stabilisierungserfolg von Mutationen getroffen werden. Einige Unterscheidungsmerkmale konnten jedoch identifiziert werden, die für eine erhöhte Stabilität verantwortlich zeigen (Richards 1997; Vieille and Zeikus 2001; Eijsink *et al.* 2004):

- An der Moleküloberfläche finden sich vermehrt geladene Aminosäurereste, die in der Lage sind, Ionenpaarbindungen auszubilden.
- Die Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen ist erhöht, insbesondere in *loops* und *turns* (s.u.), wobei bevorzugt in der Primärstruktur nicht benachbarte Reste involviert sind.
- Der hydrophobe *core* ist kompakter, d.h. Lücken werden konsequenter ausgefüllt (*cavity filling*). Die Anzahl solvensexponierter hydrophober Reste nimmt ab.
- Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten oligomerer Proteine werden verstärkt, zudem steigt der Oligomerisierungsgrad.
- Die Einführung von Disulfidbrücken, die Substitution von Glycinresten und die Einführung von Prolinresten führen aufgrund einer entropischen Destabilisierung zur Stabilitätserhöhung.
- Die Termini der Polypeptidkette und die „Enden“ von *loops* sind durch v.a. Wasserstoffbrückenbindungen fixiert. Zudem sind *loops* häufig verkürzt.

Neben diesen Charakteristika, die jedoch nicht alle gleichzeitig anzutreffen sind und in ihrem Stabilisierungserfolg im Kontext mit der Gesamtstruktur gesehen werden müssen, existiert noch eine Reihe weiterer, spezifischerer Möglichkeiten, die Proteinstruktur zu stabilisieren (Modifizierungen, Medium *etc.*).

Die besondere Bedeutung der Oberflächenregionen und insbesondere der *loops* für die Stabilität und den Entfaltungsprozess ist v.a. in jüngerer Zeit in den Mittelpunkt vieler Betrachtungen gerückt (Fetrow 1995; Collinet *et al.* 2001; Krishna *et al.* 2003; Pal and Dasgupta 2003). Während  $\beta$ -*turns* durch Wasserstoffbrückenbindungen und die angrenzenden  $\beta$ -Faltblattstrukturen stabilisiert werden, stellen die Sequenzen, die Helices untereinander oder mit  $\beta$ -Faltblättern verbinden, ungeordnetere Einheiten dar. Während Helix-Helix-*loops* oftmals länger, flexibler und von geringerer Bedeutung für die Stabilität des entsprechenden Proteinmoleküls sind, wurden Helix-Faltblatt-*loops* als wichtig für den Entfaltungsprozess identifiziert (Urfer and Kirschner 1992; Gu *et al.* 1997). Trotz des Fehlens regelmäßiger Wechselwirkungen, wie sie in Sekundärstrukturelementen zu finden sind,

handelt es sich bei *loops* nicht zwingend um ungeordnete Strukturen (*random coil*). Kommen die Enden von *loops* (bei einem Abstand von 5 bis über 15 Aminosäureresten) in der Tertiärstruktur nah genug zueinander, um durch Wechselwirkungen stabilisiert zu werden (Fetrow 1995), so können sich aufgrund ihrer Form als Omega-( $\Omega$ )-*loop* (Leszczynski and Rose 1986) bezeichnete Strukturen ausbilden. Innerhalb dieser  $\Omega$ -*loops* sind die Seitenketten der Aminosäurereste größtenteils nach innen gerichtet, stehen miteinander in Wechselwirkung (Wasserstoffbrückenbindungen und/oder hydrophobe Wechselwirkungen) und stabilisieren so diese strukturellen Einheiten. Da  $\Omega$ -*loops* oberflächenlokalisiert sind, können sie in die Bindung von Liganden oder Substraten involviert sein oder selbst als Ligand oder Substrat fungieren (Fetrow 1995).

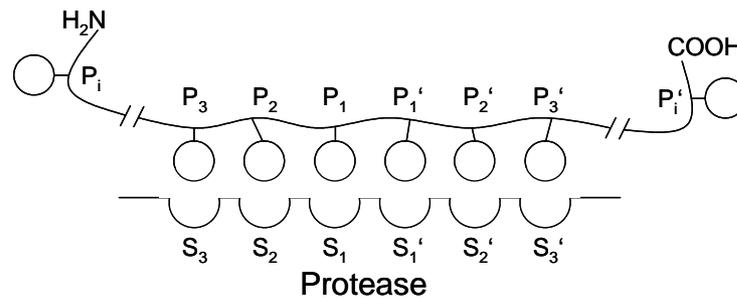
Während die Substitution von Aminosäureresten im Inneren des Proteinmoleküls  $\Delta G$  v.a. durch Änderung von  $k_f$  beeinflusst (Shakhnovich *et al.* 1996, vgl. Faltungsmodelle, Kapitel 2.2), führt die Substitution von Aminosäureresten an der Oberfläche zu Änderungen von  $\Delta G$  v.a. durch Beeinflussung von  $k_u$  (Collinet *et al.* 2001; Vieille and Zeikus 2001). Dabei führen Modifizierungen in verschiedenen Oberflächenregionen zu einer sehr unterschiedlichen Beeinflussung von  $k_u$ . Diese Beobachtungen führten zu dem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Konzept der Entfaltungsregion (*unfolding nucleus*, Schellenberger and Ulbrich 1989). Dieses postuliert, dass die lokale Entfaltung der labilsten Strukturregion (*unfolding region*) die globale Entfaltung des Gesamtmoleküls initiiert (Ulbrich-Hofmann *et al.* 1993). Nachfolgend führten insbesondere Untersuchungen mittels ortsgerechter Mutagenese zu den Begriffen *weak point* (Siddiqui *et al.* 1993), *critical region* (Eijsink *et al.* 1995), *first unfolding region* (Creveld *et al.* 1998) oder *unfolding nucleation site* (Gåseidnes *et al.* 2003). Die Bedeutung oberflächenexponierter Strukturen für den Entfaltungsprozess und die verminderte Anzahl und Regelmäßigkeit der Wechselwirkungen in *loops* im Vergleich zu Sekundärstrukturelementen oder dem hydrophoben *core* lassen *loops* als Kandidaten für Entfaltungsregionen im obigen Sinn erscheinen. Ihre Exponiertheit macht sie zudem zu potenziellen Substraten für Proteasen (s. Kapitel 3.3.2.2 und 5.1), so dass lokale Entfaltungsprozesse hier besonders gut mittels limitierter Proteolyse untersuchbar sein sollten. Tatsächlich konnte in unserer Arbeitsgruppe für RNase A die Entfaltungsregion mittels limitierter Proteolyse identifiziert werden (Arnold *et al.* 1996, s. Kapitel 4.1.3). Nachfolgende Studien mittels ortsgerechter Mutagenese unterstrichen die herausragende Bedeutung dieser Region für die Stabilität und den Entfaltungsprozess der RNase A (Anlage A10).

### 3 Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die Peptidbindungen hydrolytisch spalten. Von daher ist die korrektere Bezeichnung Peptidasen (kurz für Peptidbindungshydrolasen), wobei auch die Begriffe Proteinase und proteolytische Enzyme synonym verwendet werden. Historisch gesehen wurde zwischen Proteasen und Proteinase unterschieden (mit allgemein Peptidbindungen bzw. ausschließlich Proteinen als Substrat, Grassmann and Dyckerhoff 1928; Barrett and McDonald 1986). Aufgrund des eigentlichen Substrats (der Peptidbindung) wurde der Begriff der Peptidasen eingeführt (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/>); eine Unterscheidung nach dem Wirkungsort (im Inneren bzw. am Ende der Polypeptidkette) führte zur Einteilung in Endopeptidasen (früher: Proteinase) und Exopeptidasen (früher: Peptidasen). Ein Versuch, alle Enzyme begrifflich zu vereinen, mündete in dem Term proteolytische Enzyme (Barrett and McDonald 1986).

#### 3.1 Klassifizierung von Proteasen

Entsprechend der *Enzyme Commission*-(EC-)Nummerierung gehören Proteasen in die Hauptklasse 3 (Hydrolasen), Unterklasse 4 (Substrat: Peptidbindungen). Momentan gibt es 287 Einträge in den 14 Subunterklassen, die jedoch alle die katalysierte Reaktion beschreiben und nicht die Enzyme als solche. Daher sind unter derselben EC-Nummer mitunter verschiedene Proteasen zu finden. Zur Beschreibung der Substratspezifität und der Bindung des Substrats an die Protease wurde von Schechter und Berger eine Nomenklatur eingeführt, die die Aminosäurereste des Substrats mit  $P_i, \dots, P_3, P_2, P_1, P_1', P_2', P_3', \dots, P_i'$  bzw. die entsprechenden Bindungsstellen am Enzym mit  $S_i, \dots, S_3, S_2, S_1, S_1', S_2', S_3', \dots, S_i'$  bezeichnet (Abb. 5) (Schechter and Berger 1967). Die Spaltung des Substrats erfolgt zwischen  $P_1$  und  $P_1'$  und die Substratspezifität der Proteasen wird i.d.R. auch durch die Aminosäurereste in  $P_1$ - und/oder  $P_1'$ -Position bestimmt (Ausnahmen bilden z.B. einige Cathepsine, s. Kapitel Cathepsine und lysosomaler Proteinabbau).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Substratbindungsstellen  $S_3 - S_3'$  der Protease bzw. der Aminosäurereste  $P_i - P_i'$  des Protein- bzw. Peptidsubstrats nach Schechter und Berger (Schechter and Berger 1967). Die Spaltung des Substrats erfolgt zwischen  $P_1$  und  $P_1'$ .

In der Datenbank MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>; Rawlings *et al.* 2006), die derzeit über 2000 Einträge zu individuellen Peptidasen umfasst, werden die Proteasen hingegen entsprechend ihrer „Familienzugehörigkeit“ charakterisiert.

Hinsichtlich der Position der zu spaltenden Peptidbindung werden unterschieden:

- Endopeptidasen (hydrolysieren Peptidbindungen im „Inneren“ von Proteinen, d.h. wenigstens 3 Aminosäurereste von den Termini entfernt; v.a. Verdauungsproteasen wie Chymotrypsin oder Pepsin)
- Omega-Peptidasen (zusammengefasst unter EC3.4.19; hydrolysieren Peptidbindungen im „Inneren“ von Proteinen, jedoch in der Nähe der Termini; die Peptidbindung muss nicht notwendigerweise eine so genannte  $\alpha$ -Peptidbindung, d.h. eine Peptidbindung zwischen zwei  $C_\alpha$ -Atomen sein; Substrate sind substituierte oder zyklisierte Aminosäuren oder Aminosäuren mit Isopeptidbindungen für bspw.  $\gamma$ -Glutamyl-Hydrolase, Pyroglutamyl-Peptidase oder Ubiquitiny-Hydrolase)
- Exopeptidasen (benötigen je nach Spezifität einen freien N- oder C-Terminus; sie spalten Peptidbindungen nicht weiter als 3 Aminosäurereste vom entsprechenden Terminus entfernt und sie werden wie nachfolgend ausgeführt weiter unterteilt)
- Aminopeptidasen (EC3.4.11; spalten einzelne Aminosäurereste vom freien N-Terminus des Substratproteins)
- Di- bzw. Tripeptidyl-Peptidasen (EC3.4.14; spalten Di- bzw. Tripeptide vom freien N-Terminus des Substratproteins)
- Carboxypeptidasen (spalten einzelne Aminosäurereste vom freien C-Terminus des Substratproteins)
- Peptidyl-Dipeptidasen (EC3.4.15; spalten Dipeptide vom freien C-Terminus des Substratproteins) und
- Dipeptidasen (EC3.4.13; spalten Dipeptide mit freiem N- und C-Terminus)

Eine alternative Unterteilung der Proteasen erfolgt nach ihrem Katalysemechanismus (Tabelle 1):

**Tabelle 1:** Einteilung der Proteasen nach ihrem Katalysemechanismus

Typ	Funktionelle Gruppe im aktiven Zentrum	Beispiel
Serinprotease	Serin	(Chymo)Trypsin, Plasmin, Thrombin
saure Protease	Aspartat / H <sub>2</sub> O	Pepsin, Cathepsine D, E
Cysteinprotease	Cystein	Cathepsine B, H, L, Caspasen, Calpaine
Metalloprotease	meistens Zn <sup>2+</sup> / H <sub>2</sub> O	Thermolysin, Carboxypeptidase A, Collagenase
Threoninprotease	Threonin	Proteasom

### 3.2 Proteasen *in vivo*

Proteasen sind für alle Organismen lebenswichtig und sind daher ubiquitär (etwa 2% aller proteinkodierender Gene kodieren Proteasen; Rawlings *et al.* 2006). Vertreter einiger Proteasefamilien wie z.B. der Chymotrypsinfamilie können in allen Organismenreichen (Bakterien, Archaeen, Protozoen, Pilze, Pflanzen, Tiere und Viren) gefunden werden. Je nach ihrem Wirkungsort im jeweiligen Organismus werden sie als intrazelluläre oder extrazelluläre Proteasen bezeichnet.

#### 3.2.1 Intrazelluläre Proteasen

Intrazellulären Proteasen kommt neben der Prozessierung von „Pro-“Proteinen und der Abspaltung von Signalsequenzen („Prä-“Sequenzen) beim Membrandurchtritt bzw. beim *routing* zu den Lysosomen, Mitochondrien, in den extrazellulären Raum oder in Membranen v.a. die Aufgabe der Regulation des Proteinhaushalts zu. Über einen proteolytischen Abbau von Proteinen in den Mitochondrien und Chloroplasten ist relativ wenig bekannt. In Mitochondrien existieren Homologe zur bakteriellen Lon- (Wang *et al.* 1993) und Clp-Protease (de Sagarra *et al.* 1999) und in Mitochondrien- und Chloroplastenmembranen

wurden Vertreter der AAA-Proteasen (*ATPases associated with a variety of cellular activities*; Langer 2000) nachgewiesen.

Die Regulation des Proteinhaushalts im Zytosol umfasst die Qualitätskontrolle neu synthetisierter Proteine (Hartl and Hayer-Hartl 2002), d.h. die Beseitigung fehlerhaft synthetisierte Proteine, die zu Missfaltung und/oder Aggregation neigen können (Dobson 2003; Markossian and Kurganov 2004), die Entsorgung durch Stress (Temperatur, Oxidation, Desaminierungen *etc.*) gealterter Proteine sowie die rechtzeitige Eliminierung regulatorischer und so genannter Haushaltsenzyme (Goldberg 2003). Die Halbwertszeit der Haushaltsenzyme (*housekeeping enzymes*), d.h. derjenigen Enzyme, die für die „Grundaktivitäten“ der Zelle erforderlich sind, beträgt in etwa 1-2 Tage, die der regulatorischen Enzyme hingegen meist nur wenige Minuten bis Stunden, um eine effiziente Steuerung der metabolischen Prozesse zu garantieren (Dice and Goldberg 1975; Doherty and Mayer 1992). Generell konnte zudem beobachtet werden, dass größere Proteine schneller abgebaut werden als kleinere und Proteine mit einem isoelektrischen Punkt (pI) im sauren Bereich schneller als basische Proteine (Dice and Goldberg 1975).

### 3.2.1.1 Proteasom

Der Abbau von Proteinen im Zytosol erfolgt größtenteils in einer ATP-abhängigen Reaktion über Proteasomen (Hilt and Wolf 1996; Tanaka 1998), welche mit ca. 1,7 MDa extrem große Partikel darstellen. Sie sind bei Eukaryonten aus einem so genannten 20S-Kernkomplex, der aus 28 Untereinheiten besteht und als multifunktionelle Protease den eigentlichen Abbau bewerkstelligt, und zwei 19S-Kappenkomplexen, die den röhrenförmigen 20S-Komplex verschließen und mit Hilfe einer ATPase-Aktivität die Substraterkennung bzw. -weiterleitung in das Innere des Kernkomplexes vermitteln, aufgebaut (Coux *et al.* 1996).<sup>Ann. 8</sup> Voraussetzung für einen proteolytischen Abbau durch die Proteasomaschinerie ist die Markierung des Zielproteins durch Ubiquitin, einem hochkonservierten Protein aus 76 Aminosäuren. Durch einen Enzymkomplex aus Ubiquitin-aktivierendem (E1) und -konjugierendem (E2) Enzym sowie einer Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) wird ATP-abhängig das Zielprotein an  $\epsilon$ -Aminogruppen mit dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins verknüpft (Hershko and Ciechanover 1992; 1998).<sup>Ann. 9</sup> Neben den hier beschriebenen Abbaufunktionen, die somit auch zur Bereitstellung von Aminosäuren für Synthesen (Aminosäure-*pool*) dienen, sei noch die Involvierung der Proteasomen in die Generierung von 10-15 Aminosäurereste langen Peptiden im Zuge der Antigenpräsentation durch den MHC I (*major histocompatibility complex I*) erwähnt sowie die Involvierung des proteasomalen

Abbaus in verschiedene Krankheiten. Eine verminderte Proteasomaktivität wurde bei aggregationsassoziierten Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Huntington Chorea festgestellt (Rubinsztein 2006).

### 3.2.1.2 Caspasen und Calpaine

Weitere bedeutsame zytosolische Proteasen sind Caspasen (*cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases*), die wichtigsten Enzyme des programmierten Zelltods (Apoptose; Jesenberger and Jentsch 2002; Riedl and Shi 2004). Dieser ist ein – im Gegensatz zur Nekrose – von der entsprechenden Zelle aktiv ausgeführter Prozess („Selbstmord“), um nicht mehr benötigte oder geschädigte Zellen zu entfernen. Durch eine Vielzahl von Faktoren werden dabei zunächst Initiator-Caspasen (Caspasen 8 und 9) aktiviert, die dann Effektor-Caspasen (Caspasen 3, 6, 7) aktivieren; diese bauen durch proteolytische Spaltung ihrerseits dann diverse Zielproteine ab, was letztendlich zum Zelltod führt. Diese Prozesse unterliegen einer strikten Kontrolle, in die wiederum das Ubiquitin / Proteasom-System involviert ist. Eine Störung kann zur Ausbildung einer Vielzahl von Krankheiten führen, die neben Autoimmunerkrankungen Immundefizienz- und neurodegenerative Erkrankungen sowie die Entstehung von Tumoren einschließen (Jesenberger and Jentsch 2002; Hipfner and Cohen 2004). Auch die zytosolischen, Calcium-abhängigen Calpaine (abgeleitet von *Cal*modulin wegen der Calciumabhängigkeit und *Papain*, der damals bekanntesten Cysteinprotease) sind bedeutsam für zahlreiche Prozesse wie z.B. Zellmobilität (durch Abbau des Zytoskeletts), Signaltransduktion (durch Calciumabhängigkeit) oder Apoptose. Pathologische Funktionsstörungen führen u.a. zu einem Anstieg des mit Krebsentstehung verbundenen Proteins p53, durch Störung der Apoptose zu neurodegenerativen Erkrankungen oder zu Muskeldystrophie. Daher ist es nicht überraschend, dass derzeit etwa 14% der ca. 500 bekannten humanen Proteasen als Targets für die Entwicklung von Medikamenten untersucht werden (Rawlings *et al.* 2006).

### 3.2.1.3 Cathepsine und lysosomaler Proteinabbau

Der Großteil v.a. langlebiger Proteine wird durch Cathepsine in den Lysosomen abgebaut (Bohley and Seglen 1992); diese finden im Pflanzenreich ihr Äquivalent in den Vakuolen. Neben dem Abbau von Proteinen, die spezifisch in die Lysosomen transportiert werden, liegt die Bedeutung der Lysosomen im unselektiven Abbau von extrazellulären Komponenten durch Endozytose bzw. Phagozytose und intrazellulärer Partikel (z.B.

Mitochondrien) durch Autophagie.<sup>Ann. 10</sup> Die 11 lysosomalen „Haupt“-Cathepsine sind Cysteinproteasen der Papainfamilie und wirken als Endo- und/oder Exopeptidasen (Gocheva and Joyce 2007). Daneben gibt es noch Cathepsinvertreter der Serinproteasen (Cathepsine G und A) und der Aspartatproteasen (Cathepsine D und E). Die lysosomalen Cathepsine werden als Zymogene synthetisiert und erst nach Mannose-6-Phosphat-vermittelter Aufnahme in die Lysosomen durch Abspaltung der Prosequenz aktiviert. Durch Abbau von Proteinen zu Dipeptiden und Aminosäuren, die dann wieder ins Zytosol zurückgeschleust werden, tragen die Lysosomen (bzw. die darin enthaltenen Proteasen) maßgeblich zur Aufrechterhaltung des Aminosäure-pools der Zellen bei. Interessanterweise wird die Substratspezifität der Cathepsine v.a. durch die S<sub>2</sub>-Bindestelle bestimmt (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Große Bedeutung kommt einigen Cathepsinen (B, L, S) im Rahmen der MHC II-vermittelten Antigenpräsentation zu. Während der Wirkungsort der Cathepsine normaler Zellen die Lysosomen sind, kommt es bei der Tumorbildung häufig zur Translokation zur Zelloberfläche und nachfolgend zur Sekretion der Proteasen. Ein Anstieg der Konzentration an Cathepsinen B oder L im Serum ist daher häufig auch ein Hinweis auf eine Tumorerkrankung. Im Extrazellularraum können die Cathepsine entweder selbst die Komponenten der extrazellulären Matrix (Collagen, Gelatine, Tenascin) abbauen oder sie aktivieren andere Proteasen (Matrixmetalloproteasen, MMP), die dann ihrerseits Aktivierungskaskaden auslösen oder die o.g. Komponenten abbauen. Durch die Auflösung des Zellverbundes kann es dann zur Invasion von Tumoren in das entsprechende Gewebe oder zur Metastasierung, d.h. der Abwanderung von Krebszellen aus Tumoren, kommen (Gocheva and Joyce 2007).<sup>Ann. 11</sup>

Wie oben erwähnt, wird eine Vielzahl zytosolischer Proteine in den Lysosomen abgebaut. Sie werden jedoch nicht durch Phagozytose in die Lysosomen geschleust, sondern durch Chaperon-vermittelte Autophagie (*chaperon-mediated autophagy*, CMA Massey *et al.* 2004) aufgenommen. Das Hitzeschockprotein hsc73 (*heat shock cognate*) sowie diverse so genannte Co-Chaperone binden dabei an das Zielprotein (Agarraberes and Dice 2001); dieser Komplex bindet an der Lysosomenaußenseite an den *lysosomal-associated membrane protein type 2a* (lamp2a) -Rezeptor und mit Hilfe des lysosomalen hsc73 (lys-hsc73; Cuervo 2004) wird das Zielprotein in die Lysosomen transferiert und dort von den Cathepsinen abgebaut (Cuervo and Dice 2000; Martinez-Vicente *et al.* 2005; Anm.: Für dieses Chaperonsystem werden von denselben Autoren auch die Begriffe ly-hsc73, hsc70 und lys-hsc70 verwendet.). Als CMA-Signalsequenz wurde durch Vergleich des Abbaus von mikroinjizierter RNase A, RNase S (d.h. durch Subtilisin ausschließlich an der Peptidbindung Ala20-Ser21 gespaltene RNase A) und der beiden Fragmente der RNase S (S-Protein, Aminosäurereste 21-124, und S-Peptid,

Aminosäurereste 1–20) die Aminosäuresequenz KFERQ ermittelt (Backer *et al.* 1983; Backer and Dice 1986; Dice *et al.* 1986). Tatsächlich konnte durch Immunopräzipitation eine derartige Sequenz in ca. 30% aller zytosolischen Proteine nachgewiesen werden (Chiang and Dice 1988) und eine Fusion von „Nicht-KFERQ-Proteinen“ mit dem die KFERQ-Sequenz enthaltenden S-Peptid förderte einen Abbau (Backer and Dice 1986).<sup>Ann. 12</sup>

Die hier ausgeführten Beispiele belegen, dass proteolytische Prozesse in der Zelle eine Vielzahl von Aufgaben übernehmen und dass sie äußerst fein gesteuert werden müssen, um einerseits den physiologischen Aufgaben gerecht zu werden, andererseits jedoch um pathologische Erscheinungen auszuschließen.

### 3.2.2 Extrazelluläre Proteasen

Proteasen können – wie andere Proteine auch – nach Sekretion ihre biologische (katalytische) Aktivität auch außerhalb der Zellen ausüben. Die Sekretion, die dabei konstitutiv, d.h. andauernd und gleich bleibend, oder reguliert erfolgen kann, geschieht über dieselben Mechanismen wie für andere Proteine, d.h. unter Mitwirkung von so genannten Signal- oder Präsequenzen, die meist 16–20 Aminosäurereste lang sind (Birch and Loh 1990). Beim Membrandurchtritt erfolgt deren Abspaltung durch Signalpeptidasen, wobei die Proteasen auch dann noch i.d.R. als inaktive Vorstufen (Zymogene) vorliegen. Erst durch Abspaltung der Prosequenz, die einerseits als Chaperon während der Faltung (Eder and Fersht 1995; Takagi and Takahashi 2003), andererseits als Inhibitor (Kessler and Safrin 1994; O'Donohue and Beaumont 1996; Wiederanders *et al.* 2003) wirken kann, erreichen die Proteasen ihre aktive Form. Diese proteolytische Spaltung kann autokatalytisch oder durch andere Proteasen erfolgen.

Bei Einzellern wie Bakterien werden die Proteasen in den periplasmatischen Raum oder ins Medium abgegeben, wo sie v.a. dem extrazellulären Abbau von Nahrungsproteinen bzw. – im Fall einer Virulenz – dem Abbau des Bindegewebes des Wirtes und der Deregulation von Proteinkaskaden oder Inhibitorsystemen dienen (Goguen *et al.* 1995). Bei höheren Organismen kann die Sekretion (z.B. über Schleimhäute) nach außen (exokrin) oder „nach innen“, z.B. ins Blut (endokrin), erfolgen. In die erste Gruppe gehören z.B. die Verdauungsenzyme wie Pepsin, Trypsin oder Chymotrypsin, in die zweite Gruppe die Enzyme der Blutgerinnungskaskade (Kallikreine, Blutgerinnungsfaktoren, Thrombin), der Fibrinolyse (Urokinase, Plasmin), des Komplementsystems (C1r, C1s, *mannose binding lectin-associated serine proteases*, MASP) sowie die Proteasen des extrazellulären Raums (Matrix-Metalloproteinasen). Genauso wie die intrazellulären Proteasen ist die Aktivität der

extrazellulären Proteasen durch eine feine Abstimmung von Aktivierung und Inhibierung geregelt, um pathologische Effekte zu verhindern (Neurath 1984; Molinari *et al.* 2003). Ein effizientes System zur Steuerung der Aktivierung stellen so genannte Kaskaden dar, bei denen zunächst regulatorische Proteine aktiviert werden, die (häufig im Zusammenspiel mit anderen, Nicht-Protease-Effektoren) letztendlich das entsprechende Zielprotein aktivieren. In einem einfachen Fall aktiviert die Enteropeptidase (Enterokinase) des Dünndarmepithels Trypsinogen, das vom Pankreas in den Dünndarm sezerniert wird. Das entstehende Trypsin kann sich (aufgrund einer ähnlichen Substratspezifität) autokatalytisch aktivieren (positive Rückkopplung), zudem aktiviert es die inaktiven Vorstufen von Chymotrypsin (Chymotrypsinogen), Elastase (Proelastase) sowie Carboxypeptidase A und B (Procarboxypeptidase A bzw. B, Coll *et al.* 1991). Deutlich komplizierter ist die so genannte Blutgerinnungskaskade; hier erfolgt die Aktivierung der exekutiven Protease Thrombin über 4 (exogenes System) bzw. 6 Schritte (endogenes System). Durch Spaltung des extrazellulären Bereichs von Transmembranproteinen kommt es zur Modulation von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Wechselwirkungen, von Zellfunktionen oder aber auch zur Freisetzung von Molekülen, die dann frei diffundieren können wie z.B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren. Die diese Spaltungen ausführenden Proteasen werden unter der Bezeichnung *shedddases* zusammengefasst (Garcia-Touchard *et al.* 2005). Extrazelluläre Proteasen sind meist Serin- und Metalloproteasen (Garcia-Touchard *et al.* 2005), v.a. im Reich der Pilze gibt es jedoch zahlreiche Beispiele für sekretierte saure (Aspartat-)Proteasen wie z.B. die Mucor Rennine von *Mucor pusillus* und *Mucor miehei*, die *Rhizopus niveus* Aspartatprotease und die sauren Proteasen A und B (kommerziell als Proctase A bzw. B bekannt) aus *Aspergillus niger* var. *macrosporus* (Rao *et al.* 1998).

Eine besondere Stellung nehmen virale Proteasen ein, da diese nicht durch die Viren selbst synthetisiert werden sondern durch den jeweiligen Wirt. Matrize kann dabei entweder virale DNA oder (bei Retroviren) RNA sein; letztere wird zunächst durch eine Reverstranskriptase in DNA „umgeschrieben“. Auch bei den viralen Proteasen kommen alle Proteasetypen hinsichtlich des Katalysemechanismus vor (Rawlings *et al.* 2006). Die viralen Proteasen sind für die Prozessierung der „Polyproteinpräkursoren“ in funktionale (Struktur-)Proteine der reifen Viren erforderlich. Diese zentrale Rolle lässt sie (neben z.B. der Reverstranskriptase und der Integrase) daher auch als geeignetes Target für Therapien erscheinen, was zur Entwicklung zahlreicher Proteasehemmer geführt hat (Debouck 1992; Rao *et al.* 1998; Eron 2000).

### 3.3 Proteasen *in vitro*

#### 3.3.1 Biotechnologische Nutzung von Proteasen

Aufgrund ihrer besseren Verfügbarkeit (isolierbare Menge, Stabilität) finden in technischen Prozessen v.a. extrazelluläre Proteasen Verwendung. Insbesondere Proteasen aus so genannten extremophilen (besser: extremotoleranten) Mikroorganismen stellen durch ihre Robustheit bzw. ein Aktivitätsoptimum außerhalb der üblichen Bedingungen (37°C, pH 6–8) interessante Werkzeuge für industrielle Applikationen dar. Bezüglich der Substratspezifität lässt sich feststellen, dass v.a. Endoproteasen verwendet werden (Poldermans 1990). Derzeit beträgt der Jahresumsatz industriell genutzter Enzyme ca. 1 Mrd US-Dollar, von denen ca. 60% auf Proteasen entfallen (Rao *et al.* 1998). Ca. 40% der Proteasen finden Verwendung in Waschmitteln bzw. -lösungen. Das erste Proteasen enthaltende Waschmittel kam bereits 1913 unter dem Handelsnamen „Burnus“ auf den Markt und bestand aus Natriumcarbonat und einen Pankreasrohextrakt (Poldermans 1990). Inzwischen sind die meisten in Waschmitteln verwendeten Proteasen bakteriellen Ursprungs (v.a. aus *Bacillus*-Stämmen). Weitere bedeutende technologische Anwendungsgebiete von Proteasen stellen die Lederindustrie (Entfernen von Nichtstrukturproteinen sowie Haaren; Ersetzen der Behandlung mittels Natriumsulfid und extrem alkalischen Lösungen), Molkereiindustrie (Proteasen wie Rennin, dem Pepsinanalogen aus Kälbermagen oder mikrobielle Proteasen), die Backindustrie (*Aspergillus oryzae*-Proteasen zum Abbau des pflanzlichen Speicherproteins Gluten), die Getränkeindustrie (Papain zur Entfernung von Trübungen) oder auch die Lebensmittelindustrie (Geschmacksverbesserung von Proteinhydrolysate enthaltenden Lebensmitteln) dar (Poldermans 1990; Rao *et al.* 1998).

Im medizinischen Bereich finden Proteasen ebenfalls bedeutende direkte Anwendungen, wie z.B. bei der Wundbehandlung, der Regulation der Blutgerinnung (bei Hämophilie) bzw. dem Auflösen von Blutgerinnseln oder der Unterstützung von Verdauungsprozessen (Flohé and Günzler 1990). Indirekte Verwendung finden Proteasen bei der Herstellung von Therapeutika wie z.B. für die C-terminale Amidierung bioaktiver Peptidpräkursoren (Bongers and Heimer 1994) oder für die Umwandlung von Schweine-Insulin in menschliches Insulin (Zündorf and Dingermann 2001; dieses Verfahren hat sich im industriellen Maßstab allerdings nicht durchsetzen können).

Obwohl Proteasen in ihrer natürlichen Funktion Peptidbindungen hydrolysieren, sind sie prinzipiell auch in der Lage, die Umkehrreaktion, d.h. die Synthese von (Poly)Peptiden zu katalysieren (*reverse proteolysis*, Bordusa 2002). Prominentestes Beispiel für eine

proteasekatalysierte Synthese ist der Süßstoff Aspartam, der durch die Verknüpfung von L-Aspartat und L-Phenylalanin durch die immobilisierte Protease Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus* entsteht (Poldermans 1990; Rao *et al.* 1998); L-Aspartyl-L-phenylalanin-methylester, Handelsname u.a. NutraSweet). Da Aspartam ca. 180 Mal süßer als „normaler“ Zucker ist, wird es weit verbreitet als Süßstoff verwendet, allerdings ist es nicht hitzestabil, so dass es nicht beim Backen verwendet werden kann. Synthesen mittels Proteasen können thermodynamisch oder (günstiger) kinetisch kontrolliert ablaufen (Ullmann and Jakubke 1999). Häufig finden wasserarme organische oder gefrorene Reaktionsmedien Anwendung. Zudem ist eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts durch Manipulation der „Abgangsgruppen“, die die Umkehrungsreaktion (Hydrolyse) verhindern, erreichbar (Bongers and Heimer 1994; Ullmann and Jakubke 1999; Wehofsky *et al.* 2003). Auf diese Weise ist es nicht nur möglich, einzelne Aminosäuren sondern auch (chemisch synthetisierte oder durch Proteolyse erhaltene) Peptide miteinander zu verknüpfen (Fragmentkondensation). Beispiele hierfür sind das *delta sleep-inducing peptide*, das *cholecystokinin* Oktapeptid, das Leu-Enkephalin, ein Analogon des *gonadotropin-releasing hormone* und die membranaktiven antibiotischen Peptide emerimicin III and IV (für Reviews s. Bongers and Heimer 1994; Gill *et al.* 1996). Selbst Proteine sind auf diese Weise erzeugbar, wobei im Zuge der Synthese der Peptide mittels Festphasensynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) auch nichtnatürliche Aminosäuren oder Module „eingebaut“ werden können. Durch sechs Ligationsschritte konnten RNase A-Derivate mit Fluor-substituierten Histidinen (H12 und/oder H119) hergestellt werden; die Gesamtausbeute lag bei 15% (Jackson *et al.* 1994). Durch Fragmentkondensation mittels *Staphylococcus aureus* V8-Protease wurde  $\alpha$ -Globin erzeugt, welches funktionales Hämoglobin lieferte (Sahni *et al.* 1989). Mit derselben Protease wurde auch die C-terminale Domäne von Thermolysin (Aminosäurereste 205–316) aus dem Fragment 205–302 und chemisch synthetisierten Peptidensequenzen 303–316 wiederhergestellt (De Filippis and Fontana 1990). Neben Proteasen in ihrer Wildtypform finden häufig auch durch *protein engineering* erzeugte Varianten Anwendung, bei denen die Potenz zur Synthese gegenüber der Hydrolyse gesteigert wurde (Jackson *et al.* 1994; Rao *et al.* 1998).

### 3.3.2 Proteasen zur biochemischen Charakterisierung von Proteinen

#### 3.3.2.1 Proteinsequenzierung/ peptide mapping

Eine grundlegende Charakterisierung von Proteinen basiert auf der Bestimmung ihrer Primärstruktur, d.h. ihrer Aminosäuresequenz. Hierzu wird üblicherweise ein nach seinem Erfinder Pehr Edman benanntes Verfahren verwendet, bei dem schrittweise die jeweils N-terminale Aminosäure modifiziert, vom Restprotein abgespalten und mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) analysiert wird (Edman and Begg 1967). Limitierungen dieser Methode bestehen v.a. in der Länge der analysierbaren Sequenzen (durch nicht 100%ige Umsätze bei den einzelnen Reaktionsschritten, Analyseschwierigkeiten bei Aminosäurewiederholungen, N-terminale Blockierungen u.a.). Trotz gewaltiger Fortschritte auf dem Gebiet der Massenspektrometrie (z.B. durch Einführung der Tandem-Massenspektrometrie, MS/MS), die nicht nur eine Massebestimmung sondern auch eine Sequenzierung insbesondere von Peptiden ermöglichen, existieren auch hier Limitierungen hinsichtlich der Länge der zu analysierenden Proteine. Eine sehr effiziente Methode zum spezifischen „Zerkleinern“ größerer Proteine ist die limitierte Proteolyse, bei der unter Verwendung von meist spezifischen Proteasen Proteinfragmente erhalten werden (im Gegensatz zur vollständigen Proteolyse, die einzelne Aminosäuren liefert). Nach Trennung (üblicherweise mittels *reversed-phase* HPLC, RP-HPLC) können diese Fragmente durch Proteinsequenzierung und/oder Massenspektrometrie analysiert werden (Kellermann 1999). Durch Verwendung von Proteasen mit unterschiedlicher Substratspezifität (in Parallelreaktionsansätzen) kommt es zu unterschiedlichen Fragmentierungen; aufgrund überlappender Bereiche in den erhaltenen Primärstrukturdaten ist ein „Zusammensetzen“ der Aminosäuresequenz möglich (in ähnlicher Weise wird bei der DNA-Sequenzierung durch die Verwendung von Restriktionsendonucleasen vorgegangen, Price and Johnson 1990; Kellermann 1999).

Um eine Beeinträchtigung des proteolytischen Abbaus durch die Ausbildung einer stabilen Tertiärstruktur des zu untersuchenden Proteins zu vermeiden, werden i.d.R. die im Protein enthaltenen Disulfidbrücken gespalten (mit Dithiothreitol, DTT, *Cleland's reagent*) und durch Modifizierung der entstandenen Thiolgruppen (mit Iodessigsäure oder Iodacetamid) ihre Wiederausbildung verhindert. Bei Verwendung von Proteasen, die auch in Gegenwart von Denaturanzien aktiv sind, kann eine Strukturbildung zusätzlich durch Zugabe von Denaturanzien verhindert werden (Welinder 1988). Häufig in diesem Zusammenhang verwendete Proteasen sind die spezifischen Proteasen Trypsin (spaltet C-terminal von Lys und Arg) oder die *Staphylococcus aureus* V8-Protease (spaltet C-terminal

von Glu), aber auch unspezifische Proteasen wie Thermolysin. Während erstere eine übersichtliche Anzahl von Fragmenten liefern, erzeugen letztere zwar leichter analysierbare Fragmente, deren „Zusammensetzen“ jedoch aufgrund der größeren Anzahl problematischer ist.

### 3.3.2.2 Lokalisierung flexibler Strukturbereiche

Trotz des Vorhandenseins entsprechender Aminosäurereste sind viele Proteine unter nativen Bedingungen gegen Proteasen resistent oder werden nur an wenigen ausgewählten Positionen gespalten. So sollte – rein statistisch – z.B. Trypsin ca.10% aller Peptidbindungen in einem Protein spalten, jedoch erfolgen auch in großen Proteinen – wenn überhaupt – nur einige wenige Spaltungen (Hubbard *et al.* 1998). Neben der eingangs des Kapitels ausgeführten Substratspezifität sind für einen erfolgreichen proteolytischen Angriff noch weitere Kriterien entscheidend. Zunächst und selbstverständlich muss die Protease unter den gegebenen Reaktionsbedingungen aktiv sein, d.h. der pH-Wert und die Temperatur müssen dem Aktivitätsprofil der Protease entsprechen und eventuell enthaltene Denaturanzien oder Komponenten (z.B. Chelatbildner bei Metalloproteasen, oxidierende Agenzien bei Cysteinproteasen u.ä.) dürfen die Aktivität der Protease nicht signifikant beeinträchtigen. Zudem müssen die aufgrund der Substratspezifität „potenziellen Spaltstellen“ sterisch zugänglich sein, d.h. sie dürfen nicht durch Einbettung in Sekundärstrukturelemente oder durch die Nähe von Disulfidbrücken, Glykosylierungen, Lipidierungen o.ä. gegen einen proteolytischen Angriff abgeschirmt sein. Daraus folgt auch, dass proteolytische Spaltungen zunächst an oberflächenlokalisierten Peptidbindungen erfolgen. Da i.d.R. nicht nur das Peptidrückgrat sondern auch die Seitenketten der Aminosäurereste in die Bindung an die Protease involviert sind, gilt obige Aussage zur Abschirmung ebenso für diese. Und letztendlich muss die Region des Proteins, in der die Spaltung erfolgen soll, eine ausreichende Flexibilität besitzen, um eine effiziente Bindung an das aktive Zentrum und die Nebenbindungsstellen der Protease zu ermöglichen (Novotný and Brucoleri 1987; Hubbard 1998). Dementsprechend werden primäre Spaltstellen in nativen Proteinen üblicherweise in flexiblen *loop*-Regionen gefunden. Primäre Spaltstellen sind gekennzeichnet durch das gleichzeitige Auftreten von einem N-terminalen ( $Xaa_N$ - $Xaa_{P1}$ ) und dem komplementären C-terminalen Fragment ( $Xaa_{P1'}$ - $Xaa_C$ ). Das Ausmaß der Interaktionen zwischen Protein und Protease (diese begrifflich vereinfachte Unterscheidung soll hier getroffen werden, auch wenn selbstredend Proteasen ebenfalls Proteine sind) ist sehr unterschiedlich. Hubbard *et al.* (Hubbard *et al.* 1994) ermittelten durch Analyse des

Trypsin-Trypsininhibitor-Komplexes und verschiedener bekannter Trypsinspaltstellen in Proteinen, dass für Trypsin beiderseits der zu spaltenden Peptidbindung wenigstens jeweils 6 Aminosäurereste in die Bindung involviert sind. Jedoch sind die Anforderungen für verschiedenen Proteasen sehr unterschiedlich. Das aktive Zentrum der Proteinase K liegt nahe der Moleküloberfläche und in die Substratbindung ist praktisch nur das Peptidrückgrat des Proteins involviert (Wolf *et al.* 1991); zudem besitzt Proteinase K ein sehr breites Substratspektrum. Daher ist Proteinase K häufig in der Lage, native Proteine abzubauen. Thermolysin besitzt ebenfalls ein breites Substratspektrum, jedoch liegt das aktive Zentrum dieser Protease in einer tiefen Spalte zwischen zwei Domänen (Colman *et al.* 1972; Holland *et al.* 1992). Eine Spaltung kann daher nur in ausgedehnten *loops* nativer Proteine erfolgen, was erklärt, warum viele kleine Proteine unter nativen Bedingungen resistent gegen Thermolysin sind. Dies und die hohe Thermostabilität dieser Protease macht sie sehr interessant für Stabilitätsuntersuchungen (s.u.).

Die Restriktionen für einen proteolytischen Abbau können genutzt werden, um flexible Bereiche der Proteinstruktur zu identifizieren, denn nur diese sollten angreifbar sein (zumindest deutlich besser als die kompakten Bereiche) – vorausgesetzt, dass sie potenzielle Spaltstellen enthalten. Durch Analyse der entstehenden Fragmente (s.o.) kann die Spaltstelle ermittelt werden. Zu beachten ist jedoch, dass für eine derartige Analyse der Flexibilität des Proteinmoleküls nur primäre Spaltstellen (s.o.) herangezogen werden können. Durch einen erfolgreichen proteolytischen Angriff wird das Protein i.d.R. destabilisiert (*nicked protein*, Fassina *et al.* 1986), so dass es leichter zu einer (weiteren) Entfaltung kommt, was zu verbesserten Substrateigenschaften für die Protease und damit verbunden zu einem weiteren Abbau führt (Arnold *et al.* 1996). Aus den Fragmenten  $Xaa_N-Xaa_i + Xaa_{i+1}-Xaa_j + Xaa_{j+1}-Xaa_C$  lässt sich nicht feststellen, welche der beiden Peptidbindungen  $Xaa_i-Xaa_{i+1}$  und  $Xaa_j-Xaa_{j+1}$  primäre Spaltstellen darstellen. Nur die Identifizierung der beiden Paare jeweils komplementärer Fragmente  $Xaa_N-Xaa_i + Xaa_{i+1}-Xaa_C$  bzw.  $Xaa_N-Xaa_j + Xaa_{j+1}-Xaa_C$  erlaubt ihre Beschreibung als primäre Spaltstellen. Die durch den Folgeabbau auftretenden neuen Fragmente bzw. Spaltstellen spiegeln also nicht unbedingt flexible und zugängliche Bereiche des intakten Proteinmoleküls wider und sind daher für eine Beschreibung des nativen Moleküls nicht geeignet.

Bekannte Beispiele für eine Fragmentierung nativer Proteine sind RNase A, aus der nach Inkubation in Gegenwart von Subtilisin die Fragmente Lys1-Ala20 und Ser21-Val124 entstehen (Richards and Vithayathil 1959), Cytochrom c, dessen Peptidbindung 56-57 in Gegenwart der Hämkomponente durch Proteinase K spezifisch gespalten wird (Spolaore *et al.* 2001) oder auch Apomyoglobin, das durch Thermolysin spezifisch zwischen den

Aminosäureresten 88 und 89 gespalten wird (Musi *et al.* 2004). Mitunter erfolgen auch zwei (oder mehr) Spaltungen im intakten Proteinmolekül parallel, was durch die Identifizierung aller jeweils komplementären Fragmente nachgewiesen werden kann wie im Fall von Thermolysin, bei welchem (bei autolytischem Verdau) parallel die Peptidbindungen 196–197 und 204–205 gespalten werden (Fassina *et al.* 1986). Oftmals kann jedoch durch das Fehlen bestimmter komplementärer Fragmente nicht entschieden werden, ob es sich um parallele oder Folgereaktionen handelt (s.o.). Nach Inkubation von RNase A in Gegenwart von Elastase (das Produkt wurde in Analogie zum Verdau mittels Subtilisin RNase E genannt) wurden die Fragmente Lys1–Ala19 und Ser21–Val124 identifiziert (Klee 1965). Es wurde ein sequenzieller Abbau durch primäre Spaltung der Peptidbindung Ala19–Ala20 gefolgt vom exoproteolytischen Abbau zum Fragment Ser21–Val124 postuliert. Durch den Einsatz von MS, Proteinsequenzierung und *genetic engineering* (RNase A-Varianten A20P-RNase A bzw. S21P-RNase A) konnte durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe diese These widerlegt werden – der Abbau beginnt durch Spaltung von Ser21–Ser22 gefolgt von der Abspaltung der dann C-terminalen Reste Ser21 und Ala20 (Anlagen **A2** und **A3**, s. Kapitel 5.2.1).

Aus experimentell bestimmten tatsächlichen Spaltungsereignissen und Strukturdaten bzw. -parametern wurden verschiedene Algorithmen entwickelt, um proteolyseempfindliche Bereiche vorhersagen zu können (Hubbard *et al.* 1998). Eine Kombination aus der Analyse der Solvenz Zugänglichkeit und der Temperaturfaktoren (Yuan *et al.* 2003) ergab dabei die beste Vorhersagemöglichkeit.

### **3.3.2.3 Subzelluläre Lokalisierung von Proteinen und Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen**

Zelluläre Proteine können löslich in den verschiedensten Zellkompartimenten vorkommen, sie können jedoch auch mit Membranen assoziiert bzw. sogar integraler Bestandteil von Membranen sein. Insbesondere die Charakterisierung von Membranproteinen ist häufig mit großen Schwierigkeiten verbunden (lösliche Expression, Kristallisation etc.). Mittels limitierter Proteolyse ist es zumindest möglich, durch Abbau der Bereiche, die nicht in die entsprechende Membran eingebettet sind, die Topologie zu bestimmen (Butler 1990; Pratt 1990). Nach einem Zellaufschluss werden die einzelnen subzellulären Fraktionen mittels Ultrazentrifugation isoliert (Schröter *et al.* 1999; Isolierung von jeweils Lumen und Membranfraktion). Die löslichen Proteine können nachfolgen wie oben beschrieben charakterisiert werden. Durch den Vergleich des Abbaus der Proteine in den jeweiligen Membranfraktionen mit dem Abbau nach Inkubation mit Lösungen erhöhter Ionenstärke

oder veränderten pH-Wertes zum Ablösen membranassoziierter Proteine bzw. nach Inkubation in Gegenwart von Detergenzien (z.B. Triton X-100) zum Auflösen der Membranstruktur lassen sich weitere Informationen zur Topologie der entsprechenden Proteine gewinnen (Butler 1990). Darüber hinaus ist es durch vergleichenden proteolytischen Abbau möglich, Interaktionen von Liganden mit membranassozierten Rezeptoren zu detektieren. Nach der Proteinbiosynthese kann auch der Verlauf posttranslationaler Modifizierungsreaktionen (im endoplasmatischen Retikulum und/oder im Golgi-Apparat) und die Oberflächenpräsentation von exprimierten Proteinen verfolgt werden (Pratt 1990; Naim 1999). Zum Einsatz kommen hier v.a. Proteinase K (aufgrund der großen Toleranz gegen Additive) und Trypsin (aufgrund der hohen Substratspezifität) (Pratt 1990).

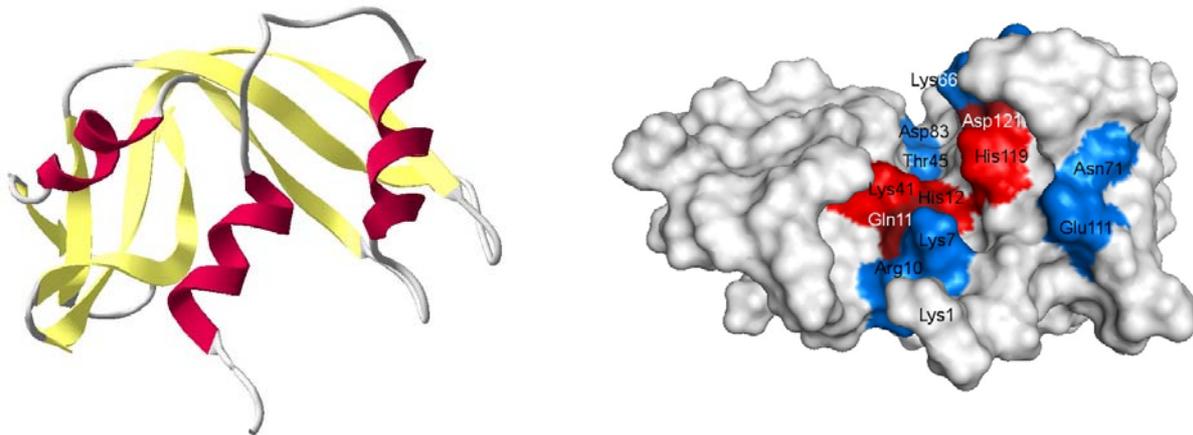
## 4 Ribonuclease A

### 4.1 Ribonuclease A als Modellprotein

Ribonucleasen finden sich in relativ hohen Konzentrationen im Pankreas von Wiederkäuern, was zu ihrer frühzeitigen Entdeckung (Jones 1920) und Isolierung führte. Ende der 1950er Jahre produzierte die Schlachtereier Armour Co. (Chicago, IL) 1 kg reine RNase A und stellte diese kostenlos Wissenschaftlern in aller Welt zur Verfügung. Dies machte RNase A zum Modellprotein für die Grundlagenforschung für die nächsten Jahrzehnte. Wie es mehrfach in dem Kapitel zur Proteinstabilität und Proteinfaltung angeklungen ist, diente RNase A als Modellprotein für eine Vielzahl von bedeutenden Experimenten

- zur Proteinstabilitäts- und -faltungsproblematik (verbunden mit der Verleihung des Nobelpreises für Chemie 1972 an Christian B. Anfinsen)
- zur Chemie der Proteinsynthese (Nobelpreis für Chemie 1984 an Robert B. Merrifield)
- zur Enzymologie (Nobelpreis für Chemie 1972 an Stanford Moore und William H. Stein)
- zur Methodenentwicklung (NMR Spektroskopie, Saunders *et al.* 1957; H-D-Austausch NMR Spektroskopie zur Verfolgung von Faltungsprozessen, Udgaonkar and Baldwin 1988; Inkorporation nicht-natürlicher Strukturmimetika mittels *intein-mediated protein ligation*, Evans *et al.* 1998)
- zur Untersuchung von Evolutionsprozessen (RNase A-Superfamilie; Beintema *et al.* 1997; Beintema and Kleinedam 1998)
- zur Entwicklung von proteinbasierten Therapeutika (Raines 1999)
- und zu Studien, den proteolytischen Abbau von Proteinen betreffend (s.u.).

Zudem war RNase A das erste Enzym (bzw. das dritte Protein nach Insulin und Hämoglobin), für das die Aminosäuresequenz ermittelt wurde (124 Aminosäurereste, Molekülmasse 13 683 Da, Hirs *et al.* 1960) und das dritte Enzym (bzw. das fünfte Protein nach Myoglobin, Hämoglobin, Lysozym und Carboxypeptidase A), für das die dreidimensionale Struktur mittels Röntgenkristallstrukturanalyse bestimmt werden konnte (Kartha *et al.* 1967; Wlodawer *et al.* 1982) (Abb. 6 links).



**Abb. 6:** Tertiärstruktur der RNase A. Das Modell (7rsa) wurde der Brookhaven Protein Data Bank entnommen und mit dem Programm SwissPDBViewer v3.7 (links; Helices (rot) und Faltblätter (gelb) sind als Bänder gezeigt) bzw. mit dem Programm PyMol dargestellt (rechts; die Aminosäurereste des aktiven Zentrums (rot) und der Substratbindung (blau) sind angezeigt sowie zur Orientierung Lys1).

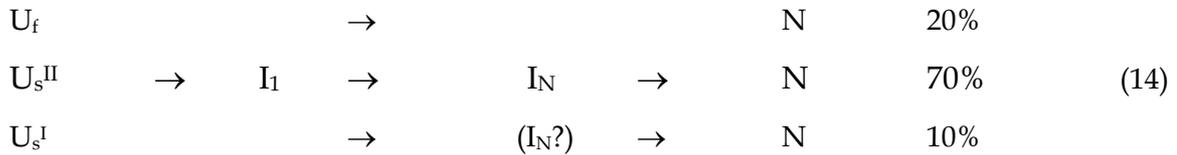
RNase A ist ein Eindomänenprotein, das aus drei Helices und einem ausgedehnten  $\beta$ -Faltblattsystem aufgebaut ist. Die Substratbindung erfolgt durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen in der „Furche“ des „nierenförmigen“ Proteinmoleküls (Raines 1999, Abb. 6 rechts). Von den die Sekundärstrukturelemente verbindenden *loop*-Strukturen weist lediglich die Sequenz Asp14–Ser23, die die Helices I und II verbindet, keine intramolekularen Wechselwirkungen auf (Wlodawer *et al.* 1982). Vier Disulfidbrücken, die maßgeblich zur thermodynamischen Stabilität beitragen (Klink *et al.* 2000), verklammern das Proteinmolekül. RNase A besitzt vier Prolinreste, von denen im nativen Protein jeweils zwei (Pro42 und Pro117) in *trans*- bzw. *cis*-Konfiguration (Pro93 und Pro114) vorliegen (Abb. 7).

### 4.1.1 Faltung und Entfaltung von RNase A

Anfinsen *et al.* (Anfinsen *et al.* 1961) konnten zeigen, dass RNase A, deren Disulfidbrücken in 8 M Harnstoff durch Mercaptoethanol reduziert worden waren, nach Entfernen beider Agenzien durch Dialyse unter oxidierenden Bedingungen spontan wieder aktives Protein liefert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Information zur Ausbildung der nativen Struktur in der Aminosäuresequenz der Proteine verschlüsselt ist (Anfinsen 1973). Auf die kinetischen Limitierungen dieses Ansatzes ist bereits in Kapitel 2.2 eingegangen worden.

Das Zweizustandsmodell ist für die Beschreibung des Gleichgewichts der Entfaltung der RNase A aufreichend; eine Übereinstimmung von  $\Delta H_{cal}$  und  $\Delta H_m$  zeigt, dass im Gleichgewicht keine Intermediate in detektierbaren Konzentrationen populiert werden (Jackson and Fersht 1991). Nachdem Tsong *et al.* (Tsong *et al.* 1972) gezeigt hatten, dass die temperaturinduzierte Faltung und Entfaltung von RNase A ein biphasiger Prozess ist, wurden durch Garel und Baldwin (Garel and Baldwin 1973) erstmals parallele Faltungswege vom entfalteten zum nativen Protein (d.h. von zwei entfalteten Spezies  $U_f$  und  $U_s$ , wobei die Indizes „f“ und „s“ für *fast* bzw. *slow* stehen) postuliert und nachgewiesen. Zudem wurde festgestellt, dass auch  $U_s$  nicht homogen ist; die Spezies mit der geringeren Amplitude, die auch ein kleineres  $k_f$  aufweist, wurde als  $U_s^I$  bezeichnet, die schneller faltende Spezies als  $U_s^{II}$  (Schmid and Blaschek 1981). Als Ursache für das Auftreten langsamer Faltungsphasen wurde von Brandts *et al.* (Brandts *et al.* 1975) die *cis-trans*-Isomerisierungsreaktion von Xaa-Prolin-Peptidbindungen postuliert, was durch eine Denaturansunabhängigkeit im Gegensatz zu einer starken Temperaturabhängigkeit von  $k_f$  für die langsame Phase von RNase A, d.h. die Faltung von  $U_s$ , gestützt wurde (Nall *et al.* 1978). Bestätigt wurde dieses Postulat zudem dadurch, dass sowohl starke Säuren (Schmid and Baldwin 1978) als auch eine PPIase (Fischer and Bang 1985), die später als Cyclophilin 18 identifiziert wurde (Fischer *et al.* 1989), die Geschwindigkeitskonstante der langsamen Phase der RNase A-Faltung erhöhen. Durch Doppelsprungexperimente konnte aufgeklärt werden, dass die Xaa-Pro-Isomerisierung nach der konformationellen Faltungsreaktion erfolgt (Cook *et al.* 1979); das auf diese Weise populierte *native-like intermediate* ( $I_N$ ) ist bezüglich seiner Absorptionseigenschaften (Cook *et al.* 1979) und katalytischen Aktivität identisch zum nativen Protein (Schmid and Blaschek 1981), unterscheidet sich von diesem jedoch in seinen Fluoreszenzeigenschaften (Schmid 1981) und durch (wenigstens) ein Prolin in nicht-nativer Konfiguration (Cook *et al.* 1979). In den folgenden Studien konnten zahlreiche Informationen zum Gesamtfaltungsgeschehen und zu auftretenden Intermediaten ( $I_1$ ,  $I_N$ ) zusammengetragen werden (Blum *et al.* 1978; Kim

and Baldwin 1980; Schmid 1981; Schmid and Blaschek 1981; Udgaonkar and Baldwin 1990; Rabow and Scheraga 1993; Udgaonkar and Baldwin 1995; Laurents *et al.* 1998), das sich insgesamt so zusammenfassen lässt (die Prozentangaben entsprechen der jeweiligen Signalamplitude):



Weitere Studien konzentrierten sich vor allem auf die Aufklärung der Rolle der Prolinisomerisierungsreaktionen. Während für die Faltung von  $U_s^{II}$  und  $U_s^I$  die Involvierung von Prolinisomerisierungen nachgewiesen werden konnte, stellt  $U_f$  eine entfaltete RNase A-Spezies dar, die ohne Limitierung durch Prolinisomerisierungen faltet. Aufgrund der *cis:trans*-Verteilung der Konfiguration von Xaa-Pro-Bindungen in Peptiden (s. Kapitel 2.4.2) wurde jedoch, da native RNase A je zwei *cis*- (Pro93 und Pro114) und *trans*-Proline (Pro42 und Pro117) enthält (Wlodawer *et al.* 1982), postuliert, dass nur in ca. 4% aller entfaltenen RNase A-Moleküle alle Xaa-Pro-Bindungen in ihrer nativen Konfiguration vorliegen. Durch den Einsatz spezieller Reaktionsbedingungen (niedrigerer pH-Wert, Guanidiniumhydrochlorid-(GdnHCl)-Konzentration) konnte in der Tat eine Aufspaltung von  $U_f$  in  $U_{vf}$  (*very fast*) und  $U_f$  erreicht werden; für  $U_f$  wurde unter diesen Bedingungen ein *trans*-Pro114 postuliert (Houry *et al.* 1994). Zudem wurde eine intermediär schnell faltende Spezies ( $U_m$ ) nachgewiesen (Houry and Scheraga 1996); der Anteil von  $U_{vf}$  und  $U_m$  wurde zu jeweils ca. 4% aller entfaltenen RNase A-Moleküle bestimmt (Wedemeyer *et al.* 2002). Bedeutende Fortschritte konnten zudem durch mittels *genetic engineering* erzeugte Mutanten erreicht werden (Schultz and Baldwin 1992; Schultz *et al.* 1992; Dodge and Scheraga 1996; Schultz *et al.* 1998; Xiong *et al.* 2000; Schultz *et al.* 2005). Die Substitution von Prolin gegen zumeist Alanin führte dabei zum Wegfall einzelner Faltungsphasen, so dass (indirekt, aber erwartungsgemäß) gezeigt werden konnte, dass *trans*-Pro42 die Faltung von RNase A nicht beeinflusst, *trans*-Pro117 dies nur in geringem Maße tut und dass das komplexe Faltungsverhalten der RNase A vor allem durch die *cis*-Proline 93 und 114 hervorgerufen wird (Schultz *et al.* 1992; Dodge and Scheraga 1996; Wedemeyer *et al.* 2002). Ein umgekehrter Ansatz – das Fixieren von *cis*-Pro in seiner nativen Konfiguration auch unter denaturierenden Bedingungen – wurde durch eine *expressed protein ligation* (Muir *et al.* 1998) oder *intein-mediated protein ligation* (Evans *et al.* 1998) genannte und auf der *native chemical ligation* (Dawson *et al.* 1994) basierenden Methode möglich. Durch Einführung von zwei Methylgruppen am C<sub>5</sub> des Prolinrings (5',5'-

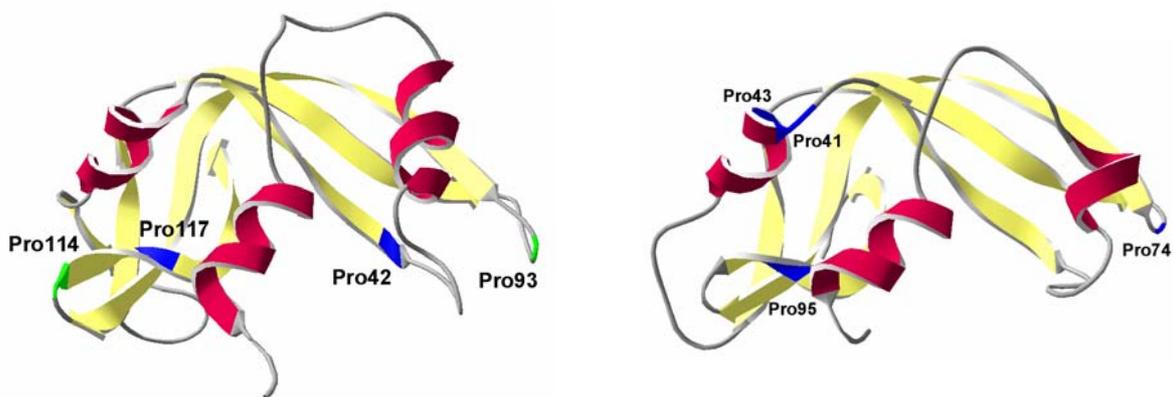
dimethylprolin, dmP) kann es aus sterischen Gründen nicht mehr zur Isomerisierung der Peptidbindung in die *trans*-Konfiguration kommen (An *et al.* 1999; Čerovský and Scheraga 2005). Das Ersetzen von *cis*-Pro114 durch dmP in eigenen Studien führte tatsächlich zu einer Stabilisierung des RNase A-Moleküls aufgrund einer beschleunigten Faltung (Arnold *et al.* 2003). Mit dieser Arbeit gelang der direkte Beweis der Involvierung einer Prolinisomerisierungsreaktion in das Faltungsgeschehen (von U<sub>S</sub>) der RNase A.

Neben Faltungsstudien war und ist auch die Entfaltung von RNase A Gegenstand intensiver experimenteller Studien, da auch hier eine biphasige Reaktion beobachtet worden war (Tsong *et al.* 1972; Rehage and Schmid 1982; Schmid *et al.* 1986; Kiefhaber and Schmid 1992). Dabei entfaltet native RNase A zunächst zu U<sub>f</sub> (konformationelle Entfaltung), aus dem nachfolgend durch Prolinisomerisierungsreaktionen U<sub>s</sub> entsteht (Garel and Baldwin 1973; Nall *et al.* 1978; Lin and Brandts 1983; Schmid *et al.* 1986; Juminaga *et al.* 1998). Der Übergang von N nach U<sub>f</sub> stellt dabei eine Ein-Schritt-Reaktion ohne Intermediate dar (Kiefhaber and Baldwin 1995; 1996; Loh *et al.* 1996), wobei jedoch Anzeichen für einen *dry molten globule* gefunden wurden, bei dem die Konformation des Peptidrückgrats zwar noch der nativen Konformation entspricht, einige Aminosäureseitenketten jedoch schon frei rotieren können (Kiefhaber *et al.* 1995).

#### 4.1.2 Untersuchungen zur Stabilität und Faltung von Mitgliedern der RNase A-Superfamilie

RNase A ist der namengebende Vertreter einer Superfamilie, deren Mitglieder aus einer Vielzahl von Säugern, Vögeln, Reptilien und Amphibien isoliert wurden (Beintema *et al.* 1997). Offenbar ist sie die einzige vertebratenspezifische Enzymfamilie (Cho *et al.* 2005), wobei Vertreter in der Klasse der Fische erst kürzlich gefunden wurden (Pizzo *et al.* 2006). Es sind pyrimidinspezifische RNasen mit einer sehr ähnlichen Tertiärstruktur, obwohl die Aminosäuresequenz um mehr als 50% zwischen den Mitgliedern differieren kann. Aufgrund der Vielzahl der RNasen besteht leider keine einheitliche Nomenklatur. Die RNase A-Superfamilie ist in neun Klassen unterteilt, wobei die Klasse 1 die Säuger-RNasen vom Pankreastyp (wie z.B. RNase A oder die humane pankreatische RNase, RNase 1) umfasst (Beintema *et al.* 1997). Verwirrend hingegen ist z.B., dass die humane RNase 5, das Angiogenin (Zhang *et al.* 2002), zu den RNasen der Klasse 4, den Säuger-Angiogeninen, gehört (Beintema *et al.* 1997).

Da die Mitglieder der RNase A-Superfamilie häufig thermodynamisch recht stabil sind, war es nahe liegend, die Stabilitäts- und Faltungsstudien eben auch auf die anderen Vertreter sowie auf Mutanten und chemisch erzeugte Varianten auszuweiten. Dabei zeigte sich beispielsweise, dass der Kohlenhydratanteil der (in der Aminosäuresequenz zur RNase A identischen) RNase B (Plummer and Hirs 1963) die Faltung nicht beeinflusst (Grafl *et al.* 1987), jedoch die thermodynamische Stabilität durch eine Verlangsamung der Entfaltungsreaktion erhöht wird (Puett 1973; Joao *et al.* 1992; Joao and Dwek 1993; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997). Die Faltungsreaktion von RNase A-Homologen (pankreatische Ribonucleasen aus anderen Säugerorganismen oder andere RNasen der Superfamilie wie z.B. das in die Blutgefäßbildung involvierte Angiogenin oder Onconase, eine RNase aus Eizellen des Nördlichen Leopardfroschs *Rana pipiens*) erwies sich dabei trotz einer z.T. recht unterschiedlichen Anzahl von (*cis*-)Prolinen als ähnlich komplex wie die der RNase A (Krebs *et al.* 1983; Lang *et al.* 1986; Pradeep *et al.* 2006; Schulenburg *et al.* 2007) (Abb. 7).



**Abb. 7:** Tertiärstrukturen von RNase A (links, PDB 7rsa) und Onconase (rechts, PDB 1ONC). Die Modelle wurden mit dem Programm SwissPDBViewer v3.7 erstellt. Helices (rot) und Faltblätter (gelb) sind als Bänder dargestellt. Die Prolinreste (blau für *trans*-, grün für *cis*-Konfiguration) sind angezeigt.

Ungeachtet einer sehr ähnlichen Tertiärstruktur und Größe der verschiedenen Vertreter der RNase A-Superfamilie differiert deren thermische (thermodynamische) Stabilität erheblich. Angiogenin weist eine Übergangstemperatur von etwa 47°C (nach Maeda *et al.* 2002) gegenüber 56°C für RNase 1, (Leland *et al.* 2001), 64°C für RNase A (Ramos and Baldwin 2002, Anlage **A9**), 75°C für die homologe RNase aus *Rana catesbeiana* (Okabe *et al.* 1991) und 90°C für Onconase (Leland *et al.* 1998; Notomista *et al.* 2000, Anlage **A12**) auf. Die strukturellen Unterschiede bieten eine hervorragende Möglichkeit, den Einfluss von Strukturänderungen auf die Stabilität von Proteinen zu untersuchen. Interessante Einblicke in die Mechanismen, die zur Ausbildung und Stabilisierung der nativen Struktur des

RNase A-Moleküls führen, sowie zur biologischen Funktionalität lieferten zudem zahlreiche Studien an RNase A-Mutanten (Coll *et al.* 1999; Klink and Raines 2000; Chatani *et al.* 2002; Köditz *et al.* 2004; Font *et al.* 2006) sowie chemisch modifizierte Varianten (Lin *et al.* 1985; Richardson *et al.* 1990; Hondal *et al.* 2001; Arnold *et al.* 2002; Safarian *et al.* 2003, Anlage A9).

### 4.1.3 Proteolysestudien zu RNase A

Ähnlich intensiv ist der proteolytische Abbau von RNase A durch die verschiedensten Proteasen unter einer Vielzahl von Bedingungen untersucht worden, angefangen von den Studien zur Sequenzaufklärung (Hirs *et al.* 1956a; Hirs *et al.* 1956b) über den Temperatureinfluss (Ooi *et al.* 1963; Rupley and Scheraga 1963; Klee 1967) oder Denaturationskonzentrations-einfluss (Yang and Tsou 1995; Polverino de Laureto *et al.* 1997) bis hin zur Methodenentwicklung spezieller Proteolyseverfahren (Imoto *et al.* 1986; Lang and Schmid 1986). Insbesondere die Arbeiten aus der Arbeitsgruppe um Harold A. Scheraga (Ooi *et al.* 1963; Rupley and Scheraga 1963; Burgess *et al.* 1975), die (in Kombination mit anderen Daten, z.B. Klee 1967) 1975 in ein Modell zur stufenweisen thermischen Entfaltung von RNase A mündeten (wobei hier *nicht* zwischen primären Proteolyseereignissen und Folgeabbau unterschieden wurde), bestimmten für lange Zeit das Bild zur Entfaltung von RNase A (Burgess and Scheraga 1975). Untersuchungen mittels *pulse*-Experimenten unter Verwendung von Pepsin (Schmid and Blaschek 1984) bzw. Carboxypeptidas A (Teschner and Rudolph 1989) ergaben, dass der C-Terminus der RNase A frühzeitig im Faltungsprozess resistent gegen einen proteolytischen Angriff wird (entsprechend  $I_1$  auf dem Faltungsweg von  $U_s^{II}$  zu N), die *loop*-Region zwischen  $\alpha$ -Helix II und dem ersten  $\beta$ -Faltblatt jedoch erst mit Ausbildung von  $I_N$  (Lang and Schmid 1986). Unter Faltungsbedingungen, unter denen diese Intermediate nicht populiert werden (d.h. unter *marginally native conditions*) folgt die Proteolyseresistenzausbildung hingegen der Bildung von N. Mittels *isomer specific proteolysis* konnten Lin und Brandts (Lin and Brandts 1983) zeigen, dass Pro93 erst während der Reaktion von  $I_N$  nach N seine native *cis*-Konfiguration einnimmt, was den spektroskopischen Daten (Kapitel 4.1.1) entspricht. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Angreifbarkeit durch Ficin parallel zur globalen thermischen Entfaltung verläuft (Winchester *et al.* 1970) und dass eben die Region zwischen  $\alpha$ -Helix II und dem ersten  $\beta$ -Faltblatt unter Entfaltungsbedingungen als erste für einen proteolytischen Angriff durch Trypsin und Thermolysin empfindlich wird (Arnold *et al.* 1996), was zur Postulierung dieser Region als Entfaltungsregion der RNase A, d.h. derjenigen Region, deren Entfaltung die globale Entfaltung des Proteinmoleküls initiiert (Schellenberger and Ulbrich 1989; Ulbrich-Hofmann *et al.* 1993; Ulbrich-Hofmann *et al.* 1999; Eijsink *et al.* 2004), führte.

#### 4.1.4 RNasen als Therapeutikum

Einige Vertreter der RNase A-Superfamilie weisen neben dem digestiven Abbau von RNA eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten (wie Blutgefäßbildung, Zyto-, Spermato- und Embryotoxizität) auf, was zu dem Begriff RISBASE (*ri*bonuclease *with special biological action*, D'Alessio 1993) führte. Neben Angiogenin fanden hier v.a. der einzige dimere RNase A-Superfamilienvertreter, die RNase aus Rindersamen (*bovine seminal RNase*, BS-RNase), und die Ranpirnase oder Onconase<sup>®</sup> (Alfacell Co., Bloomfield, NJ) Interesse. Beide RNasen werden im Gegensatz zu RNase A *in vitro* nicht vom intrazellulären Ribonucleaseinhibitorprotein gebunden (Murthy and Sirdeshmukh 1992; Boix *et al.* 1996), was sie zum Ausgangspunkt für die Entwicklung von auf RNasen basierenden Tumortheraeutika machte (Leland *et al.* 1998; Rybak and Newton 1999; Bosch *et al.* 2004; De Lorenzo *et al.* 2004; Rutkoski *et al.* 2005; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2006; De Lorenzo *et al.* 2007). Onconase hat dabei Phase III klinischer Testungen erreicht (Costanzi *et al.* 2005; Pavlakis and Vogelzang 2006); andere Bestrebungen gehen dahin, auf Säuger-RNasen basierende Therapeutika zu generieren. Target ist hier v.a. RNase 1, auf deren Basis (durch Fusion mit einem Antikörper gegen den ErbB-2-Rezeptor) eine zytotoxische „Immuno-RNase“ generiert werden konnte (De Lorenzo *et al.* 2007). Onconase ist jedoch aufgrund ihrer hohen thermischen Stabilität (Leland *et al.* 1998; Arnold *et al.* 2006) für *in vivo*-Applikationen interessant, da eine hohe Thermostabilität i.d.R. mit einer hohen *in vivo*-Stabilität, insbesondere gegen Proteasen, verbunden ist (McLendon and Radany 1978; Daniel *et al.* 1982; Parsell and Sauer 1989). In der Tat deuten Experimente mit Pepsin und Chymotypsin (Notomista *et al.* 2000), Proteinase K (Kim *et al.* 2004) sowie Thermolysin, Boilysin und Proteinase K (s. Kapitel 5.6) eine deutlich erhöhte Proteolyseresistenz im Vergleich zu RNase A an.

## 5 Zusammenfassung der Forschungsergebnisse zur Diskriminierung lokaler und globaler Strukturänderungen von Proteinen mittels Proteolyse am Beispiel von RNase A und RNase A-Varianten

### 5.1 Quantifizierung der Proteolyseempfindlichkeit nativer Proteine

(Anlagen A1, A2)

Da Modellpeptide, die zur Charakterisierung der kinetischen Parameter von Proteasen verwendet werden, meistens kurze Oligopeptide sind, bilden sie keine Strukturen aus. Beim Abbau von Proteinen haben jedoch die Zugänglichkeit der potenziellen Spaltstellen, die Flexibilität der entsprechenden Strukturregion und die Aminosäuresequenz einen enormen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse, insbesondere durch die Beeinflussung des  $K_M$ -Wertes, d.h. der Assoziation von Protein und Protease.



Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert ist hingegen relativ unabhängig von der die zu spaltende Peptidbindung flankierenden Sequenz. Erkenntnisse über die Abbaukinetik und den Einfluss struktureller Änderungen erlauben die Modulation der proteolytischen Angreifbarkeit von Proteinen, indem durch Veränderung der Primärstruktur und/oder Zugänglichkeit und/oder Flexibilität die Proteolyseempfindlichkeit herabgesetzt oder erhöht werden kann.

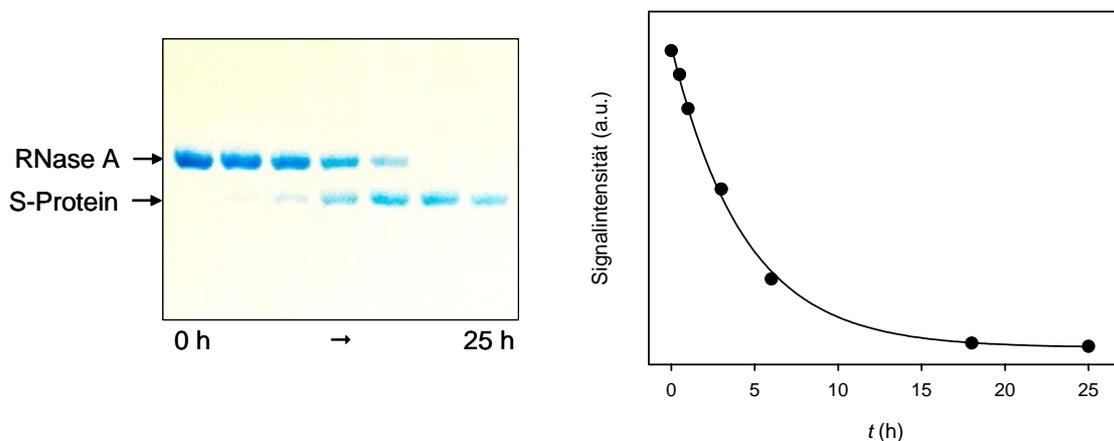
Unter experimentellen Bedingungen liegt die Ausgangsproteinkonzentration (meistens ca.  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ , entsprechend ca.  $1\text{--}10 \text{ }\mu\text{M}$ ) in der Nähe des  $K_M$ -Wertes der Proteasen oder darunter, so dass die Abnahme der Proteinkonzentration einer Reaktion (pseudo-)erster Ordnung folgt (Anlage A1). Es gilt

$$A_t = A_0 \cdot \exp(-k_p \cdot t) \quad (16)$$

wobei  $A_0$  das Messsignal für das Protein (entspricht der Proteinkonzentration) zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ s}$ ,  $A_t$  das Messsignal für das Protein zum Zeitpunkt  $t$  und  $k_p$  die Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse darstellt.

Die Messung erfolgt dabei diskontinuierlich, d.h. dass aus einem Reaktionsansatz nach definierten Zeitintervallen Aliquots entnommen werden und die Proteolyse durch Zugabe eines geeigneten Inhibitors abgestoppt wird (die früher z.B. von Rupley (Rupley and Scheraga 1963) oder Klee (Klee 1967) angewendete pH-Stat-Methode wird, da hier der meist intensivere Folgeabbau die Ergebnisse verfälscht, nicht mehr verwendet). Für eine Quantifizierung der verbliebenen Konzentration an intaktem Protein sind verschiedene Verfahren denkbar, die jeweils methodenimmanente Limitierungen aufweisen:

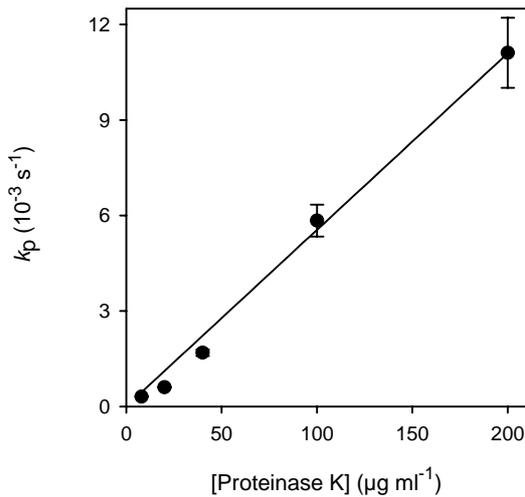
- Aktivitätstest: Dieser ist nur bei Enzymen als Substratprotein möglich, wobei das intakte Enzym auch nach dem Abstoppen der Proteolysereaktion noch aktiv sein muss und das proteolytisch gespaltene Protein nicht mehr aktiv sein darf. Von Vorteil ist, dass meist nur geringe Proteinmengen erforderlich sind.
- Chromatographie: Hier bietet sich insbesondere die RP-HPLC als hochleistungsfähige Trennmethode mit nachfolgender Integration der erhaltenen Peakflächen an. Ggf. sind gleichzeitig eine Charakterisierung der Fragmente (Kombination *liquid chromatography/mass spectrometry*, LC/MS) und Aussagen über die Kinetik des Folgeabbaus möglich. Eventuell vorhandene Disulfidbrücken müssen vor der Trennung reduziert (und die freien Thiolgruppen modifiziert) werden. Zudem sind unterschiedliche Laufeigenschaften von intaktem Protein und Fragmenten erforderlich; die Nachweisgrenze der Proteine/Fragmente ist abhängig von den chromophoren Gruppen im Protein.
- Elektrophorese: I.d.R. findet die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Anwendung, bei der (nach Reduktion eventuell vorhandener Disulfidbrücken) die Proteine bzw. Fragmente nach ihrer Größe getrennt werden. Nachweis- und Quantifizierungsmethoden bieten die Coomassie-Färbung (Abb. 8) oder die Western-Blot-Technik. Ggf. sind nachfolgend (nach Blotten oder Elution) eine Charakterisierung der Fragmente (N-terminale Sequenzierung und/oder MS) sowie Aussagen über die Kinetik des Folgeabbaus möglich. Für eine ausreichende Trennbarkeit müssen sich intaktes Protein und (detektierbare) Fragmente um wenigstens 10% in ihrer Masse unterscheiden.



**Abb. 8:** SDS-PAGE-Gel des proteolytischen Abbaus eines nativen Proteins am Beispiel von RNase A durch Subtilisin (1/1000 w/w) bei 15°C (links; deutlich zu sehen ist das S-Protein der *nicked* RNase A, Fragment 21-124, s.u.) und densitometrische Auswertung nach Coomassiefärbung (rechts).

Unter der Voraussetzung, dass das native Protein Substrat für die Protease P ist, ergibt die  $k_p$  vs. [P]-Auftragung eine lineare Abhängigkeit wie für Peptidsubstrate (Anlage A1). Es können nun die  $k_p$ -Werte für verschiedene Proteine (v.a. von homologen Proteinen) mit ein und derselben Protease oder die  $k_p$ -Werte für ein Protein mit verschiedenen Proteasen miteinander verglichen werden und somit Aussagen über die eingangs beschriebenen Charakteristika erhalten werden. Da die Unterschiede in den  $k_p$ -Werten für verschiedene Proteine mitunter beträchtlich sind, ist es sinnvoll, verschiedene Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Proteasekonzentrationen zu verwenden; der (lineare) Anstieg in der daraus erstellbaren  $k_p$  vs. [P]-Auftragung ist ein statistisch genaueres Maß für die Proteolyseempfindlichkeit. Abweichungen von einer Linearität zeigen zusätzliche Abbaumechanismen an (s.u.), welche einen direkten Vergleich der Proteolyseempfindlichkeit nativer Proteine erschweren.

RNase A wird unter nativen Bedingungen durch die unspezifischen Proteasen Subtilisin (Richards and Vithayathil 1959), Elastase (Klee 1965) und Proteinase K (Rauber *et al.* 1978) durch primäre Spaltung von Peptidbindungen in dem äußerst flexiblen *loop* um Ala20 (Abb. 6) abgebaut. Der Umsatz erfolgt dabei nahezu vollständig, bevor ein Folgeabbau detektierbar wird. Gegenüber kleinen Substraten (z.B. AlaAlaAla) weisen alle drei Proteasen eine ähnliche Aktivität auf ( $k_{cat}/K_M \approx 1000 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , <http://www.brenda.uni-koeln.de/>, Müller *et al.* 1994), wobei diejenige von Subtilisin geringfügig höher ist. Dennoch beträgt die Abbaugeschwindigkeit bei gleicher Proteasekonzentration für Subtilisin nur etwa 1/4, für Elastase sogar nur 1/60 von der für Proteinase K (Anlage A2), was sich nur durch Effekte von außerhalb der direkten Spaltstelle liegenden Aminosäureresten oder Strukturen der RNase A erklären lässt. Für die  $k_p$  vs. [P]-Kurve konnte für Proteinase K eine lineare Abhängigkeit bestimmt werden (Abb. 9, Anlage A2), was den Abbau über das native RNase A-Molekül anzeigt. Für Subtilisin wurde eine geringfügige Abweichung von einer Linearität beschrieben (wie auch für die glykosylierte Form der RNase A, die RNase B, s.u.; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997). Durch Ersetzen von Ala20 gegen Prolin wurde die einzige identifizierte primäre Spaltstelle für Proteinase K entfernt; dennoch lieferte auch für A20P-RNase A die  $k_p$  vs. [P]-Auftragung eine lineare Abhängigkeit, was einen Abbau über das native Protein belegt (Anlage A2). Aufgrund des stark verlangsamten primären Abbaus kam es für A20P-RNase A jedoch zu keiner Akkumulation von Fragmenten, so dass nicht entschieden werden konnte, ob der Abbau weiterhin (jedoch stark verlangsamt) durch die Spaltung von Ala20-Ser21 oder durch die (generell deutlich langsamere) Spaltung einer anderen Peptidbindung initiiert wird.



**Abb. 9:** Abhängigkeit von  $k_p$  für RNase A von der Proteinase K-Konzentration. Die Proteolysereaktionen wurden bei 25°C in 50 mM Tris-HCl -Puffer, der 1 mM  $\text{CaCl}_2$  enthielt, durchgeführt und die  $k_p$ -Werte wurden mittels SDS-PAGE und densitometrischer Auswertung bestimmt (Anlage A2).

## 5.2 Einfluss von Modifizierungen der Primärstruktur auf die Proteolyseempfindlichkeit nativer Proteine

(Anlagen A1-4)

### 5.2.1 Erhöhung der Proteolyseresistenz durch Aminosäuresubstitutionen

Während homologe Proteine häufig signifikante Unterschiede in der Primärstruktur aufweisen, aus denen Strukturänderungen und damit deutliche Stabilitäts- und Proteolyseempfindlichkeitsänderungen resultieren (Stein and Fischer 1958; Endo *et al.* 1985; Young *et al.* 2007), unterscheiden sich Proteine in ihrer Wildtypform von ihren Isoformen oder mittels *genetic engineering* erzeugten Mutanten üblicherweise nur in einer bzw. wenigen Aminosäureposition(en), so dass eine veränderte Proteolyseempfindlichkeit eindeutig diesen (Primär-)Strukturänderungen zugeschrieben werden kann (solange sich nicht der Abbauweg dadurch generell ändert). Diese mögliche Änderung der Proteolyseempfindlichkeit kann man sich nun auch zunutze machen, indem durch Aminosäureaustausche potenzielle bzw. identifizierte primäre Spaltstellen eliminiert bzw. ihre Zugänglichkeit/Flexibilität eingeschränkt werden. Als realisierbare Möglichkeiten gelten die Substitution von Aminosäureresten an der primären Spaltstelle („Ladungskonzept“: geladene gegen ungeladene Aminosäure bzw. umgekehrt oder „Prolinkonzept“: Aminosäure gegen Prolin; Frenken *et al.* 1993) oder die Einführung von Disulfidbrücken (Mansfeld *et al.* 1997).

Durch Ersetzen von Ala20 in RNase A gegen Prolin, welches von allen drei Proteasen weder in  $P_1$  noch in  $P_1'$ -Position als Substrat akzeptiert wird (Brömme *et al.* 1986), kam es für Proteinase K und Subtilisin zu einer etwa 300fachen Abnahme von  $k_p$ ; auf den Abbau durch Elastase hatte diese Substitution keinen Einfluss (Anlage A2). Dennoch lieferte die  $k_p$  vs.

[Proteinase K]-Auftragung eine lineare Abhängigkeit, was einen Abbau auch von A20P-RNase A über das native Protein anzeigte. Während also für Proteinase K und Subtilisin die Involvierung von Ala20 in die Primärspaltung von RNase A gezeigt werden konnte, widersprachen die Ergebnisse einer Primärspaltung von Ala19–Ala20 durch Elastase mit nachfolgender Abspaltung von Ala20 (Klee 1965). Vielmehr waren die Fragmente Lys1–Ala19 und Ser22–Val124 identifiziert worden, die Ala19–Ala20 und/oder Ser21–Ser22 als primäre Spaltstellen suggerierten (Anlage A2). Für die Mutante S21P-RNase A würde sich das Pro21 für die Spaltung 20–21 in P<sub>1</sub>'-, für 21–22 jedoch in P<sub>1</sub>-Position befinden. Erwartungsgemäß zeigte sich für Proteinase K ein ähnlich verlangsamer Abbau wie für A20P-RNase A und für Subtilisin sogar eine nochmalige Verlangsamung um das 7fache (Anlage A3). Mit Elastase war im Gegensatz zur A20P-RNase A für die S21P-RNase A kein Abbau mehr detektierbar (Anlage A3), was eindeutig eine Primärspaltung von Ser21–Ser22 belegt, da Prolin von Elastase zwar in P<sub>2</sub>-Position, wie im Fall von A20P-RNase A, akzeptiert, jedoch nicht in P<sub>1</sub>-Position (Thompson and Blout 1973). Der nach dem Ladungskonzept die Proteolyseempfindlichkeit herabsetzende Effekt der Mutation S21K betrug für Subtilisin und Proteinase K (P<sub>1</sub>'-Position) etwa den Faktor 10, für Elastase (P<sub>1</sub>-Position) hingegen etwa 50 (Anlage A3), was die Überlegenheit des Prolinkonzepts über das Ladungskonzept anzeigt.

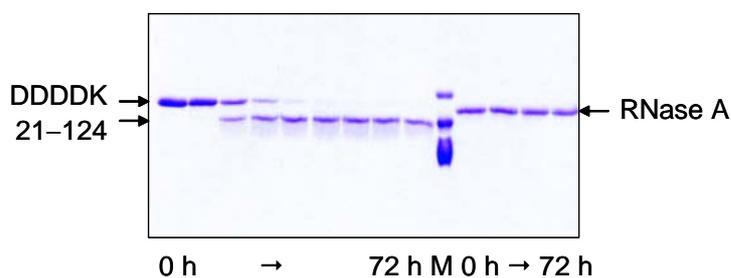
### 5.2.2 Spezifische Abbaubarkeit von Proteinen durch Einführung von potenziellen Spaltstellen

Umgekehrt zum unter 4.3.1. beschriebenen Verfahren können in flexible Regionen der Proteinstruktur entsprechende Spaltstellen eingeführt werden, um einen proteolytischen Abbau unter nativen Bedingungen zu modulieren bzw. erst zu ermöglichen (Anlage A1). Unter nativen Bedingungen ist RNase A gegen einen proteolytischen Angriff durch Trypsin oder Thermolysin nahezu resistent (Arnold *et al.* 1996). Die Oberflächenexposition und hohe Flexibilität des *loops* um Ala20, der in RNase A keine Spaltstelle für Trypsin oder Thermolysin aufweist, ließ diesen als geeignet erscheinen, um durch Einführung entsprechender Spaltstellen einen Abbau des nativen RNase A-Moleküls durch diese Proteasen zu ermöglichen (Anlage A1). Mittels ortsgerichteter Mutagenese wurde Ser21 gegen Lys (für Trypsin) bzw. Leu (für Thermolysin) ersetzt, wodurch weder die Aktivität noch die Stabilität des RNase A-Moleküls signifikant verändert wurde (Köditz 2004). Für beide Varianten führten die Substitutionen (S21K bzw. S21L) zu einem signifikanten Abbau unter nativen Bedingungen, wobei  $k_p$  im Vergleich zu  $k_p$  für RNase A für Trypsin deutlich stärker anstieg als für Thermolysin. Als Ursache für diesen unterschiedlichen Anstieg der

Proteolyseempfindlichkeit wurde die unterschiedliche Topologie der jeweiligen aktiven Zentren verantwortlich gemacht (Anlage A1).

Eine sehr interessante Anwendung ist die gezielte Aktivierung von Proteinen (Zymogenaktivierung, Plainkum *et al.* 2003). In diesem speziell Fall wurden N- und C-Terminus der RNase A mit einem Peptid-linker verbunden, der das aktive Zentrum der RNase A blockiert und eine Spaltsequenz für Plasmeprin II, eine sehr spezifische Protease des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* eingeführt. Auf diese Weise wurde erreicht, dass RNase A erst nach Spaltung des Peptid-linkers katalytisch aktiv vorlag und so nur in infizierten Zellen zytotoxisch wirken konnte.

Eine Spaltbarkeit von Peptidbindungen in flexiblen Regionen wird auch genutzt, um z.B. tags, die zu Reinigungszwecken mit dem entsprechenden Zielprotein fusioniert wurden, nach der Proteinreinigung wieder abzuspalten. In eigenen Arbeiten wurde die hohe Substratspezifität der Protease Enterokinase zur Herstellung hochreinen S-Proteins (Ser21-Val124 von RNase A) genutzt (U. Arnold, unveröffentlichte Daten). Durch Kombination mit dem S-Peptid (Lys1-Ala20; molares Verhältnis 1:1) lässt sich katalytisch voll aktives Protein wiederherstellen. Auf diese Weise kann zum einen der Katalysemechanismus der RNase A untersucht werden (das S-Peptid enthält mit His12 einen Aminosäurerest des aktiven Zentrums), zum anderen kann dieses System genutzt werden, um die Expression von Proteinen (mit dem S-Peptid als tag) zu verfolgen. Zwischen Ala20 und Ser21 wurde die Erkennungssequenz Asp-Asp-Asp-Asp-Lys eingeführt (die Spaltung erfolgt C-terminal des Lys), so dass nach Inkubation in Gegenwart von Enterokinase eine schnelle Spaltung erfolgt; das entstehende Fragment Ser21-Val124 ist wie auch RNase A gegenüber einem weiteren Angriff durch Enterokinase vollständig resistent (Abb. 10).



**Abb. 10:** Vergleich des proteolytischen Abbaus von A20<DDDDK>S21-RNase A (DDDDK, links) und RNase A (rechts) durch Enterokinase. Beide Proteine ( $0,15 \text{ mg ml}^{-1}$ ) wurden für 0-72 h mit Enterokinase ( $16 \text{ U ml}^{-1}$ ) bei  $25^\circ\text{C}$  inkubiert. Das entstehende Fragment der A20<DDDDK>S21-RNase A wurde mittels Massenspektrometrie (11 536 Da) als das erwartete Fragment 21-124 (errechnete Molekülmasse 11 534 Da) identifiziert. Gezeigt sind zudem die Markerproteine (M) Soyabohnen-Trypsininhibitor (21 kDa), Cytochrom c (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa).

### 5.2.3 Einfluss von Aminosäuremodifizierungen auf die Proteolyseempfindlichkeit

Den Großteil der Änderungen der Proteinstruktur stellen Aminosäureaustausche, mitunter auch Insertionen oder Deletionen dar, jedoch können auch Modifizierungen der Aminosäureseitenketten eine Änderung der Proteolyseempfindlichkeit hervorrufen. Häufigste Modifizierungen sind Glykosylierungen oder Phosphorylierungen, seltener Lipidierungen usw. Hierbei kommt es durch eine Abschirmung der potenziellen Spaltstellen, durch eine Modifizierung der Aminosäurereste dahingehend, dass sie von der Protease nicht mehr als Substrat erkannt werden, oder durch eine Herabsetzung der Flexibilität der entsprechenden Region zu einer Verminderung der Proteolyseempfindlichkeit. Neben der unglykosylierten RNase A kommen im Rinderpankreas die ausschließlich am Asn34 glykosylierte RNase B sowie höherglykosylierte Formen vor (Plummer and Hirs 1963). Da in eigenen Studien gezeigt werden konnte, dass die thermodynamische wie auch die kinetische Stabilität der RNase B geringfügig höher als die der RNase A ist (Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997), sollten Veränderungen in der Proteolyseempfindlichkeit direkt auf die Glykosylierung zurückgeführt werden können. Ein Vergleich der katalytischen Aktivität von RNase A bzw. RNase B nach Inkubation in Gegenwart verschiedener Proteasen hatte eine erhöhte Proteolyseresistenz der RNase B angezeigt (Birkeland and Christensen 1975). Der Abbau durch Subtilisin wird auch in RNase B durch die Spaltung der Peptidbindung Ala20-Ser21 initiiert, wie die Analyse der Primärfragmente bewies (Anlage A4). Obwohl eine sterische Abschirmung der Peptidbindung Ala20-Ser21 aufgrund der hohen Flexibilität des Kohlenhydratrestes ausgeschlossen werden kann (Woods *et al.* 1994), sank  $k_p$  für RNase B im Vergleich zu RNase A (Anlage A4). Der langsamere Abbau der RNase B im Vergleich zur RNase A zeigte jedoch – in Übereinstimmung mit H-D-Austausch-NMR-Untersuchungen (Joao *et al.* 1992) – eine Stabilisierung des RNase A-Moleküls durch den Kohlenhydratrest an.

## 5.3 Limitierte Proteolyse zum Nachweis von Konformationsänderungen

(Anlagen A4-7)

### 5.3.1 Einfluss von Konformationsänderungen auf die proteolytische

#### Fragmentierung

(Anlagen A4-6)

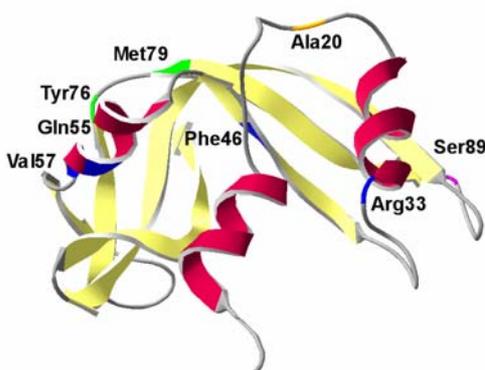
Unter dem Einfluss von denaturierenden Agenzien, von denen unter technischen Bedingungen v.a. erhöhte Temperaturen von Bedeutung sind, kommt es zur (lokalen oder globalen) Entfaltung der nativen Proteinstruktur. Damit verbunden ist eine (verbesserte) Zugänglichkeit potenzieller Spaltstellen und eine erhöhte Flexibilität der Polypeptidkette –

nach obigen Kriterien (Kapitel 3.3.2.2 bzw. 5.1) für eine Proteolyseempfindlichkeit beider Umstände, die einen proteolytischen Angriff erfolgreich(er) machen sollten (Price and Johnson 1990; Plaza del Pino *et al.* 2000; Young *et al.* 2007). Selbstverständlich muss bei derartigen Experimenten beachtet werden, dass die entsprechende Protease unter den gegebenen Bedingungen eine ausreichende Aktivität besitzt; anderenfalls besteht die Gefahr, dass ein nicht detektierbarer proteolytischer Abbau als Proteolyseresistenz des Zielproteins gedeutet wird. Zudem muss berücksichtigt werden, dass auch die Proteasen ggf. entfalten und damit selbst zu Substrat werden (Fontana *et al.* 1999; Dürschmidt *et al.* 2001), so dass hier v.a. gegen chemische Denaturanzien und thermische Denaturierung stabile Proteasen wie Thermolysin (oder eine noch stabilere 8fach-Mutante der neutralen Protease aus *Bacillus stearothermophilus*, Boilylin; van den Burg *et al.* 1998) oder Proteinase K (Bajorath *et al.* 1988) zum Einsatz kommen.

Durch die Identifizierung der primären Spaltstellen unter entsprechenden Bedingungen ist es möglich, Aussagen über die Struktur bzw. Flexibilität der Proteine (Intermediate, global entfalteter Zustand) zu erhalten (Hubbard 1998; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000; Köditz *et al.* 2002; Fontana *et al.* 2004). Das durch die Primäerspaltung(en) erhaltene Protein ist jedoch i.d.R. instabiler als das intakte Protein, so dass es schneller als dieses entfaltet, damit ein besseres Substrat darstellt und schneller weiter abgebaut wird, so dass es zu keiner Akkumulierung von Primärfragmenten kommt (Fassina *et al.* 1986; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000). Erst unter stark denaturierenden Bedingungen ist die Entfaltung des intakten Proteins schnell genug, so dass seine Substrateigenschaften ähnlich denen der entstehenden Fragmente sind (Anlage A5). Hier kommt es ggf. zu einer Akkumulierung von Primärfragmenten, die isoliert und charakterisiert werden können. In organischen Lösungsmitteln wie Ethanol oder Trifluorethanol (TFE), die Sekundärstrukturen (v.a. Helices) stabilisieren oder sogar induzieren können (Buck 1998), können hingegen Bedingungen erreicht werden, unter denen stabile *nicked* Proteinspezies akkumuliert werden (Welinder 1988; Köditz *et al.* 2002; Fontana *et al.* 2004). Auf diese Weise konnten für verschiedene Proteine Gleichgewichtsintermediate bzw. Faltungszustände hinsichtlich der Zugänglichkeit einzelner Peptidbindungen (durch Identifizierung der entstehenden Fragmente, Acharya *et al.* 1992; Fontana *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005; Wehbi *et al.* 2006) charakterisiert werden.

### 5.3.1.1 Proteolyse von RNase A unter thermischer Denaturierung

Unter thermischer Denaturierung werden in RNase A die Peptidbindungen Tyr25–Cys26 (Chymotrypsin, Rupley and Scheraga 1963), Lys31–Ser32 und Arg33–Asn34 (Trypsin, Ooi *et al.* 1963; Arnold *et al.* 1996) sowie Asn34–Leu35 und Thr45–Phe46 (Thermolysin, Arnold *et al.* 1996) als erste proteolyseempfindlich (Tabelle 2), was in früheren eigenen Arbeiten zur Postulierung einer Entfaltungsregion im obigen Sinn (Kapitel 2.5 bzw. 4.1.3) für den Strukturbereich zwischen Helix II und dem ersten  $\beta$ -Faltblatt geführt hatte (Abb. 6, Arnold *et al.* 1996). Für (die unspezifischere Protease) Proteinase K, die RNase A unter nativen Bedingungen durch Primäerspaltung der Peptidbindung Ala20–Ser21 abbaut (Rauber *et al.* 1978; Anlagen A2 und A3), wurde unter thermischer Entfaltung nicht nur eine deutliche Erhöhung von  $k_p$  detektiert, sondern es wurden nun die Peptidbindungen Ala20–Ser21, Arg33–Asn34 (*n.b.*, die Spaltbarkeit einer Peptidbindung durch Proteinase K C-terminal von Arg wird kontrovers diskutiert, [http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/make\\_refs?id=S08.054](http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/make_refs?id=S08.054)); die Spaltung wurde hier durch die massenspektrometrische Identifizierung der entsprechenden komplementären Fragmente postuliert), Phe46–Val47, Gln55–Ala56, Val57–Cys58, Tyr76–Ser77 und Met79–Ser80 als primäre Spaltstellen identifiziert (Anlage A5, Abb. 11, Tabelle 2). Diese größere Anzahl primärer Spaltstellen im Vergleich zu den zuvor genannten (spezifischeren) Proteasen suggeriert einen willkürlichen Primärabbau über das gesamte Proteinmolekül verteilt. Ala20–Ser21 entspricht jedoch der primären Spaltstelle für Proteinase K unter nativen Bedingungen und Arg33–Asn34 und Phe46–Val47 entsprechen den Spaltstellen, die für die anderen Proteasen identifiziert wurden. Gln55–Ala56 und Val57–Cys58 befinden sich am Ende der Helix III in direkter Nachbarschaft zur Disulfidbrücke 58–110, beides Umstände, die sich wesentlich stärker (negativ) auf Proteasen mit hohen strukturellen Anforderungen an die Konformation bzw. Zugänglichkeit und Flexibilität des Substrats auswirken als auf Proteasen mit geringen derartigen Anforderungen (wie z.B. Proteinase K, Wolf *et al.* 1991).



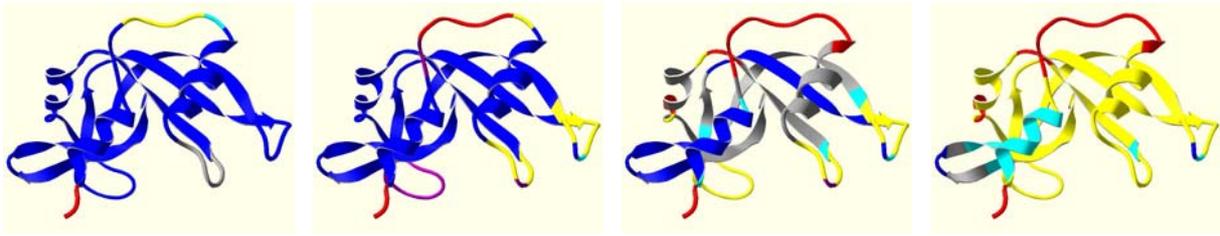
**Abb. 11:** Tertiärstruktur der RNase A mit den primären Spaltstellen für Proteinase K unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen. Die Aminosäurereste N-terminal zu den identifizierten Spaltstellen unter nativen Bedingungen (Ala20; orange), in 50% TFE (dazu zusätzlich Tyr76 und Met79; grün), bei 65°C (dazu zusätzlich Arg33, Phe46, Gln55 und Val57; blau) bzw. in 5 M GdnHCl (dazu zusätzlich Ser89; magenta) sind markiert.

Vergleichende Studien zur Spaltbarkeit verschiedener potenzieller Substratproteine durch Trypsin zeigten, dass für eine erfolgreiche Spaltung beiderseits der zu spaltenden Bindung jeweils 6 Aminosäurereste in einer geeigneten Konformation vorliegen müssen (Hubbard *et al.* 1994). In RNase A verhindern offenbar die Disulfidbrücken 58–110 bzw. 65–72 (und/oder das  $\beta$ -Faltblatt Gln60–Ala64) eine Primärspaltung der potenziellen Spaltstellen Lys61–Asn62 bzw. Lys66–Asn67. Tyr76–Ser77 und Met79–Ser80 sind in einem *loop* lokalisiert, jedoch finden sich hier keine potenziellen Spaltstellen für Trypsin und Arg85–Glu86 wird wiederum durch eine Disulfidbrücke (26–84) abgeschirmt. Interessantweise wurde jedoch für Chymotrypsin eine Primärspaltung der Peptidbindungen Tyr76–Ser77 und Met79–Ser80 angenommen, jedoch konnten nicht die komplementären Fragmente isoliert werden (Rupley and Scheraga 1963).

Der proteolytische Abbau von RNase A durch Thermolysin in Harnstoff ähnelt stark dem unter thermischer Denaturierung (s. Abb. 13, Arnold *et al.* 1996); eine Identifizierung primärer Spaltstellen wurde hier jedoch nicht vorgenommen. Interessant ist jedoch, dass unter Harnstoff-induzierter Denaturierung im Gegensatz zur thermischen Denaturierung das Fragment 46–124 vor dem Fragment 35–124 auftritt (Abb. 13), was auf eine anders geartete Zugänglichkeit oder Flexibilität dieser Peptidbindung unter Harnstoff-induzierter Denaturierung schließen lässt.

### 5.3.1.2 Proteolyse von RNase A unter GdnHCl-induzierter Denaturierung

Bei Entfaltung von RNase A in GdnHCl wurde mit Proteinase K zusätzlich zu den zuvor beschriebenen primären Spaltstellen die Peptidbindung Ser89–Ser90 als eine solche identifiziert (Anlage A5, Tabelle 2). Yang und Tsou (Yang and Tsou 1995) geben hingegen die Peptidbindungen Ala6–Lys7, Ala20–Ser21 und Pro42–Val43 als Spaltstellen (eine Differenzierung nach Primär- und Sekundärereignissen wurde hier nicht vorgenommen) für Proteinase K in GdnHCl an. Bis auf die Spaltung von Ala20–Ser21 konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden; eine Spaltung von Pro42–Val43 ist unwahrscheinlich, da in diesem Fall Pro42 die P<sub>1</sub>-Position einnehmen würde, was eine proteolytische Spaltung durch Proteinase K unterbinden sollte (Brömme *et al.* 1986). Für Trypsin wurde die Spaltung der Peptidbindung Arg33–Asn34 beschrieben (Yang and Tsou 1995), was mit den Ergebnissen zur thermischen Entfaltung übereinstimmt (Arnold *et al.* 1996). Nach den Ergebnissen zu Proteinase K sollte man eine Spaltung der Peptidbindung Lys91–Tyr92 erwarten, zumal diese *loop*-Region durch das Programm FIRST als recht flexibel beschrieben werden konnte (Abb. 12; Anlage A1).



**Abb. 12:** Flexibilität des RNase A-Rückgrats als Funktion des Energieeintrags, berechnet mit dem Programm FIRST (<http://firstweb.asu.edu/>). Der Energie-*cutoff* wurde auf 0,25, 1,0, 2,0 bzw. 3,0 kcal mol<sup>-1</sup> gesetzt (von links nach rechts). Die Flexibilität nimmt von blau über grau, cyan, margenta und gelb nach rot zu, Anlage A1).

Hier scheint das in unmittelbarer Nachbarschaft liegende Pro93 sowie die Disulfidbrücke 40–95 einen proteolytischen Angriff durch Trypsin zu verhindern – die prinzipielle Spaltbarkeit von Lys91–Tyr92 und Lys98–Thr99 durch Trypsin (in RNase S, Allende and Richards 1962) sowie Tyr97–Lys98 durch Chymotrypsin (unter thermischer Entfaltung, Rupley and Scheraga 1963) wurde beschrieben.

### 5.3.1.3 Proteolyse von RNase A unter TFE-induzierter Denaturierung

In TFE (50%, 42°C), das in Peptiden v.a. helikale Strukturen induzieren kann und daher besonders geeignet erscheint, *nicked* Proteinspezies zu stabilisieren (Fontana *et al.* 2004), wurde für Thermolysin mit Asn34–Leu35 (Polverino de Laureto *et al.* 1997) eine der bereits durch uns unter thermischer Entfaltung beschriebenen primären Spaltstellen (Arnold *et al.* 1996) identifiziert. Die andere primäre Spaltstelle unter thermischer Denaturierung, Thr45–Phe46, wurde in TFE als Sekundärspaltungseignis charakterisiert (Polverino de Laureto *et al.* 1997). Für Proteinase K wurden in 50% TFE Tyr76–Ser77 und Met79–Ser80 als primäre Spaltstellen identifiziert; die Spaltung von Ala20–Ser21 (durch Subtilisin) wurde aufgrund einer entsprechenden Bande im SDS-PAGE-Gel und der Spaltung nativer RNase A postuliert (Anlage A6, Tabelle 2). Das Fehlen der Primärspaltung von Phe46–Val47, welche bei erhöhter Temperatur und in GdnHCl auftritt, entspricht dem oben beschriebenen Ausbleiben der Primärspaltung von Thr45–Phe46 durch Thermolysin. Offenbar wird die  $\beta$ -Faltblattstruktur im Gegensatz zur thermischen Denaturierung in TFE nicht destabilisiert.

**Tabelle 2:** Identifizierte primäre Spaltstellen in RNase A für Trypsin, Thermolysin bzw. Proteinase K in Abhängigkeit vom Denaturans.

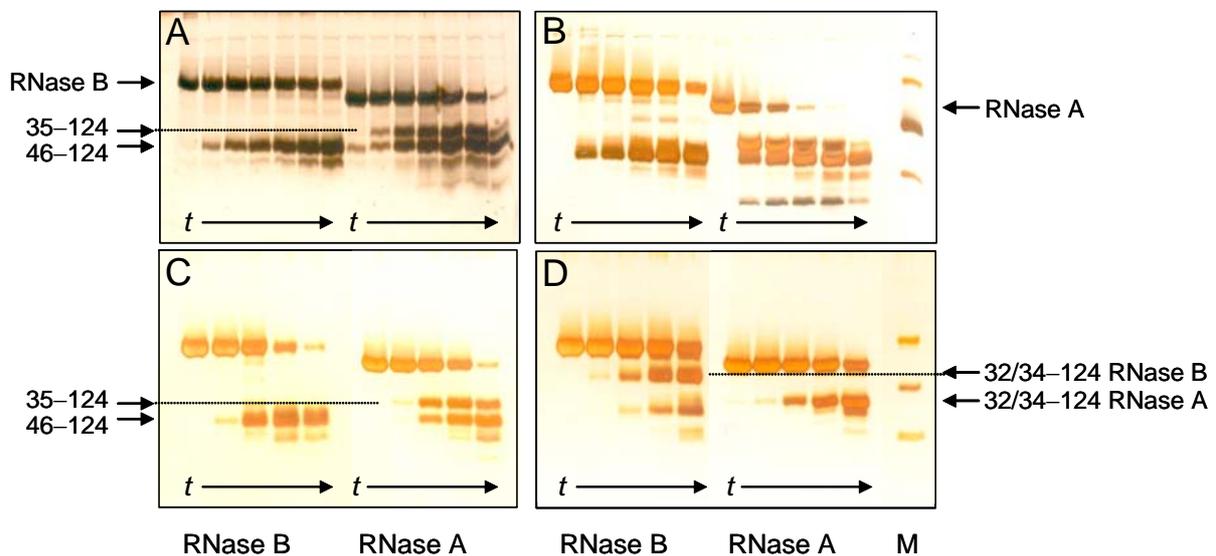
Protease	denaturierende Bedingungen	identifizierte primäre Spaltstellen in RNase A	Referenz bzw. Anmerkungen
Trypsin	thermisch	Lys31-Ser32 Arg33-Asn34	Arnold <i>et al.</i> 1996; diese Spaltstellen waren zuvor postuliert worden (Ooi <i>et al.</i> 1963); für RNase B wurden dieselben primären Spaltenstellen identifiziert (Anlage <b>A4</b> )
Thermolysin	TFE thermisch	Asn34-Leu35 Asn34-Leu35 Thr45-Phe46	Polverino de Laureto <i>et al.</i> 1997 Arnold <i>et al.</i> 1999); ebenso für RNase B (Anlage <b>A4</b> ) und für die Harnstoff-induzierte Denaturierung (postuliert, Abb. 13; für RNase B dort zwei zusätzliche Fragmente)
Proteinase K	TFE thermisch GdnHCl	Ala20-Ser21 Tyr76-Ser77 Met79-Ser80 zusätzlich Arg33-Asn34 Phe46-Val47 Gln55-Ala56 Val57-Cys58 zusätzlich Ser89-Ser90	Anlage <b>A6</b> ; Ala20-Ser21 aus SDS-PAGE-Bandenmuster postuliert; Ergebnisse ebenso mit Subtilisin Anlage <b>A5</b> ; Ala20-Ser21 als primäre Spaltstelle identifiziert Anlage <b>A5</b>

Die Ergebnisse zur Proteolyse von RNase A zeigen einerseits eine gute Übereinstimmung bezüglich der Positionen der primären Spaltstellen für die verschiedenen Proteasen für das jeweilige Denaturans, andererseits zeigt der Vergleich der primären Spaltstellen (und damit der der Entfaltung) für verschiedene Denaturanzien deutliche Unterschiede. Während in TFE, das in der Lage ist, trotz Destabilisierung der Tertiärstruktur Sekundärstrukturelemente zu stabilisieren, nur wenige potenzielle primäre Spaltstellen zugänglich werden, nimmt ihre Anzahl über die thermische zur GdnHCl-induzierten Denaturierung von RNase A zu.

#### 5.3.1.4 Proteolyse von RNase B unter denaturierenden Bedingungen

Wie schon unter nativen Bedingungen (s. 4.3.), so wurde RNase B auch unter verschiedenen Denaturierungsbedingungen auf eine proteolytische Angreifbarkeit hin untersucht. Hier sollte sich der Kohlenhydratrest, der am Asn34, d.h. gerade in der Region, die als erste

proteolytisch angreifbar wird (Arnold *et al.* 1996), mit dem Protein knüpft ist, bemerkbar machen. In der Tat wird die Spaltung der Peptidbindung Asn34–Leu35 durch Thermolysin (Abb. 13A–C) und Arg33–Asn34 durch Trypsin (Abb. 13D) stark unterdrückt (Anlage A4). Eine Spaltung konnte hier wie auch für die der Peptidbindungen Thr45–Phe46 bzw. Lys31–Ser32 durch Identifizierung der komplementären Fragmente nachgewiesen werden (Anlage A4; das N-terminale Fragment Lys1–Arg33 konnte nicht nachgewiesen werden, so dass die Zuordnung als primäre Spaltstelle hier nur in Analogie zur RNase A getroffen werden kann). Während unter thermischer Denaturierung das Fragmentmuster der RNase B dem der RNase A ähnelt (die Banden für das Fragment 35–124 in Abb. 13A–C sind kaum sichtbar, die Banden für die Fragmente 32–124 und 34–124 in Abb. 13D sind aufgrund des Kohlenhydratrests zu einem höheren Molekulargewicht verschoben), scheinen bei Denaturierung von RNase B in Harnstoff (Abb. 13A) bzw. TFE (Abb. 13B) durch Thermolysin zwei zusätzliche Fragmente mit Molekulargewichten von ca. 14 kDa bzw. 11,5 kDa zu entstehen. Das stark akkumulierte Fragment von ca. 4 kDa für RNase A nach Denaturierung in TFE und Proteolyse durch Thermolysin stellt vermutlich das Fragment 1–34 dar, welches bei RNase B nicht akkumuliert wird (Abb. 13B). Eine Identifizierung dieser drei Fragmente war aufgrund ihrer geringen Konzentration bisher nicht möglich.



**Abb. 13:** SDS-PAGE-Gele des proteolytischen Abbaus von RNase A (jeweils rechts) und RNase B (jeweils links) in 8 M Harnstoff bei 25°C durch Thermolysin (A), in 40% (v/v) TFE bei 25°C durch Thermolysin (B), bei 65°C durch Thermolysin (C) bzw. bei 65°C durch Trypsin (D). In B und D sind jeweils die Markerproteine (M) Soyabohnen-Trypsininhibitor (21 kDa), Cytochrom c (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) gezeigt. Zusätzlich wurden einige identifizierte Fragmentzuordnungen angezeigt; die gestrichelten Linien dienen lediglich der Orientierung.

Trotz der erhöhten thermodynamischen und kinetischen Stabilität der RNase B im Vergleich zur RNase A (Arnold *et al.* 1996) verläuft die Entfaltung beider Proteine offenbar identisch, d.h. die Stabilisierung der Entfaltungsregion der RNase A (Kapitel 4.1.3) durch den Kohlenhydratrest ist offenbar nicht so gravierend, dass sie zu einer Veränderung des Entfaltungsweges in RNase B führt.

### 5.3.2 Einfluss von Konformationsänderungen auf die Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse

(Anlagen A5-7)

Sowohl für Proteasen, die in der Lage sind, das native Protein proteolytisch anzugreifen, als auch für Proteasen, die nur das entfaltete Protein abbauen können, nimmt  $k_p$  mit Verschiebung des Gleichgewichts von N nach U mehr oder weniger dramatisch zu (Klee 1967; Wang *et al.* 1998; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000; 2001; Dürschmidt *et al.* 2001; Köditz *et al.* 2002). Oftmals wird dabei ein Anstieg von  $k_p$  bei geringeren Denaturansintensitäten detektiert als bei der Verfolgung der Gleichgewichtsentfaltung mittels spektroskopischer Methoden (Klee 1967; Winchester *et al.* 1970; Imoto *et al.* 1976; Wang *et al.* 1998; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000; Köditz *et al.* 2002). Dies liegt darin begründet, dass durch den proteolytischen Abbau nicht nur der tatsächlich im Gleichgewicht vorliegende Anteil an U abgebaut wird, sondern dem N $\rightleftharpoons$ U-Gleichgewicht U entzogen wird. U bildet sich aus N nach, so dass [N] sinkt, was eine Verschiebung des N $\rightleftharpoons$ U-Gleichgewichts zu geringeren Denaturansintensitäten suggeriert. Da auf die Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion  $k_p$  mittels limitierter Proteolyse im nächsten Kapitel detailliert eingegangen wird, soll hier die qualitative Beeinflussung der Abbaugeschwindigkeit aufgrund der Einstellung des N $\rightleftharpoons$ U-Gleichgewichts betrachtet werden.

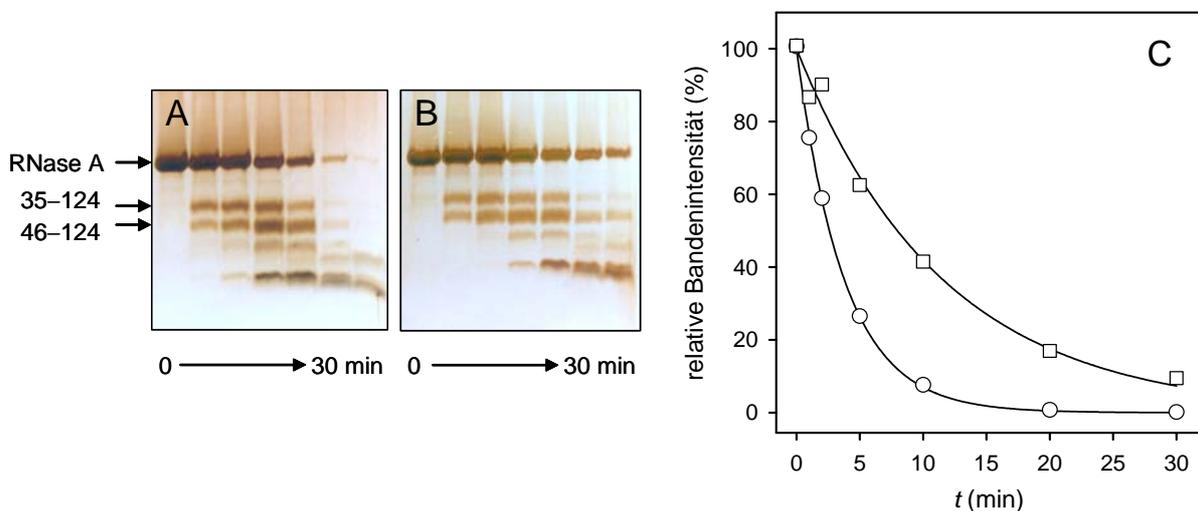
Während die Änderung von  $k_p$  im prätransitionalen Bereich mit Erhöhung der Denaturansintensität für Proteasen, die nur das entfaltete Protein abbauen können, experimentell meistens kaum detektierbar ist, steigt  $k_p$  für Proteasen, die schon das native Protein abbauen können, hier messbar an (Anlage A5). Ursache hierfür ist (neben der mittels spektroskopischer Methoden noch kaum messbaren Verschiebung des N $\rightleftharpoons$ U-Gleichgewichts zu Gunsten von U) eine Intensitätszunahme der Fluktuationen im Proteinmolekül, d.h. der Flexibilität und damit eine Verbesserung der Substrateigenschaften. Zudem kommt es

mitunter auch zu einer Aktivierung der Protease selbst, die für eine quantitative Evaluierung berücksichtigt werden muss.

Im Gegensatz zur thermischen Denaturierung, bei der es aufgrund des Energieeintrags in das System zu einer Verstärkung von Fluktuationen in den Proteinmolekülen kommt, was letztlich zu ihrer Entfaltung und damit zu einer erhöhten Proteolyseempfindlichkeit führt (Klee 1967; Burgess and Scheraga 1975; Arnold *et al.* 1996; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997; 2000), führt der Zusatz von chemischen Denaturanzien in geringen Konzentrationen mitunter zu einer *Abnahme* der Proteolyseempfindlichkeit (Sackett *et al.* 1994; Das and Dasgupta 1998; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2000; 2001; Köditz *et al.* 2002). Vergleichbare Effekte wurden auch mittels H-D-Austauschexperimenten (Abnahme der Austauschraten, Qu and Bolen 2003), <sup>1</sup>H-NMR (chemische Verschiebung entgegengesetzt der Verschiebung unter stark denaturierenden Bedingungen, Benz and Roberts 1975), Modifizierung von verborgenen Cysteinresten (Abnahme der Modifizierbarkeit, Stinson 1977) oder Gelfiltration (Abnahme des hydrodynamischen Radius', Martenson 1978) beobachtet. Der Effekt war für RNase A am deutlichsten in TFE mit Proteinase K detektierbar; hier sank die Proteolyseempfindlichkeit in 20% TFE um zwei Größenordnungen gegenüber derjenigen in Abwesenheit von TFE (Anlage A6). Da die primäre Spaltstelle für Proteinase K (Ala20–Ser21) in einer *loop*-Region zwischen zwei Helices liegt (Wlodawer *et al.* 1982) und TFE insbesondere helikale Strukturen induziert (Buck 1998) wäre es denkbar, dass die Flexibilität des *loops* durch eine Ausweitung der angrenzenden Helices eingeschränkt wird, was wiederum eine Abnahme der Proteolyseempfindlichkeit nach sich ziehen würde. Diese Interpretation wird auch dadurch gestützt, dass der Effekt auf die RNase A-Mutante A20P-RNase A, bei der  $k_p$  sowieso schon ca. 300mal kleiner ist (Anlage A3), mit einem Faktor von nur ca. 2 deutlich geringer ausfiel (Köditz 2004). Auch die Abnahme von  $k_p$  für RNase A in 1 M GdnHCl (auf ca. 65%, bestimmt mit Proteinase K; Anlage A5) bzw. 2–3 M Harnstoff (auf ca. 30%, bestimmt mit Trypsin und Thermolysin; Anlage A7) liegt in dieser Größenordnung. Leider erfolgte aufgrund des ungünstigen Verhältnisses von Bildungs- und Folgeabbaugeschwindigkeit der Primärfragmente unter diesen Bedingungen keine Akkumulierung derselben, so dass keine topologische Zuordnung des Stabilisierungseffekts auf die RNase A-Struktur gemacht werden kann. Eine Ausdehnung von Sekundärstrukturen, wie für TFE vorgeschlagen wurde, kann für GdnHCl bzw. Harnstoff nicht angenommen werden. Sackett *et al.* (Sackett *et al.* 1994) und Stinson (Stinson 1977) machten für ähnliche, an Tubulin bzw. Phosphoglyceratkinase gemachte Beobachtungen ein *tightening* der Proteinstruktur verantwortlich. Ein Stören der Interaktionen des Proteins (insbesondere der oberflächennahen Bereiche, die auch für einen proteolytischen Angriff von besonderer

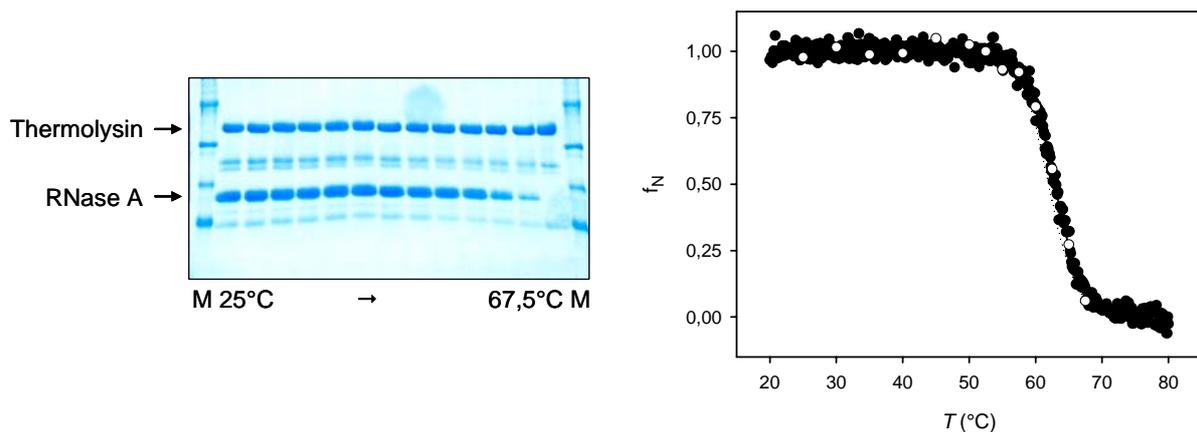
Bedeutung sind) mit der Hydrathülle führt zum Stärken der intramolekularen Wechselwirkungen, was eine Abnahme der Flexibilität zur Folge hätte.

Ein häufig beobachtetes Phänomen ist die Abnahme von  $k_p$  durch Bindung von Liganden, Substraten oder Inhibitoren (Price and Johnson 1990; Hubbard 1998; Park and Marqusee 2005), wobei die Effekte häufig nicht nur auf eine direkte Abschirmung von potenziellen Spaltstellen oder eine lokale Herabsetzung der Proteinflexibilität zurückgeführt werden können. Markus *et al.* (Markus *et al.* 1968) detektierten eine Verminderung von  $k_p$  für den Abbau von RNase A durch Subtilisin um ca. 50% in Anwesenheit der RNase A-Inhibitoren 2'-CMP bzw. 3'-CMP, obwohl die primäre Spaltstelle Ala20-Ser21 deutlich von der Substratbindungsstelle entfernt liegt.<sup>Anm. 13</sup> Der Vergleich des proteolytischen Abbaus von RNase A in Abwesenheit und Anwesenheit des Substrats 2',3'-cCMP (17,5 mM, entspricht  $5 \times K_M$ , Wieker and Witzel 1967) durch Thermolysin bei 60°C zeigte, dass  $k_p$  auf ca. 25% sinkt, wobei das proteolytische Fragmentmuster beibehalten wurde (Abb. 14, U. Arnold, unveröffentlichte Daten). Da insbesondere die primäre Spaltstelle Thr45-Phe46 in direkter Nähe zur Substratbindungsstelle liegt (Raines 1999) konnte somit gezeigt werden, dass die Verminderung von  $k_p$  nicht durch eine Abschirmung der primären Spaltstellen sondern durch eine Verlangsamung der Entfaltungsreaktion der RNase A hervorgerufen wird.



**Abb. 14:** Einfluss des Substrats 2',3'-cCMP auf den proteolytischen Abbau von RNase A durch Thermolysin bei 60°C. RNase A ( $0,25 \text{ mg ml}^{-1}$ ) wurde bei 60°C in Gegenwart von Thermolysin ( $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) in Abwesenheit (A) bzw. Gegenwart (B) von  $17,5 \text{ mM}$  2',3'-cCMP inkubiert. C zeigt die Abnahme der Intensität der Bande der intakten RNase A nach densitometrischer Auswertung.

Wählt man jedoch im Gegensatz zu den eingangs des Kapitels beschriebenen Beobachtungen (Klee 1967; Winchester *et al.* 1970; Wang *et al.* 1998) Bedingungen, unter denen ein proteolytischer Abbau von U erfolgen kann, ohne dass eine messbare Nachbildung aus N erfolgt, so sollte ein direktes Verfolgen des  $N \rightleftharpoons U$ -Übergangs möglich sein (Park and Marqusee 2005). Experimentell bedeutet dies, eine hohe Proteasekonzentration (Aktivität) für eine kurze Inkubationszeit (*pulse*) zu dem vorinkubierten Reaktionsansatz zu geben und dann die Reaktion sofort abzustoppen. Für eine *pulse*-Dauer von 10 s ergibt sich selbst bei  $k_u \approx 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  ein Fehler von weniger als 10%. Diese Methode wurde hier für RNase A mit Thermolysin, das native RNase A bei der verwendeten Konzentration von  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  mit  $k_p \approx 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  abbaut, angewendet und die Ergebnisse wurden mit dem mittels CD detektierten thermischen Übergang verglichen (Abb. 15, U. Arnold, unveröffentlichte Daten). Die hervorragende Übereinstimmung der ermittelten  $T_m$ -Werte ( $62,9 \pm 0,5^\circ\text{C}$  mittels *pulse*-Proteolyse,  $63,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  mittels CD-Spektroskopie) zeigt die Eignung dieser Methode zur Bestimmung der thermischen Stabilität von Proteinen.



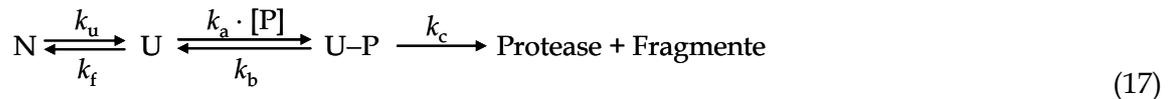
**Abb. 15:** Vergleich der Verfolgung der thermisch induzierten Entfaltung von RNase A mittels *pulse*-Proteolyse (links, SDS-PAGE-Gel, Thermolysin-*pulse* ( $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) für 10 s, bzw. rechts, ○, nach densitometrischer Auswertung;  $T_m = 62,9 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) bzw. mittels CD-Spektroskopie (rechts, ●,  $T_m = 63,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ). Im SDS-PAGE-Gel sind zudem die Markerproteine (M) Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Soyabohnen-Trypsininhibitor (21 kDa) und  $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kDa) gezeigt.

Derartige *pulse*-Experimente wurden auch genutzt, um die Faltungskinetik von Proteinen bzw. die Proteolyseempfindlichkeit von Faltungsintermediaten zu charakterisieren (Zettlmeissl *et al.* 1983; Rudolph 1985; Lang and Schmid 1986; Teschner and Rudolph 1989; Betton *et al.* 1992; Fontana *et al.* 1999; Colomer-Pallas *et al.* 2003). Hierbei wurde in Umkehrung der Entfaltung der Umstand genutzt, dass im Prozess der Proteinfaltung potenzielle Spaltstellen verborgen werden und damit ihre Proteolyseempfindlichkeit abnimmt.

## 5.4 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion

(Anlagen A7-11)

Während für Proteasen, die Proteine in ihrer nativen Konformation abbauen können, eine lineare Abhängigkeit in der  $k_p$  vs.  $[P]$ -Auftragung erhalten wird, erhält man für Proteasen, die das Proteinmolekül nur nach einer Entfaltungsreaktion abbauen können, eine hyperbole Abhängigkeit (Matthyssens *et al.* 1972). Dies liegt darin begründet, dass hier der eigentlichen Proteolysereaktion (Gl. 15) das entsprechende Entfaltungsgleichgewicht vorgelagert ist.



Aus Gl. 17 leiteten Imoto *et al.* (Imoto *et al.* 1986) eine Gleichung ab (Gl. 20), nach der es möglich ist, die Geschwindigkeitskonstante der Entfaltungsreaktion  $k_u$  zu ermitteln.

$$v = k_c \cdot [U - \text{Protease}] = \frac{(k_u / k_f) \cdot k_c \cdot [P] \cdot [N]}{(k_b + k_c) / k_a + (k_c / k_f) \cdot [P]} \quad (18)$$

Unter nativähnlichen Bedingungen ist  $[U]$  und damit  $[U - \text{Protease}]$  vernachlässigbar klein, so dass  $[N]$  mit der Konzentration an nicht abgebautem Protein und  $[P]$  mit der eingesetzten Proteasekonzentration  $[P]_0$  gleichgesetzt werden können. Es ergibt sich unter diesen Bedingungen ( $v = k_p \cdot [N]$ ) mit

$$k_p = \frac{(k_u / k_f) \cdot k_c \cdot [P]_0}{(k_b + k_c) / k_a + (k_c / k_f) \cdot [P]_0} \quad (19)$$

wobei  $k_u / k_f$  der Gleichgewichtskonstanten des N-D-Gleichgewichts und  $(k_b + k_c) / k_a$  dem  $K_M$ -Wert der Proteolysereaktion entsprechen. Teilt man nun Zähler und Nenner durch  $k_c / k_f$  und fasst den sich im Zähler ergebenden Term  $(k_b + k_c) \cdot k_f / (k_a \cdot k_c)$  zu einer Konstante B zusammen, so ergibt sich

$$k_p = \frac{k_u \cdot [P]_0}{B + [P]_0} \quad (20)$$

so dass bei  $[P]_0 \rightarrow \infty$   $k_p = k_u$ .

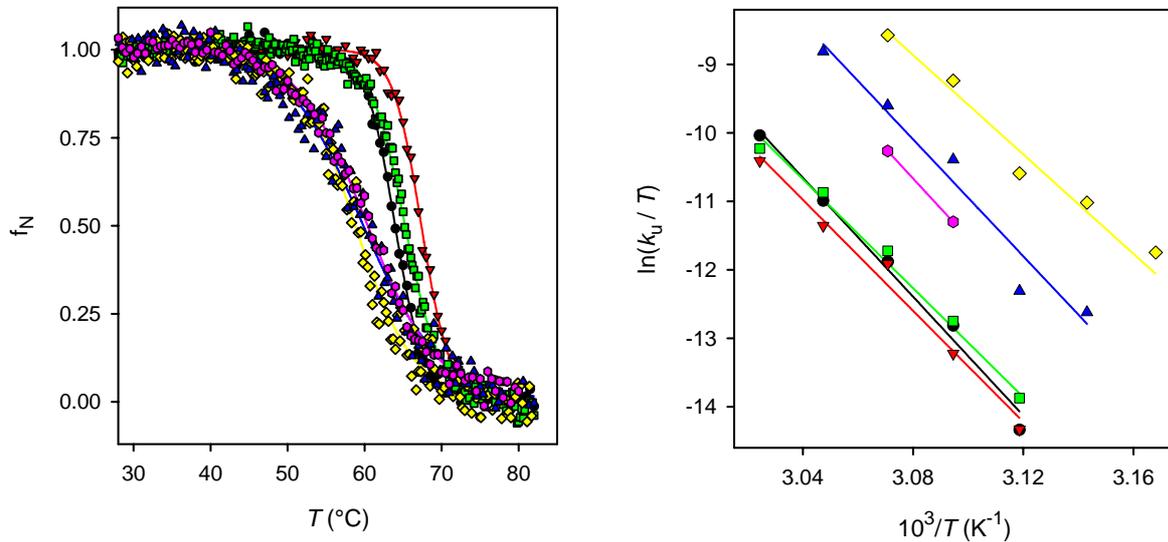
Zur Absicherung sollten verschiedene Proteasen verwendet werden, die dieselben  $k_u$ -Werte liefern müssen (Imoto *et al.* 1986; Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997). Imoto *et al.* bestimmten auf diese Weise  $k_u$ -Werte für RNase A, Lysozym und  $\beta$ -Lactoglobulin unter verschiedenen Bedingungen und stellten eine gute Übereinstimmung zu mittels

spektroskopischer Methoden erhaltenen Daten fest (Imoto *et al.* 1986). Tams und Welinder nutzten diesen Ansatz, um mit Thermolysin  $k_u$  der *Coprinus cinereus* Peroxidase bei 59,4°C zu bestimmen (Tams and Welinder 1996). Die experimentellen Limitierungen dieser Methode liegen darin, dass die Proteaseaktivität hinreichend groß sein muss (was v.a. in chemischen Denaturanzien ein Problem darstellen kann) und  $k_p$ -Werte  $\geq 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  manuell nicht mehr mit der erforderlichen Zuverlässigkeit zugänglich sind. Zudem muss der Abbau des nativen Proteins vernachlässigbar gegenüber dem Abbau über das entfaltete Protein sein – anderenfalls muss dem Term in Gl. 20 ein linearer Term hinzugefügt werden (Anlage A1). Der große Vorteil im Vergleich zu konventionellen spektroskopischen Methoden liegt v.a. in der messtechnischen Zugänglichkeit von Proteinentfaltungsprozessen unter nativen und nativähnlichen Bedingungen. Zum einen wird durch die Kopplung der Entfaltungsreaktion mit der irreversiblen Folgereaktion (dem proteolytischen Abbau)  $k_u$  direkt bestimmbar, während es unter Nutzung spektroskopischer Methoden nur indirekt aus  $k_u = k_{\text{obs}} - k_f$  bzw.  $k_u = K \cdot k_f$  oder durch Extrapolation aus  $k_u$ -Werten, die aus Messungen unter denaturierenden Bedingungen erhalten wurden, zugänglich ist. Zum anderen steht nicht nur die unter diesen Bedingungen geringe Signaldifferenz  $y_N - y$  (Abb. 2) sondern die gesamte Konzentration an N als Signalamplitude zur Verfügung. Beide Umstände tragen erheblich zu einer signifikant erhöhten Genauigkeit der  $k_u$ -Bestimmung unter diesen Bedingungen bei.

Diese Methode wurde in eigenen Arbeiten für die Bestimmung von  $k_u$ -Werten von RNase A und RNase B unter thermischer Denaturierung angewendet, wobei für RNase A mit Trypsin und Thermolysin übereinstimmende  $k_u$ -Werte erhalten wurden (Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997). Ebenso wurden auf diese Weise  $k_u$ -Werte für zahlreiche RNase A-Mutanten (Anlage A10), RNase A-Varianten mit inkorporierten Strukturmimetika (z.B. Anlage A9) und RNase B-Varianten mit enzymatisch reduziertem Kohlenhydratanteil bzw. durch Concanavalin A (Con A) „vergrößerter Modifizierung“ (s. Kapitel 5.5, Anlage A8) bestimmt. Da die konformationelle Entfaltung von RNase A eine Einschrittreaktion darstellt (Kapitel 4.1.1), stellen die mittels Proteolyse bestimmten  $k_u$ -Werte bzw. die daraus nach Gl. 11 errechneten  $\Delta G^\ddagger$ -Werte die kinetische Stabilität der RNase-Varianten dar. Durch Vergleich der  $\Delta G^\ddagger$ -Werte mit den entsprechenden  $\Delta G$ -Werten ist es möglich (ähnlich der in Anm. 5, Gl. 24 beschriebenen  $\Phi_f$ -Wertanalyse), den Stabilitätsbeitrag des entsprechenden Aminosäurerests (bzw. hier auch Kohlenhydratrests) für den nativen Zustand abzuschätzen.

Alle RNase B-Varianten wiesen die gleiche thermodynamische Stabilität und die gleichen  $k_u$ -Werte auf (Anlage A8). Auf diese Weise konnte der erste Mannoserest in RNase B als die die erhöhte Stabilität der RNase B verursachende Komponente identifiziert werden (Anlage A8). Die Untersuchung von RNase A-Mutanten unterstrich die Bedeutung

der Entfaltungsregion (Kapitel 2.5 bzw. 4.1.3) für die Aufrechterhaltung der nativen Konformation des RNase A-Moleküls, da für die die Entfaltungsregion betreffenden Varianten die  $\Delta\Delta G^\ddagger$ -Werte mit den entsprechenden  $\Delta\Delta G$ -Werten übereinstimmten, was eine (vornehmliche) Beeinflussung des nativen Zustands anzeigte (Anlage A10).



**Abb. 16:** Einfluss von ausgewählten  $\beta$ -turn-Strukturmetika auf die Stabilität und Entfaltungsreaktion von RNase A. Mittels *expressed protein ligation* wurde die Sequenz <sup>108</sup>VACEGNPYVPVH<sup>119</sup> der RNase A (●), bei der die Peptidbindung Asn113–Pro114 in *cis*-Konfiguration vorliegt, dahingehend modifiziert, dass Asn113–Pro114 gegen die  $\beta$ -turn-Strukturmetika<sup>Anm. 14</sup> Asn-5',5'-dimethylprolin (▼, Anlage A9), Asn-(4S)-Fluorprolin (■), R-Nipecotinsäure–S-Nipecotinsäure (◆, Arnold *et al.* 2002),  $\beta^3$ -hAla– $\beta^2$ -hAla (▲) bzw. Asn-1,5-triazol-Ala (●, Anlage A11) ersetzt wurden. Links: Temperatur-induzierte Entfaltung (in 50 mM Na-Phosphat-Puffer, 25 mM NaCl, pH 8.0). Rechts: Eyring-Auftragung der Entfaltungskonstanten, bestimmt durch limitierte Proteolyse mit Thermolysin in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8.0.

Umgekehrt konnte für eine RNase A-Variante, bei der mit Hilfe der *expressed protein ligation* das *cis*-Pro114 gegen dmP (Kapitel 4.1.1 bzw. Anm. 14) ersetzt worden war, u.a. mit dieser Methode (aufgrund der gegenüber RNase A unveränderten  $k_u$ -Werte) gezeigt werden, dass die Stabilisierung, die durch Einführung des Strukturmetikums („Prothese“) erreicht wurde, auf einer Erhöhung von  $k_f$  beruht (Anlage A9). Die Substitution von Pro114 durch das die *cis-trans*-Isomerisierungsreaktion beschleunigende (4S)-Fluorprolin<sup>Anm. 14</sup> (Renner *et al.* 2001) blieb nahezu neutral. Andere  $\beta$ -turn-Mimetika<sup>Anm. 14</sup> führten hingegen nicht zu einer Stabilisierung (Abb. 16, U. Arnold, unveröffentlichte Daten bzw. Anlage A11). Im Gegensatz zu den ähnlichen Anstiegen der Kurven in der Eyring-Auftragung zeigen die thermisch induzierten Übergangskurven deutlich unterschiedliche Anstiege (Abb. 16). Die Differenz

zum Anstieg der Kurve für RNase A steigt dabei mit zunehmender struktureller Abweichung von der Originalstruktur (z.B. *R*-Nipecotinsäure-*S*-Nipecotinsäure, *R,S*-Nip) und/oder Rotationsfreiheit um die Bindungen des Rückgrats (z.B.  $\beta^3$ -Ala- $\beta^2$ -Ala). Die ähnlichen Werte für  $\Delta\Delta G$  (z.B. 9 kJ mol<sup>-1</sup> zwischen RNase A und 113/114-*R,S*-Nip-RNase A) und  $\Delta\Delta G_u^\ddagger$  (z.B. 12 kJ mol<sup>-1</sup> zwischen RNase A und 113/114-*R,S*-Nip-RNase A) deuten auf eine geringfügige Störung der nativen RNase A-Struktur hin.

Ein sehr komplexes Bild wurde durch Analyse der  $k_u$ -Werte von RNase A als Funktion der Temperatur und der Harnstoffkonzentration erhalten (Anlage A7). Für einen weiten Bereich experimenteller Bedingungen, die für RNase A einem  $\Delta G < 25$  kJ mol<sup>-1</sup> entsprachen, war eine Bestimmung der  $k_u$ -Werte mit der oben beschriebenen Methode möglich. Im *chevron plot* ergaben sich (erwartungsgemäß) lineare Abhängigkeiten für  $k_u$  von der Harnstoffkonzentration; die Kurven, die bei unterschiedlichen Temperaturen (20°C–60°C) aufgenommen worden waren, lagen zueinander parallel (Anlage A7). Interessanterweise war unter Bedingungen, die für RNase A einem  $\Delta G > 25$  kJ mol<sup>-1</sup> entsprachen, kein „Sättigungsverhalten“ der  $k_p$  vs. [Thermolysin]-Auftragung detektierbar, was einen veränderten Entfaltungs- oder Abbauweg der RNase A anzeigt. Aufgrund des langsamen Abbaus ( $k_p \approx 1 \times 10^{-5}$  s<sup>-1</sup>) wurden jedoch keine Primärfragmente akkumuliert, so dass eine strukturelle Zuordnung der Entfaltungs- oder Abbauveränderungen nicht möglich war.

Ein ähnlicher Ansatz wie der von Imoto *et al.* (Imoto *et al.* 1986) wurde von Wang und Kallenbach (Wang and Kallenbach 1998) zur Bestimmung von  $\Delta G$  für die Öffnungsreaktion von *loops* verfolgt. Aus den  $k_p$ -Werten (ermittelt für Proteinase K in Abhängigkeit von der Temperatur) für Spaltung des *loops* in Cytochrom *c*, der die primäre Spaltstelle enthält, und der intrinsischen Geschwindigkeitskonstante der proteolytischen Spaltung der entsprechenden Peptidbindung ( $k_{int}$ ) wurden die Gleichgewichtskonstanten für die Öffnungsreaktion ( $K_{op}$ ) ermittelt. In Gl. 17 wird dabei N durch die nicht angreifbare Spezies (*closed*) und U durch die angreifbare Spezies (*open*) ersetzt. Das beobachtbare  $k_p$  ergibt sich somit aus der Gleichgewichtskonstanten für die Öffnungsreaktion  $K_{op} = k_{op}/k_{cl}$  und  $k_{int}$ :

$$k_p = K_{op} \cdot k_{int} \quad \text{bzw.} \quad k_p = \frac{k_{op}}{k_{cl}} \cdot k_{int} \quad (21)$$

Diese Form entspricht dem EX2-Mechanismus in H-D-Austauschexperimenten ( $k_{exchange} \ll k_{cl}$ , (Kiefhaber and Baldwin 1995; Park and Marqusee 2004), wenn  $k_{int} \ll k_{cl}$ . Analog zu derartigen Experimenten gilt somit auch hier allgemein

$$k_p = \frac{k_{op} \cdot k_{int}}{k_{cl} + k_{int}} \quad (22)$$

so dass im oben beschriebenen Fall der Limitierung von  $k_p$  durch die Entfaltungsreaktion ( $k_{int} \gg k_{cl}$ ; analog zum EX1-Mechanismus in H-D-Austauschexperimenten, Kiefhaber and Baldwin 1995)

$$k_p = k_{op} \quad (23)$$

gilt, wobei  $k_{op}$  hier  $k_u$  entspricht (Park and Marqusee 2004).

## 5.5 Einfluss von Strukturänderungen auf die Entfaltungsreaktion bzw. die Proteolyseempfindlichkeit unter denaturierenden Bedingungen

(Anlagen A8-10)

Wie es teilweise in den vorigen Kapiteln schon ausgeführt wurde, können Strukturänderungen, d.h. Mutationen, Glykosylierungen, aber auch chemische Modifizierungen wie die Einführung von *cross-links*, Kationisierung mittels Polyethylenimin oder Immobilisierung an lösliche oder unlösliche Trägermaterialien die proteolytische Angreifbarkeit von Proteinen mehr oder weniger dramatisch verändern. Der Effekt auf die Abbaubarkeit des nativen Proteins ist dabei häufig wesentlich stärker beeinflusst als wenn der Abbau über das entfaltete Protein erfolgt. Wie oben ausgeführt sinkt die Proteolyseempfindlichkeit von RNase A gegenüber Proteinase K oder Subtilisin durch die Aminosäuresubstitution A20P auf etwa 1/300 (Anlagen A2 und A3). Der Abbau durch Thermolysin unter denaturierenden Bedingungen wird hingegen nicht beeinflusst (Anlage A10), da durch diese Substitution die kinetische Stabilität des Proteinmoleküls nicht verändert wird. Die Substitution von Aminosäureresten, die in den Aufbau der Entfaltungregion der RNase A involviert sind, führte hingegen zu einem deutlich erhöhten  $k_u$ , verbunden mit einer Verminderung von  $\Delta G$  (Anlage A10, vgl. Kapitel 5.4). Die proteolytische Abbaubarkeit unter Bedingungen, unter denen nicht  $k_u$  geschwindigkeitslimitierend war, blieb jedoch von den Aminosäureaustauschen unbeeinflusst, da es nicht zu einer signifikanten Änderung (Einfügen oder Entfernen) der primären Spaltstellen kam. Ebenso führte das Ersetzen von *cis*-Pro114 gegen 5',5'-dimethylprolin, welches zwar  $\Delta G$  und  $k_f$  von 114-5',5'-dimethylprolin-RNase A im Vergleich zu RNase A erhöht, zu keiner signifikanten Verminderung von  $k_u$  und  $k_p$ , da die modifizierte Region nicht in die Initiierung der Entfaltung und in die Aminosäurereste der primären Spaltstellen involviert war (Anlage A9).

Andererseits gibt es durchaus die Möglichkeit, dass auch unter denaturierenden Bedingungen Modifizierungen einen Einfluss auf die Proteolyseempfindlichkeit haben. Durch Inkubation von RNase B mit den Glykosidasen Endo F bzw.  $\alpha$ -Mannosidase erhält man RNase B-Derivate, die nur noch einen N-Acetylglucosaminrest (GlcNAc) bzw. ein Kohlenhydratrumpfstück aus zwei GlcNAc und drei Mannoseresten am Asn34 tragen. Umgekehrt lässt sich der modifizierende Rest durch Inkubation mit Con A bzw. an Agarose immobilisiertes Con A vergrößern. Auf diese Weise wurde ein Set von sechs RNase A-Formen erhalten, die sich graduell unterscheiden (Anlage A8). Der Einfluss der Größe der Modifizierung auf die Proteolyseempfindlichkeit gegenüber Thermolysin bei 65°C trat unter Bedingungen, unter denen nicht  $k_u$  geschwindigkeitslimitierend war (d.h. bei 500–1000fachem Thermolysinunterschuss) sehr deutlich zu Tage:  $k_p$  sank im Vergleich zu RNase A über 85% für GlcNAc-RNase, 60% für GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>-RNase, 37% für RNase B und 25% für RNase B-Con A auf 20% für RNase B-Con A-Agarose (Anlage A8). Unter Bedingungen, unter denen  $k_u$  hingegen geschwindigkeitslimitierend war, betrug  $k_p$  (=  $k_u$ ) für alle Nicht-RNase A-Varianten (32±5)% von  $k_p$  (=  $k_u$ ) für RNase A. Das bedeutet, dass der modifizierende Rest zwar mit zunehmender Größe die Proteolyse-resistenz des RNase A-Moleküls gegen Thermolysin erhöht (durch Abschirmung der primären Spaltstelle Asn34–Leu35, was durch eine Abnahme der Intensität der Bande für das Fragment 35–124 in den SDS-PAGE-Gelen zum Ausdruck kam),  $k_u$  hingegen nur durch den ersten Mannoserest beeinflusst wird (Anlage A8).

## 5.6 Auswirkung von Struktur- und Konformationsänderungen auf die Proteolyseempfindlichkeit von Proteinen *in vivo*

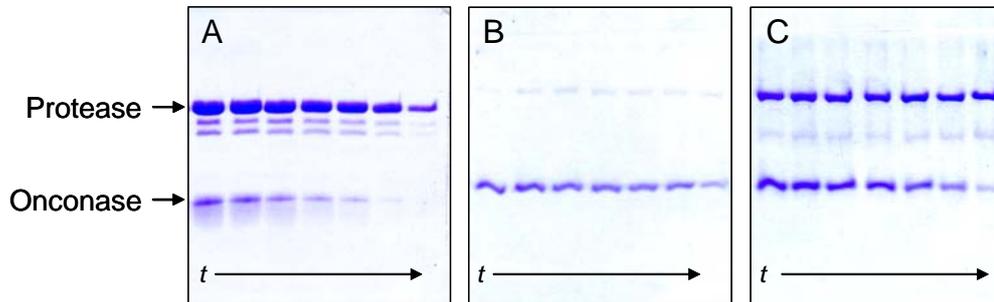
(Anlagen A12-15)

Wie in Kapitel 4.1.4 angedeutet wurde, eignen sich RNasen wie einige andere Proteine bzw. Enzyme zu Therapie-zwecken. Neben einer geeigneten Verabreichungsform und der *clearance*, d.h. dem Ausscheiden der Verbindung aus dem Organismus über die Nieren, ist natürlich auch die Stabilität der entsprechenden Proteinkonstrukte für ihre biologische Wirksamkeit von großer Bedeutung. Häufig finden so genannte Fusionsproteine Anwendung, bei denen eine *targeting moiety*, die eine hohe Affinität zu bestimmten Markern der Zielzellen aufweist (z.B. Anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper, Rybak and Newton 1999), mit dem entsprechenden Effektormolekül verknüpft ist. Um eine hinreichende *in vivo*-Stabilität der

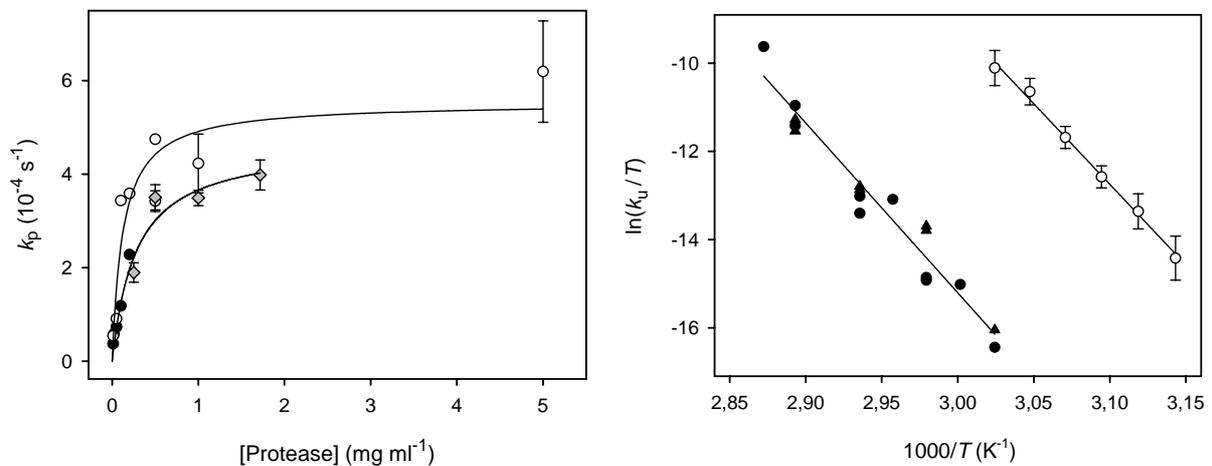
Konstrukte zu gewährleisten müssen nicht nur die Einzelkomponenten stabil sein, sondern auch die diese verbindenden *linker*, i.d.R. Peptidsequenzen. Eine hohe *in vitro*-Thermostabilität ist dabei oftmals mit einer erhöhten *in vivo*-Proteolysestabilität verbunden (McLendon and Radany 1978; Daniel *et al.* 1982; Parsell and Sauer 1989). Dice und Goldberg (Dice and Goldberg 1975) konnten zudem durch die Untersuchung zahlreicher Proteine zeigen, dass *in vivo* große Proteine oder solche mit einem niedrigen pI schneller abgebaut werden als kleine Proteine oder solche mit einem hohen pI. Da RNasen der RNase A-Superfamilie ein Molekulargewicht von ca. 13 kDa und pI-Werte um 9,3 aufweisen, scheinen sie auch aus dieser Sicht als für *in vivo*-Applikationen geeignet.

RNasen stellen aufgrund ihrer ribonucleolytischen Aktivität potenzielle Alternativen zu traditionellen Chemotherapeutika dar. Um zu ihrem Wirkungsort, dem Zytosol bzw. den darin enthaltenen RNAs, zu gelangen, müssen sie mit der Zellmembran interagieren, in die Zelle aufgenommen werden und dort nicht nur gegen die inaktivierende Wirkung des endogenen, zytosolischen Ribonucleaseinhibitors sondern auch gegen die intrazellulären Proteasen resistent sein (Leland and Raines 2001; Arnold and Ulbrich-Hofmann 2006). Da die Aufnahme der RNasen nach Interaktion mit der Zellmembran (aufgrund ihres hohen pI binden viele Vertreter der RNase A-Superfamilie an die negativ geladene Oberfläche von Zellemembranen) über Endozytose erfolgt (Haigis and Raines 2003), müssen sie gegenüber den endosomalen (bzw. nachfolgend gegenüber den lysosomalen) und (nach Translokation) gegenüber den zytosolischen Proteasen resistent sein. Onconase ist mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1  $\mu$ M (Haigis and Raines 2003, Anlage **A14**) nicht nur der (in der Wildtypform) zytotoxischste sondern mit  $T_m = 90^\circ\text{C}$  und  $\Delta G = 60 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Anlage **A12**) auch der stabilste Vertreter der RNase A-Superfamilie. RNase A ist (in der Wildtypform) nicht zytotoxisch und mit  $T_m = 64^\circ\text{C}$  und  $\Delta G = 40 \text{ kJ mol}^{-1}$  deutlich weniger stabil. Onconase wird durch Chymotrypsin bei  $37^\circ\text{C}$  über 24 h kaum messbar abgebaut (Notomista *et al.* 2000) und auch der Abbau von RNase A erfolgt unter vergleichbaren Bedingungen mit  $k_p \approx 2 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  sehr langsam (U. Arnold, unveröffentlichte Daten). Wie in Abb. 8 gezeigt, wird native RNase A sehr effizient durch unspezifische RNasen wie Subtilisin, Elastase oder Proteinase K abgebaut. Für Onconase konnte hingegen bis  $55^\circ\text{C}$  weder durch Proteinase K<sup>Anm. 15</sup> noch durch Trypsin<sup>Anm. 16</sup> oder Thermolysin ein messbarer Abbau beobachtet werden (Abb. 17, U. Arnold, unveröffentlichte Daten). Bei Temperaturen über  $60^\circ\text{C}$  konnte ein Abbau durch Proteinase K detektiert werden, jedoch erwies sich die Stabilität der Proteinase K selbst als zu gering, um bei  $k_p \approx 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ( $60^\circ\text{C}$ ) bis  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $70^\circ\text{C}$ ;  $k_u$ -Werte ermittelt durch Proteolyse mit Thermolysin, vgl. Abb. 18) über den gesamten Inkubationszeitraum eine konstante Aktivität aufzuweisen (Abb. 17A; postuliert durch Abnahme der Proteinase K-

Konzentration infolge Autoproteolyse). Die Aktivitätsabnahme sollte sich entsprechend in den  $k_p$ -Werten widerspiegeln.



**Abb. 17:** SDS-PAGE-Gele des proteolytischen Abbaus von Onconase durch Proteinase K (A, 0,5 mg ml<sup>-1</sup>), Boilysin (B, 0,025 mg ml<sup>-1</sup>) bzw. Thermolysin (C, 0,25 mg ml<sup>-1</sup>) bei 62,5°C. Die Inkubationszeiten betragen 0–3 h für A und B und 0–1,5 h für C. Boilysin wurde freundlicherweise von Frau Dr. J. Mansfeld, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, zur Verfügung gestellt. Zu erkennen ist deutlich die Abnahme der Proteinase K-Bande in A.



**Abb. 18:**  $k_p$  für Onconase als Funktion der Konzentration von Proteinase K (○), Boilysin (●) bzw. Thermolysin (◆) bei 62,5°C (links). Eyring-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der thermisch induzierten Entfaltungsreaktion von RNase A (○, ermittelt durch limitierte Proteolyse mit Thermolysin) bzw. von Onconase (▲, ermittelt durch limitierte Proteolyse mit Proteinase K, ●, ermittelt durch limitierte Proteolyse mit Boilysin).

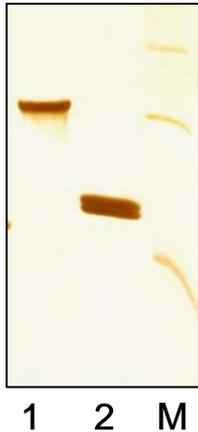
Die  $k_p$  vs. [Proteinase K]-Funktion zeigte dennoch eindeutig eine hyperbole Abhängigkeit, was einen Abbau über das entfaltete Protein anzeigt (Abb. 18A). Überraschenderweise stimmten die mittels Gl. 20 errechneten  $k_u$ -Wert sehr gut mit den durch Proteolyse mit Thermolysin/Boilysin ermittelten Werten überein; offenbar ist die Proteinase K-Aktivität

trotz der Autoproteolyse noch ausreichend, um entsprechend Gl. 17–20 (Kapitel 5.4) keine Akkumulation von U zuzulassen. Die beiden thermostabilen Proteasen Boilysin und Thermolysin erwiesen sich aufgrund ihrer Thermostabilität als geeignet, die thermische Entfaltung der Onconase ohne Autoproteolyse zu verfolgen (Abb. 17B und C) – auch hier folgte die  $k_p$  vs. [Protease]-Auftragung einer hyperbolen Funktion (Abb. 18A). Aus der entsprechenden Eyring-Auftragung (Abb. 18B) ist zu erkennen, dass Onconase signifikant (ca. 100fach) langsamer entfaltet als RNase A, was in Übereinstimmung mit den spektroskopischen Messungen zur Stabilität und Faltung von Onconase (im Vergleich zu RNase A) ist (Anlage **A12**).

Die hohe (thermische und) Proteolysestabilität der Onconase könnte – basierend auf der eingangs erwähnten Abhängigkeit von thermischer bzw. Proteolysestabilität und *in vivo*-Stabilität – neben anderen ein Grund für die deutliche Zytotoxizität des Enzyms sein, wie auch aus Studien zur Thermostabilität und Zytotoxizität von RNase A-Varianten abgeleitet wurde (Klink and Raines 2000). Andererseits wurde für diverse (katalytisch signifikant geringer als RNase A aktive) Onconase-Mutanten, die sich hinsichtlich ihrer thermodynamischen und/oder katalytischen Aktivität unterschieden, festgestellt, dass hier eher eine Limitierung der Zytotoxizität durch die katalytische Aktivität als durch die thermodynamische Stabilität vorliegt (Anlage **A14**). Im Gegensatz zu Onconase waren die thermodynamisch instabileren Mutanten ( $\Delta G = 20\text{--}30 \text{ kJ mol}^{-1}$ ; Anlage **A12**) alle bei 25°C durch Proteinase K abbaubar (C. Schulenburg, persönliche Mitteilung), so dass hier offenbar die o.g. Korrelation zwischen thermodynamischer und Proteolysestabilität besteht.

Da jedoch Onconase, die sich als Therapeutikum gegen verschiedene Tumortypen in der klinischen Testung befindet (Costanzi *et al.* 2005; Pavlakis and Vogelzang 2006), reversibel nephrotoxisch ist (Vasandani *et al.* 1999), bestehen Bestrebungen, dieses Enzym aus Amphibien gegen eines aus Säugern, nach Möglichkeit aus dem Menschen, zu ersetzen. Neben vielen anderen interessanten und Erfolg versprechenden Ansätzen (für eine Übersicht s. Arnold and Ulbrich-Hofmann 2006) wurden aus RNase A so genannte Tandemenzyme generiert, bei denen durch Genduplikation zwei RNase A-Moleküle über einen Peptid-*linker* miteinander verknüpft wurden (Anlage **A13**). Auf diese Weise entstanden RNase A-Varianten, die aufgrund einer effizienteren Endozytose im Gegensatz zur nicht zytotoxischen RNase A  $IC_{50}$ -Werte im  $\mu\text{M}$ -Bereich aufwiesen (Anlagen **A13** und **A15**). Obwohl die Struktur der RNase A-Einheiten durch die „Tandemisierung“ unbeeinflusst blieb, stellte die flexible *linker*-Sequenz einen möglichen Angriffsort für Proteasen dar. Daher wurde die Aminosäuresequenz variiert (Prolin-haltige *linker*, flexible Ser-Gly-*linker* sowie

Ser-Gly-*linker*, die zur Erhöhung der Nettoladung Argininreste enthielten). Erwartungsgemäß war der SGRSGRSG-*linker* empfindlich für einen Angriff durch Trypsin; das Ergebnis waren RNase A-Einheiten mit einer C-terminalen SGR-Extension bzw. einer N-terminalen SG-Extension (Abb. 19).



**Abb. 19:** SDS-PAGE-Gel des proteolytischen Abbaus des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms durch Trypsin. SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym vor (1) bzw. nach (2) Inkubation in Gegenwart von Trypsin (durch zweifache Spaltung im linker entstehen 2 Fragmente RNase A-SGR und SG-RNase A). Das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym wurde freundlicherweise von Frau Dipl.-Biochem. F. Leich, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt. Es sind zudem die Markerproteine (M) Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa) und Cytochrom c (12,4 kDa) gezeigt.

Der Abbau durch Proteinase K verlief unter naiven Bedingungen wie bei RNase A über die Peptidbindungen Ala20-Ser21 bzw. Ala20'-Ser21' ohne Bevorzugung der einen oder anderen Position (Rietz 2006). Durch Thermolysin, welches native RNase A praktisch nicht proteolytisch angreifen kann, wurden die RNase A-Tandemenzyme überraschenderweise abgebaut. Hier konnte die Spaltung der Peptidbindung Ser123-Val124 nachgewiesen werden – offenbar wird diese potenzielle Spaltstelle durch das „Anhängen“ der *linker*-Sequenz und der damit möglichen Interaktion der P<sub>2</sub>'-, P<sub>3</sub>'-Reste usw. mit dem Thermolysin zu einer tatsächlichen Spaltstelle. Durch Modellierung des zeitlichen Verlaufs der Entstehung und des Folgeabbaus der Fragmente 1-123 und 124-124' konnten die  $k_u$ -Werte der Fragmente bei 52°C bestimmt werden. Während das Fragment mit der N-terminalen Extension praktisch genauso schnell entfaltet wie RNase A ( $k_u = 2,0 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$ ), entfaltet das C-terminal verkürzte Fragment etwa fünfmal schneller, was die Bedeutung von Val124 für die Stabilität des RNase A-Moleküls unterstreicht.

Von großem Interesse war nun natürlich die Proteolyseresistenz der RNase A-Tandemenzyme unter *in vivo*-Bedingungen. Neff *et al.* (Neff *et al.* 1981) ermittelten für in Fibroblasten mikroinjizierte <sup>125</sup>I-markierte RNase A eine Halbwertszeit von ca. 85 h und McElligot *et al.* (McElligott *et al.* 1985) zeigten, dass der Abbau sowohl endozytotisch aufgenommenener als auch mikroinjizierter <sup>3</sup>H-Raffinose-markierter RNase A hauptsächlich in den Lysosomen erfolgt. Im Gegensatz dazu ergab die Analyse des proteolytischen Abbaus

der RNase A-Tandemenzyme durch die Proteasen der isolierten Fraktionen des Zytosols bzw. der Lysosomen, dass sie durch diese über 100 h nicht abgebaut wurden (Anlage **A15**; zum Vergleich: für Rinderserumalbumin wurde unter denselben Bedingungen eine Halbwertszeit von 17-20 h bestimmt). Damit konnte eine für *in vivo*-Applikationen hinreichende Stabilität der RNase A-Tandemenzyme gezeigt werden. Ebenso ergab die Analyse des Gehalts an RNase A-Tandemenzymen in intakten K-562-Zellen, dass nach endozytotischer Aufnahme über wenigstens 54 h kein Abbau erfolgte (Anlage **A15**). Beide Ergebnisse unterstützen den Ansatz, auf RNase A basierende Antitumorthapeutika zu generieren.

## 6 Resümee

Die limitierte Proteolyse stellt eine exzellente Methode zur Charakterisierung der nativen Struktur von Proteinen dar, da die Proteolyseempfindlichkeit einer Strukturregion im Proteinmolekül von ihrer Flexibilität abhängt. Durch die Analyse der entstehenden Peptidfragmente kann auf die Topologie des Proteinmoleküls geschlossen werden und aus der ermittelbaren Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse auf die Flexibilität und Solvenz Zugänglichkeit der entsprechenden strukturellen Region. Lokale Konformationsänderungen können ebenso detektiert werden wie globale – eine Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion unter nativen bzw. nativähnlichen Bedingungen ist im Gegensatz zu den meisten konventionellen spektroskopischen Methoden möglich. Eine mehr oder weniger fehlerbehaftete Extrapolation aus Geschwindigkeitskonstanten, die unter denaturierenden Bedingungen erhalten wurden, ist hier nicht erforderlich. Neben einer einfachen apparatetechnischen Ausstattung liegen die Vorteile für die experimentellen Arbeiten v.a. in der vergleichsweise geringen Proteinkonzentration bzw. -menge, die für die Analysen erforderlich ist, und darin, dass es praktisch keine Limitierung hinsichtlich der Größe der zu untersuchenden Proteine gibt.

In der vorliegenden Arbeit wurden – aufbauend auf den Resultaten meiner Dissertation (vgl. Arnold *et al.* 1996 und Arnold and Ulbrich-Hofmann 1997) – verschiedene Fragestellungen bearbeitet, die Beiträge zu methodischen Aspekten der limitierten Proteolyse sowie zum Verständnis von Entfaltungsprozessen auf der submolekularen Ebene und zur Stabilität und Stabilisierung von Proteinen lieferten.

Durch Bestimmung der Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse von der Proteasekonzentration und den experimentellen Bedingungen ließ sich diskriminieren, ob das native Protein ein Proteasesubstrat darstellt oder ob der proteolytische Abbau des Zielproteins durch lokale Entfaltungsprozesse oder ausschließlich nach globaler Entfaltung erfolgt (Anlagen **A1-3**, **A7**).

Für RNase A konnte durch ortsgerichtete Mutagenese der Abbauweg durch Elastase aufgeklärt werden. Trotz scheinbar gleicher Substratspezifität erfolgt die Primärsplaltung an einer anderen Peptidbindung als bei Subtilisin und Proteinase K (Anlagen **A2**, **A3**).

Durch Punktmutationen wurde die Proteolyseresistenz von nativer RNase A gegenüber den unspezifischen Proteasen Subtilisin, Proteinase K und Elastase um 2–3 Größenordnungen gesteigert, wobei gezeigt werden konnte, dass das Prolinkonzept dem Ladungskonzept überlegen ist (Anlagen **A2-3**).

Die vergleichende Analyse der thermodynamischen Stabilität, der Entfaltungskinetik und der Faltungskinetik von RNase A, von ihrer glykosylierten Variante, der RNase B, von zahlreichen RNase A-Mutanten sowie RNase A-Varianten, in die mittels *expressed protein ligation* nichtnatürliche Strukturmimetika inkorporiert worden waren, trug zur Klärung des Beitrags einzelner struktureller Regionen (*loops*, *chain folding initiation site*, Entfaltungsregion) der RNase A zur Gesamtstabilität des Moleküls bei (Anlagen **A7-11**).

Für die deutlich stabilere Onconase, einem weiteren Vertreter aus der RNase A-Superfamilie, konnten mittels limitierter Proteolyse Geschwindigkeitskonstanten der thermisch induzierten Entfaltungsreaktion bestimmt werden. Diese zeigten – in Übereinstimmung zu spektroskopischen Untersuchungen zur GdnHCl-induzierten Entfaltung von Onconase – an, dass die erhöhte thermodynamische Stabilität der Onconase v.a. durch eine drastische Verlangsamung der Entfaltungsreaktion begründet ist (Anlage **A12**).

Die Analyse der Entfaltungs- bzw. Proteolysekinetik im prätransitionalen Bereich ergab, dass für RNase A über einen weiten Bereich experimenteller Bedingungen eine lineare Beziehung zwischen  $\ln k_u$  und der Harnstoffkonzentration (*chevron plot*) bzw. zwischen  $\ln(k_u/T)$  und  $1/\text{Temperatur}$  (Eyring-Auftragung) besteht. Unter nativen Bedingungen erfolgte der proteolytische Abbau schneller als erwartet, was hier einen veränderten Entfaltungs- oder zumindest Abbauweg anzeigt. Interessanterweise wurde in geringen Konzentrationen von Harnstoff, GdnHCl und TFE eine Abnahme der Proteolyseempfindlichkeit der RNase A detektiert. Trotz der unterschiedlichen Mechanismen, nach denen diese Denaturanzien wirken, resultierte aus ihrer Zugabe generell eine (lokale) Stabilisierung des RNase A-Moleküls, d.h. eine Abnahme der Flexibilität (Anlagen **A5-7**).

Die Identifizierung der primären Spaltstellen in RNase A für verschiedene Proteasen unter thermischer bzw. GdnHCl- oder TFE-induzierter Denaturierung zeigte deutliche Unterschiede zwischen den drei Denaturanzien bzw. dem denaturierten Zustand der RNase A in denselben auf. Der Zusammenbruch der Tertiärstruktur führte in allen Fällen zu einem Anstieg der Proteolyseempfindlichkeit und zu einer Zunahme der Zugänglichkeit potenzieller Spaltstellen. Aufgrund des sekundärstrukturinduzierenden Effekts von TFE wurden hier jedoch deutlich weniger primäre Spaltstellen identifiziert als nach thermischer oder GdnHCl-induzierter Denaturierung (Anlagen **A5-6**).

Mit RNase A-Tandemenzymen konnten zytotoxische RNase A-Varianten kreiert werden, für die eine effizientere Aufnahme in die Zielzelle als Hauptursache für ihre Zytotoxizität identifiziert werden konnte. Obwohl der die beiden RNase A-Einheiten verbindende Peptid-*linker* flexibel und potenziell proteolyseempfindlich ist, konnte gezeigt werden, dass die Konstrukte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gegen die intrazellulären Proteasen stabil sind – eine wesentliche Voraussetzung für die Applikation proteinogener Therapeutika (Anlagen **A13, A15**).

## 7 Literatur

- Acharya, A.S., Iyer, K.S., Sahni, G., Khandke, K.M., and Manjula, B.N. (1992) Restriction in the conformational flexibility of apoproteins in the presence of organic cosolvents: a consequence of the formation of "native-like conformation", *J. Protein Chem.*, **11**, 527-538.
- Agarraberes, F.A., and Dice, J.F. (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation, *J. Cell Sci.*, **114**, 2491-2499.
- Allende, J.E., and Richards, F.M. (1962) The action of trypsin on ribonuclease-S, *Biochemistry*, **1**, 295-304.
- An, S.S.A., Cathy, C.C., Peng, J.-L., Li, Y.-J., Rothwarf, D.M., Welker, E., Thannhauser, T.W., Zhang, L.S., Tam, J.P., and Scheraga, H.A. (1999) Retention of the *cis* proline conformation in tripeptide fragments of bovine pancreatic ribonuclease A containing a non-natural proline analogue, 5,5-dimethylproline, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11558-11566.
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains, *Science*, **181**, 223-230.
- Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., and White, F.H., Jr. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **47**, 1309-1314.
- Arnold, U., Hinderaker, M.P., Köditz, J., Golbik, R., Ulbrich-Hofmann, R., and Raines, R.T. (2003) Protein prosthesis: a nonnatural residue accelerates folding and increases stability, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7500-7501.
- Arnold, U., Hinderaker, M.P., Nilsson, B.L., Huck, B.R., Gellman, S.H., and Raines, R.T. (2002) Protein prosthesis: a semisynthetic enzyme with a beta-peptide reverse turn, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8522-8523.
- Arnold, U., Rücknagel, K.P., Schierhorn, A., and Ulbrich-Hofmann, R. (1996) Thermal unfolding and proteolytic susceptibility of ribonuclease A, *Eur. J. Biochem.*, **237**, 862-869.
- Arnold, U., Schulenburg, C., Schmidt, D., and Ulbrich-Hofmann, R. (2006) Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics, *Biochemistry*, **45**, 3580-3587.
- Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. (1997) Kinetic and thermodynamic thermal stabilities of ribonuclease A and ribonuclease B, *Biochemistry*, **36**, 2166-2172.
- Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. (2000) Differences in the denaturation behavior of ribonuclease A induced by temperature and guanidine hydrochloride, *J. Protein Chem.*, **19**, 345-352.
- Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. (2001) Proteolytic degradation of ribonuclease A in the pretransition region of thermally and urea-induced unfolding, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 93-97.
- Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. (2006) Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics, *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1615-1622.
- Backer, J.M., Bourret, L., and Dice, J.F. (1983) Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A requires the amino-terminal 20 amino acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 2166-2170.
- Backer, J.M., and Dice, J.F. (1986) Covalent linkage of ribonuclease S-peptide to microinjected proteins causes their intracellular degradation to be enhanced during serum withdrawal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 5830-5834.
- Bai, Y., Sosnick, T.R., Mayne, L., and Englander, S.W. (1995) Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange, *Science*, **269**, 192-197.
- Bajorath, J., Hinrichs, W., and Saenger, W. (1988) The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium, *Eur. J. Biochem.*, **176**, 441-447.
- Balbach, J., and Schmid, F.X. (2000) Proline isomerization and its catalysis in protein folding. In *Mechanisms of protein folding*, 2nd ed. (ed. R.H. Pain), pp. 212-249. Oxford University Press Inc., New York.
- Baldwin, R.L. (1993) Pulsed H/D-exchange studies of folding intermediates, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **3**, 84-91.
- Barrett, A.J., and McDonald, J.K. (1986) Nomenclature: protease, proteinase and peptidase, *Biochem. J.*, **237**, 935.
- Beintema, J.J., Breukelman, H.J., Carsana, A., and Furia, A. (1997) Evolution of vertebrate ribonucleases: Ribonuclease A superfamily. In *Ribonucleases: Structures and functions*, 1st ed. (eds. G. D'Alessio, and J.F. Riordan), pp. 245-269. Academic Press, New York.

- Beintema, J.J., and Kleineidam, R.G. (1998) The ribonuclease A superfamily: general discussion, *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 825-832.
- Benz, F.W., and Roberts, G.C. (1975) Nuclear magnetic resonance studies of the unfolding of pancreatic ribonuclease. II. Unfolding by urea and guanidine hydrochloride, *J. Mol. Biol.*, **91**, 367-387.
- Betton, J.M., Missiakas, D., and Yon, J.M. (1992) The slow-refolding step of phosphoglycerate kinase as monitored by pulse proteolysis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 95-101.
- Bieri, O., and Kiefhaber, T. (2000) Kinetic models in protein folding. In *Mechanisms of protein folding*, 2nd ed. (ed. R.H. Pain), pp. 34-64. Oxford University Press Inc., New York.
- Birch, N.P., and Loh, Y.P. (1990) Proteases in protein maturation. In *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. (ed. R.J. Beynon, Bond, J.S.), pp. 211-230. IRL Press, Oxford.
- Birkeland, A.J., and Christensen, T.B. (1975) Resistance of glycoproteins to proteolysis, Ribonuclease-A and -B compared, *J. Carbohydr. Nucleos. Nucleot.*, **2**, 83-90.
- Blum, A.D., Smallcombe, S.H., and Baldwin, R.L. (1978) Nuclear magnetic resonance evidence for a structural intermediate at an early stage in the refolding of ribonuclease A, *J. Mol. Biol.*, **118**, 305-316.
- Bohley, P., and Seglen, P.O. (1992) Proteases and proteolysis in the lysosome, *Experientia*, **48**, 151-157.
- Boix, E., Wu, Y., Vasandani, V.M., Saxena, S.K., Ardelt, W., Ladner, J., and Youle, R.J. (1996) Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity, *J. Mol. Biol.*, **257**, 992-1007.
- Bongers, J., and Heimer, E.P. (1994) Recent applications of enzymatic peptide synthesis, *Peptides*, **15**, 183-193.
- Bordusa, F. (2002) Proteases in organic synthesis, *Chem. Rev.*, **102**, 4817-4868.
- Bosch, M., Benito, A., Ribo, M., Puig, T., Beaumelle, B., and Vilanova, M. (2004) A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity, *Biochemistry*, **43**, 2167-2177.
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R., and Brennan, M. (1975) Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues, *Biochemistry*, **14**, 4953-4963.
- Brömme, D., Peters, K., Fink, S., and Fittkau, S. (1986) Enzyme-substrate interactions in the hydrolysis of peptide substrates by thermolysin, subtilisin BPN', and proteinase K, *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 439-446.
- Bruins, M.E., Janssen, A.E., and Boom, R.M. (2001) Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patents, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **90**, 155-186.
- Buchner, J. (2002) Introduction: the cellular protein folding machinery, *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1587-1588.
- Buck, M. (1998) Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins, *Q. Rev. Biophys.*, **31**, 297-355.
- Budisa, N., Minks, C., Alefelder, S., Wenger, W., Dong, F., Moroder, L., and Huber, R. (1999) Toward the experimental codon reassignment in vivo: protein building with an expanded amino acid repertoire, *FASEB J.*, **13**, 41-51.
- Burgess, A.W., and Scheraga, H.A. (1975) A hypothesis for the pathway of the thermally-induced unfolding of bovine pancreatic ribonuclease, *J. Theor. Biol.*, **53**, 403-420.
- Burgess, A.W., Weinstein, L.I., Gabel, D., and Scheraga, H.A. (1975) Immobilized carboxypeptidase A as a probe for studying the thermally induced unfolding of bovine pancreatic ribonuclease, *Biochemistry*, **14**, 197-200.
- Butler, P.E. (1990) Solubilization of membrane proteins by proteolysis. In *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. (ed. R.J. Beynon, Bond, J. S.), pp. 193-200. IRL Press, Oxford.
- Čeřovský, V., and Scheraga, H.A. (2005) Combined solid-phase/solution synthesis of large ribonuclease A C-terminal peptides containing a non-natural proline analog, *J. Pept. Res.*, **65**, 518-528.
- Chan, H.S., and Dill, K.A. (1990) Origins of structure in globular proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 6388-6392.
- Chatani, E., Hayashi, R., Moriyama, H., and Ueki, T. (2002) Conformational strictness required for maximum activity and stability of bovine pancreatic ribonuclease A as revealed by crystallographic study of three Phe120 mutants at 1.4 Å resolution, *Protein Sci.*, **11**, 72-81.

- Chen, B.L., Baase, W.A., and Schellman, J.A. (1989) Low-temperature unfolding of a mutant of phage T4 lysozyme. 2. Kinetic investigations, *Biochemistry*, **28**, 691-699.
- Chiang, H.L., and Dice, J.F. (1988) Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal, *J. Biol. Chem.*, **263**, 6797-6805.
- Cho, S., Beintema, J.J., and Zhang, J. (2005) The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories, *Genomics*, **85**, 208-220.
- Clark, P.L. (2004) Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel, *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 527-534.
- Clarke, J., and Fersht, A.R. (1993) Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation, *Biochemistry*, **32**, 4322-4329.
- Coll, M., Guasch, A., Aviles, F.X., and Huber, R. (1991) Three-dimensional structure of porcine procarboxypeptidase B: a structural basis of its inactivity, *EMBO J.*, **10**, 1-9.
- Coll, M.G., Protasevich, II, Torrent, J., Ribó, M., Lobachov, V.M., Makarov, A.A., and Vilanova, M. (1999) Valine 108, a chain-folding initiation site-belonging residue, crucial for the ribonuclease A stability, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265**, 356-360.
- Collinet, B., Garcia, P., Minard, P., and Desmadril, M. (2001) Role of loops in the folding and stability of yeast phosphoglycerate kinase, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5107-5118.
- Colman, P.M., Jansonius, J.N., and Matthews, B.W. (1972) The structure of thermolysin: an electron density map at 2.3 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **70**, 701-724.
- Colomer-Pallas, A., Pereira, Y., Petit-Glatron, M.F., and Chambert, R. (2003) Calcium triggers the refolding of *Bacillus subtilis* chitosanase, *Biochem. J.*, **369**, 731-738.
- Cook, K.H., Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. (1979) Role of proline isomerization in folding of ribonuclease A at low temperatures, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 6157-6161.
- Costanzi, J., Sidransky, D., Navon, A., and Goldsweig, H. (2005) Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase, *Cancer Invest.*, **23**, 643-650.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A.L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 801-847.
- Creveld, L.D., Amadei, A., van Schaik, R.C., Pepermans, H.A., de Vlieg, J., and Berendsen, H.J. (1998) Identification of functional and unfolding motions of cutinase as obtained from molecular dynamics computer simulations, *Proteins*, **33**, 253-264.
- Cuervo, A.M. (2004) Autophagy: many paths to the same end, *Mol. Cell Biochem.*, **263**, 55-72.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000) When lysosomes get old, *Exp. Gerontol.*, **35**, 119-131.
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004) Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy, *Science*, **305**, 1292-1295.
- D'Alessio, G. (1993) New and cryptic biological messages from RNases, *Trends Cell Biol.*, **3**, 106-109.
- Daniel, R.M., Cowan, D.A., Morgan, H.W., and Curran, M.P. (1982) A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis, *Biochem. J.*, **207**, 641-644.
- Das, M., and Dasgupta, D. (1998) Enhancement of transcriptional activity of T7 RNA polymerase by guanidine hydrochloride, *FEBS Lett.*, **427**, 337-340.
- Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I., and Kent, S.B. (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science*, **266**, 776-779.
- De Filippis, V., and Fontana, A. (1990) Semisynthesis of carboxy-terminal fragments of thermolysin, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**, 219-227.
- De Lorenzo, C., Arciello, A., Cozzolino, R., Palmer, D.B., Laccetti, P., Piccoli, R., and D'Alessio, G. (2004) A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas, *Cancer Res.*, **64**, 4870-4874.
- De Lorenzo, C., Di Malta, C., Cali, G., Troise, F., Nitsch, L., and D'Alessio, G. (2007) Intracellular route and mechanism of action of ERB-hRNase, a human anti-ErbB2 anticancer immunoagent, *FEBS Lett.*, **581**, 296-300.

- de Sagarra, M.R., Mayo, I., Marco, S., Rodríguez-Vilariño, S., Oliva, J., Carrascosa, J.L., and Castañ, J.G. (1999) Mitochondrial localization and oligomeric structure of HClpP, the human homologue of E. coli ClpP, *J. Mol. Biol.*, **292**, 819-825.
- Debouck, C. (1992) The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **8**, 153-164.
- Dice, J.F., Chiang, H.L., Spencer, E.P., and Backer, J.M. (1986) Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A. Identification of residues 7-11 as the essential pentapeptide, *J. Biol. Chem.*, **261**, 6853-6859.
- Dice, J.F., and Goldberg, A.L. (1975) Relationship between in vivo degradative rates and isoelectric points of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 3893-3897.
- Dill, K.A. (1990) Dominant forces in protein folding, *Biochemistry*, **29**, 7133-7155.
- Dill, K.A., and Chan, H.S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels, *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 10-19.
- Dobson, C.M. (2000) The nature and significance of protein folding. In *Mechanisms of protein folding*, 2nd ed. (ed. R.H. Pain), pp. 1-33. Oxford University Press Inc., New York.
- Dobson, C.M. (2003) Protein folding and misfolding, *Nature*, **426**, 884-890.
- Dobson, C.M., Šali, A., and Karplus, M. (1998) Protein folding: A perspective from theory and experiment, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**.
- Dodge, R.W., and Scheraga, H.A. (1996) Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A, *Biochemistry*, **35**, 1548-1559.
- Doherty, F.J., and Mayer, R.J. (1992) Intracellular protein degradation, 1st ed. IRL Press, Oxford.
- Dürschmidt, P., Mansfeld, J., and Ulbrich-Hofmann, R. (2001) Differentiation between conformational and autoproteolytic stability of the neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* containing an engineered disulfide bond, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3612-3618.
- Eder, J., and Fersht, A.R. (1995) Pro-sequence-assisted protein folding, *Mol. Microbiol.*, **16**, 609-614.
- Edman, P., and Begg, G. (1967) A protein sequenator, *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80-91.
- Eijsink, V.G., Bjork, A., Gaseidnes, S., Sirevag, R., Synstad, B., van den Burg, B., and Vriend, G. (2004) Rational engineering of enzyme stability, *J. Biotechnol.*, **113**, 105-120.
- Eijsink, V.G., Gaseidnes, S., Borchert, T.V., and van den Burg, B. (2005) Directed evolution of enzyme stability, *Biomol. Eng.*, **22**, 21-30.
- Eijsink, V.G., Veltman, O.R., Aukema, W., Vriend, G., and Venema, G. (1995) Structural determinants of the stability of thermolysin-like proteinases, *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 374-379.
- Ellis, R.J. (2001) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 114-119.
- Endo, S., Nagayama, K., and Wada, A. (1985) Probing stability and dynamics of proteins by protease digestion. I: Comparison of protease susceptibility and thermal stability of cytochromes c, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **3**, 409-421.
- Englander, S.W. (2000) Protein folding intermediates and pathways studied by hydrogen exchange, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**, 213-238.
- Eron, J.J., Jr. (2000) HIV-1 protease inhibitors, *Clin. Infect. Dis.*, **30 Suppl 2**, S160-170.
- Evans, P.A., Dobson, C.M., Kautz, R.A., Hatfull, G., and Fox, R.O. (1987) Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis, *Nature*, **329**, 266-268.
- Evans, T.C., Jr., Benner, J., and Xu, M.Q. (1998) Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element, *Protein Sci.*, **7**, 2256-2264.
- Eyring, H. (1935) The activated complex in chemical reactions, *J. Chem. Phys.*, **3**, 107-115.
- Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M., Zambonin, M., and Fontana, A. (1986) Autolysis of thermolysin. Isolation and characterization of a folded three-fragment complex, *Eur. J. Biochem.*, **156**, 221-228.
- Fersht, A.R. (1999) Kinetics of protein folding - a guide to enzyme catalysis and protein folding. In *Structure and mechanism in protein science*, 5th printing 2003 ed, pp. 540-572. W. H. Freeman and Company, New York.

- Fersht, A.R. (2000) Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 1525-1529.
- Fetrow, J.S. (1995) Omega loops: nonregular secondary structures significant in protein function and stability, *FASEB J.*, **9**, 708-717.
- Fischer, G., and Bang, H. (1985) The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, *Biochim. Biophys. Acta*, **828**, 39-42.
- Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984) Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden, *Biomed. Biochim. Acta*, **43**, 1101-1111.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins, *Nature*, **337**, 476-478.
- Flohé, L., and Günzler, W.A. (1990) Enzymes in Analysis and Medicine - Enzymes in therapy. In *Enzymes in industry - Production and applications*, 1st ed. (ed. W. Gerhartz), pp. 178-184. VCH, Weinheim.
- Font, J., Benito, A., Torrent, J., Lange, R., Ribó, M., and Vilanova, M. (2006) Pressure- and temperature-induced unfolding studies: thermodynamics of core hydrophobicity and packing of ribonuclease A, *Biol. Chem.*, **387**, 285-296.
- Fontana, A., de Laureto, P.P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., and Zamboni, M. (2004) Probing protein structure by limited proteolysis, *Acta Biochim. Pol.*, **51**, 299-321.
- Fontana, A., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Scaramella, E., and Zamboni, M. (1999) Limited proteolysis in the study of protein conformation. In *Proteolytic enzymes - Tools and targets*, 1st ed. (eds. E.E. Sterchi, and W. Stöcker), pp. 253-280. Springer-Verlag, Berlin.
- Fox, R.O., Evans, P.A., and Dobson, C.M. (1986) Multiple conformations of a protein demonstrated by magnetization transfer NMR spectroscopy, *Nature*, **320**, 192-194.
- Frenken, L.G., Egmond, M.R., Batenburg, A.M., and Verrips, C.T. (1993) *Pseudomonas glumae* lipase: increased proteolytic stability by protein engineering, *Protein Eng.*, **6**, 637-642.
- Garcia-Touchard, A., Henry, T.D., Sangiorgi, G., Spagnoli, L.G., Mauriello, A., Conover, C., and Schwartz, R.S. (2005) Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 1119-1127.
- Garel, J.R., and Baldwin, R.L. (1973) Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3347-3351.
- Gåseidnes, S., Synstad, B., Jia, X., Kjellesvik, H., Vriend, G., and Eijsink, V.G. (2003) Stabilization of a chitinase from *Serratia marcescens* by Gly->Ala and Xxx->Pro mutations, *Protein Eng.*, **16**, 841-846.
- Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A., and Desnick, R.J. (1996) Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency, *Science*, **273**, 1236-1238.
- Gill, I., Lopez-Fandino, R., Jorba, X., and Vulfson, E.N. (1996) Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 163-183.
- Gocheva, V., and Joyce, J.A. (2007) Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion, *Cell Cycle*, **6**, 60-64.
- Goguen, J.D., Hoe, N.P., and Subrahmanyam, Y.V. (1995) Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches, *Infect. Agents Dis.*, **4**, 47-54.
- Goldberg, A.L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins, *Nature*, **426**, 895-899.
- Grafl, R., Lang, K., Vogl, H., and Schmid, F.X. (1987) The mechanism of folding of pancreatic ribonucleases is independent of the presence of covalently linked carbohydrate, *J. Biol. Chem.*, **262**, 10624-10629.
- Grassmann, W., and Dyckerhoff, H. (1928) Über die Proteinase und die Polypeptidase der Hefe, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **179**, 41-78.
- Grathwohl, C., and Wüthrich, K. (1981) NMR studies of the rates of proline cis-trans isomerization in oligopeptides, *Biopolymers*, **20**, 2623-2633.

- Greene, R.F., Jr., and Pace, C.N. (1974) Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, alpha-chymotrypsin, and beta-lactoglobulin, *J. Biol. Chem.*, **249**, 5388-5393.
- Gu, H., Kim, D., and Baker, D. (1997) Contrasting roles for symmetrically disposed beta-turns in the folding of a small protein, *J. Mol. Biol.*, **274**, 588-596.
- Haigis, M.C., and Raines, R.T. (2003) Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway, *J. Cell Sci.*, **116**, 313-324.
- Hammond, G.S. (1955) A correlation of reaction rates, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 334-338.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein, *Science*, **295**, 1852-1858.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., and Wolf, D.H. (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing, *J. Biol. Chem.*, **272**, 25200-25209.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation, *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 761-807.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425-479.
- Hilt, W., and Wolf, D.H. (1996) Proteasomes: destruction as a programme, *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 96-102.
- Hipfner, D.R., and Cohen, S.M. (2004) Connecting proliferation and apoptosis in development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **5**, 805-815.
- Hirs, C.H., Moore, S., and Stein, W.H. (1956a) Peptides obtained by tryptic hydrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease, *J. Biol. Chem.*, **219**, 623-642.
- Hirs, C.H., Moore, S., and Stein, W.H. (1960) The sequence of the amino acid residues in performic acid-oxidized ribonuclease, *J. Biol. Chem.*, **235**, 633-647.
- Hirs, C.H., Stein, W.H., and Moore, S. (1956b) Peptides obtained by chymotryptic hydrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease; a partial structural formula for the oxidized protein, *J. Biol. Chem.*, **221**, 151-169.
- Holland, D.R., Tronrud, D.E., Pley, H.W., Flaherty, K.M., Stark, W., Jansonius, J.N., McKay, D.B., and Matthews, B.W. (1992) Structural comparison suggests that thermolysin and related neutral proteases undergo hinge-bending motion during catalysis, *Biochemistry*, **31**, 11310-11316.
- Hondal, R.J., Nilsson, B.L., and Raines, R.T. (2001) Selenocysteine in native chemical ligation and expressed protein ligation, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5140-5141.
- Houry, W.A., Rothwarf, D.M., and Scheraga, H.A. (1994) A very fast phase in the refolding of disulfide-intact ribonuclease A: implications for the refolding and unfolding pathways, *Biochemistry*, **33**, 2516-2530.
- Houry, W.A., and Scheraga, H.A. (1996) Nature of the unfolded state of ribonuclease A: effect of *cis-trans* X-Pro peptide bond isomerization, *Biochemistry*, **35**, 11719-11733.
- Hubbard, S.J. (1998) The structural aspects of limited proteolysis of native proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1382**, 191-206.
- Hubbard, S.J., Beynon, R.J., and Thornton, J.M. (1998) Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures, *Protein Eng.*, **11**, 349-359.
- Hubbard, S.J., Eisenmenger, F., and Thornton, J.M. (1994) Modeling studies of the change in conformation required for cleavage of limited proteolytic sites, *Protein Sci.*, **3**, 757-768.
- Imoto, T., Fukuda, K., and Yagishita, K. (1976) A study of the native-denatured (N in equilibrium with D) transition in lysozyme. II. Kinetic analysis of protease digestion, *J. Biochem.*, **80**, 1313-1318.
- Imoto, T., Yamada, H., and Ueda, T. (1986) Unfolding rates of globular proteins determined by kinetics of proteolysis, *J. Mol. Biol.*, **190**, 647-649.
- Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., and Wells, J.A. (1994) A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues, *Science*, **266**, 243-247.
- Jackson, S.E. (1998) How do small single-domain proteins fold?, *Fold. Des.*, **3**, R81-91.
- Jackson, S.E., elMasry, N., and Fersht, A.R. (1993) Structure of the hydrophobic core in the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2: a critical test of the protein engineering method of analysis, *Biochemistry*, **32**, 11270-11278.

- Jackson, S.E., and Fersht, A.R. (1991) Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition, *Biochemistry*, **30**, 10428-10435.
- Jesenberger, V., and Jentsch, S. (2002) Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 112-121.
- Joao, H.C., and Dwek, R.A. (1993) Effects of glycosylation on protein structure and dynamics in ribonuclease B and some of its individual glycoforms, *Eur. J. Biochem.*, **218**, 239-244.
- Joao, H.C., Scragg, I.G., and Dwek, R.A. (1992) Effects of glycosylation on protein conformation and amide proton exchange rates in RNase B, *FEBS Lett.*, **307**, 343-346.
- Jones, W. (1920) The action of boiled pancreas extract on yeast nucleic acid, *Am. J. Physiol.*, **52**, 203-207.
- Juminaga, D., Wedemeyer, W.J., and Scheraga, H.A. (1998) Proline isomerization in bovine pancreatic ribonuclease A. 1. Unfolding conditions, *Biochemistry*, **37**, 11614-11620.
- Junn, E., Ronchetti, R.D., Quezado, M.M., Kim, S.Y., and Mouradian, M.M. (2003) Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 2047-2052.
- Kartha, G., Bello, J., and Harker, D. (1967) Tertiary structure of ribonuclease, *Nature*, **213**, 862-865.
- Kauzmann, W. (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation, *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1-63.
- Kellermann, J. (1999) Proteases in peptide mapping and sequencing. In *Proteolytic enzymes - Tools and targets*, 1st ed. (eds. E.E. Sterchi, and W. Stöcker), pp. 233-252. Springer-Verlag, Berlin.
- Kessler, E., and Safrin, M. (1994) The propeptide of *Pseudomonas aeruginosa* elastase acts an elastase inhibitor, *J. Biol. Chem.*, **269**, 22726-22731.
- Kiefhaber, T., and Baldwin, R.L. (1995) Kinetics of hydrogen bond breakage in the process of unfolding of ribonuclease A measured by pulsed hydrogen exchange, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 2657-2661.
- Kiefhaber, T., and Baldwin, R.L. (1996) Hydrogen exchange and the unfolding pathway of ribonuclease A, *Biophys. Chem.*, **59**, 351-356.
- Kiefhaber, T., Labhardt, A.M., and Baldwin, R.L. (1995) Direct NMR evidence for an intermediate preceding the rate-limiting step in the unfolding of ribonuclease A, *Nature*, **375**, 513-515.
- Kiefhaber, T., and Schmid, F.X. (1992) Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. II. Folding of ribonuclease A and ribonuclease T1, *J. Mol. Biol.*, **224**, 231-240.
- Kim, B.M., Kim, H., Raines, R.T., and Lee, Y. (2004) Glycosylation of onconase increases its conformational stability and toxicity for cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 976-983.
- Kim, P.S., and Baldwin, R.L. (1980) Structural intermediates trapped during the folding of ribonuclease A by amide proton exchange, *Biochemistry*, **19**, 6124-6129.
- Kim, Y.J., Kim, Y.A., Park, N., Son, H.S., Kim, K.S., and Hahn, J.H. (2005) Structural characterization of the molten globule state of apomyoglobin by limited proteolysis and HPLC-mass spectrometry, *Biochemistry*, **44**, 7490-7496.
- Klee, W.A. (1965) Ribonuclease E, an intermediate in the degradation of ribonuclease by porcine elastase, *J. Biol. Chem.*, **240**, 2900-2906.
- Klee, W.A. (1967) Intermediate stages in the thermally induced transconformation reactions of bovine pancreatic ribonuclease A, *Biochemistry*, **6**, 3736-3742.
- Klink, T.A., and Raines, R.T. (2000) Conformational stability is a determinant of ribonuclease A cytotoxicity, *J. Biol. Chem.*, **275**, 17463-17467.
- Klink, T.A., Woycechowsky, K.J., Taylor, K.M., and Raines, R.T. (2000) Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 566-572.
- Köditz, J. (2004) Lokale Änderungen der Struktur und ihr Einfluss auf die Stabilität und Faltung von Ribonuklease A. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Köditz, J., Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. (2002) Dissecting the effect of trifluoroethanol on ribonuclease A. Subtle structural changes detected by nonspecific proteases, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3831-3837.
- Köditz, J., Ulbrich-Hofmann, R., and Arnold, U. (2004) Probing the unfolding region of ribonuclease A by site-directed mutagenesis, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 4147-4156.

- Krebs, H., Schmid, F.X., and Jaenicke, R. (1983) Folding of homologous proteins. The refolding of different ribonucleases is independent of sequence variations, proline content and glycosylation, *J. Mol. Biol.*, **169**, 619-635.
- Krishna, M.M., Lin, Y., Rumbley, J.N., and Englander, S.W. (2003) Cooperative omega loops in cytochrome c: role in folding and function, *J. Mol. Biol.*, **331**, 29-36.
- Kuwajima, K., and Arai, M. (2000) The molten globule state: the physical picture and biological significance. In *Mechanisms in protein folding*, 2nd ed. (ed. R.H. Pain), pp. 138-174. Oxford University Press Inc., New York.
- Lang, K., and Schmid, F.X. (1986) Use of a trypsin-pulse method to study the refolding pathway of ribonuclease, *Eur. J. Biochem.*, **159**, 275-281.
- Lang, K., Wrba, A., Krebs, H., Schmid, F.X., and Beintema, J.J. (1986) Folding kinetics of mammalian ribonucleases, *FEBS Lett.*, **204**, 135-139.
- Langer, T. (2000) AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 247-251.
- Laurents, D.V., Bruix, M., Jamin, M., and Baldwin, R.L. (1998) A pulse-chase-competition experiment to determine if a folding intermediate is on or off-pathway: application to ribonuclease A, *J. Mol. Biol.*, **283**, 669-678.
- Leland, P.A., and Raines, R.T. (2001) Cancer chemotherapy--ribonucleases to the rescue, *Chem. Biol.*, **8**, 405-413.
- Leland, P.A., Schultz, L.W., Kim, B.M., and Raines, R.T. (1998) Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 10407-10412.
- Leland, P.A., Staniszewski, K.E., Kim, B.M., and Raines, R.T. (2001) Endowing human pancreatic ribonuclease with toxicity for cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **276**, 43095-43102.
- Leszczynski, J.F., and Rose, G.D. (1986) Loops in globular proteins: a novel category of secondary structure, *Science*, **234**, 849-855.
- Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding?, *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.*, **65**, 44-45.
- Levitt, M. (1981) Effect of proline residues on protein folding, *J. Mol. Biol.*, **145**, 251-263.
- Lin, L.N., and Brandts, J.F. (1983) Isomerization of proline-93 during the unfolding and refolding of ribonuclease A, *Biochemistry*, **22**, 559-563.
- Lin, S.H., Konishi, Y., Nall, B.T., and Scheraga, H.A. (1985) Influence of an extrinsic cross-link on the folding pathway of ribonuclease A. Kinetics of folding-unfolding, *Biochemistry*, **24**, 2680-2686.
- Loh, S.N., Rohl, C.A., Kiefhaber, T., and Baldwin, R.L. (1996) A general two-process model describes the hydrogen exchange behavior of RNase A in unfolding conditions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 1982-1987.
- Lumry, R., and Biltonen, R. (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins, *Biopolymers*, **4**, 917-944.
- MacArthur, M.W., and Thornton, J.M. (1991) Influence of proline residues on protein conformation, *J. Mol. Biol.*, **218**, 397-412.
- Maeda, T., Mahara, K., Kitazoe, M., Futami, J., Takidani, A., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., and Yamada, H. (2002) RNase 3 (ECP) is an extraordinarily stable protein among human pancreatic-type RNases, *J. Biochem.*, **132**, 737-742.
- Makhatadze, G.I., and Privalov, P.L. (1990) Heat capacity of proteins. I. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: hydration effect, *J. Mol. Biol.*, **213**, 375-384.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B.W., Veltman, O.R., Van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R., and Eijssink, V.G. (1997) Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond, *J. Biol. Chem.*, **272**, 11152-11156.
- Markossian, K.A., and Kurganov, B.I. (2004) Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggresomes, *Biochemistry (Mosc.)*, **69**, 971-984.

- Markus, G., Barnard, E.A., Castellani, B.A., and Saunders, D. (1968) Ligand-induced conformational changes in ribonuclease, *J. Biol. Chem.*, **243**, 4070-4076.
- Martenson, R.E. (1978) The use of gel filtration to follow conformational changes in proteins. Conformational flexibility of bovine myelin basic protein, *J. Biol. Chem.*, **253**, 8887-8893.
- Martinez-Vicente, M., Sovak, G., and Cuervo, A.M. (2005) Protein degradation and aging, *Exp. Gerontol.*, **40**, 622-633.
- Massey, A., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2004) Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 2420-2434.
- Massey, A.C., Zhang, C., and Cuervo, A.M. (2006) Chaperone-mediated autophagy in aging and disease, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **73**, 205-235.
- Matouschek, A., Rospert, S., Schmid, K., Glick, B.S., and Schatz, G. (1995) Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 6319-6323.
- Matthysens, G.E., Simons, G., and Kanarek, L. (1972) Study of the thermal-denaturation mechanism of hen egg-white lysozyme through proteolytic degradation, *Eur. J. Biochem.*, **26**, 449-454.
- Mayo, S.L., and Baldwin, R.L. (1993) Guanidinium chloride induction of partial unfolding in amide proton exchange in RNase A, *Science*, **262**, 873-876.
- McElligott, M.A., Miao, P., and Dice, J.F. (1985) Lysosomal degradation of ribonuclease A and ribonuclease S-protein microinjected into the cytosol of human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11986-11993.
- McLendon, G., and Radany, E. (1978) Is protein turnover thermodynamically controlled?, *J. Biol. Chem.*, **253**, 6335-6337.
- Molinari, F., Meskanaite, V., Munnich, A., Sonderegger, P., and Colleaux, L. (2003) Extracellular proteases and their inhibitors in genetic diseases of the central nervous system, *Hum. Mol. Genet.*, **12 Spec No 2**, R195-200.
- Motyckova, G., Weilbaecher, K.N., Horstmann, M., Rieman, D.J., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. (2001) Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 5798-5803.
- Muir, T.W., Sondhi, D., and Cole, P.A. (1998) Expressed protein ligation: a general method for protein engineering, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 6705-6710.
- Müller, A., Hinrichs, W., Wolf, W.M., and Saenger, W. (1994) Crystal structure of calcium-free proteinase K at 1.5-Å resolution, *J. Biol. Chem.*, **269**, 23108-23111.
- Murthy, B.S., and Sirdeshmukh, R. (1992) Sensitivity of monomeric and dimeric forms of bovine seminal ribonuclease to human placental ribonuclease inhibitor, *Biochem. J.*, **281**, 343-348.
- Musi, V., Spolaore, B., Picotti, P., Zamboni, M., De Filippis, V., and Fontana, A. (2004) Nicked apomyoglobin: a noncovalent complex of two polypeptide fragments comprising the entire protein chain, *Biochemistry*, **43**, 6230-6240.
- Mutter, M., Wöhr, T., Gioria, S., and Keller, M. (1999) Pseudo-prolines: induction of cis/trans-conformational interconversion by decreased transition state barriers, *Biopolymers*, **51**, 121-128.
- Myers, J.K., and Oas, T.G. (2002) Mechanism of fast protein folding, *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 783-815.
- Naim, H.Y. (1999) Limited proteolysis in the study of membrane proteins. In *Proteolytic enzymes - Tools and targets*, 1st ed. (eds. E.E. Sterchi, and W. Stöcker), pp. 281-297. Springer-Verlag, Berlin.
- Nall, B.T., Garel, J.R., and Baldwin, R.L. (1978) Test of the extended two-state model for the kinetic intermediates observed in the folding transition of ribonuclease A, *J. Mol. Biol.*, **118**, 317-330.
- Neff, N.T., Bourret, L., Miao, P., and Dice, J.F. (1981) Degradation of proteins microinjected into IMR-90 human diploid fibroblasts, *J. Cell Biol.*, **91**, 184-194.
- Neurath, H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes, *Science*, **224**, 350-357.
- Nölting, B., Golbik, R., Neira, J.L., Soler-Gonzalez, A.S., Schreiber, G., and Fersht, A.R. (1997) The folding pathway of a protein at high resolution from microseconds to seconds, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 826-830.

- Notomista, E., Catanzano, F., Graziano, G., Dal Piaz, F., Barone, G., D'Alessio, G., and Di Donato, A. (2000) Onconase: an unusually stable protein, *Biochemistry*, **39**, 8711-8718.
- Novotný, J., and Brucoleri, R.E. (1987) Correlation among sites of limited proteolysis, enzyme accessibility and segmental mobility, *FEBS Lett.*, **211**, 185-189.
- O'Donohue, M.J., and Beaumont, A. (1996) The roles of the prosequence of thermolysin in enzyme inhibition and folding in vitro, *J. Biol. Chem.*, **271**, 26477-26481.
- Okabe, Y., Katayama, N., Iwama, M., Watanabe, H., Ohgi, K., Irie, M., Nitta, K., Kawauchi, H., Takayanagi, Y., Oyama, F., *et al.* (1991) Comparative base specificity, stability, and lectin activity of two lectins from eggs of *Rana catesbeiana* and *R. japonica* and liver ribonuclease from *R. catesbeiana*, *J. Biochem.*, **109**, 786-790.
- Oliveberg, M., Tan, Y.J., and Fersht, A.R. (1995) Negative activation enthalpies in the kinetics of protein folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 8926-8929.
- Oliveberg, M., Tan, Y.J., Silow, M., and Fersht, A.R. (1998) The changing nature of the protein folding transition state: implications for the shape of the free-energy profile for folding, *J. Mol. Biol.*, **277**, 933-943.
- Ooi, T., Rupley, J.A., and Scheraga, H.A. (1963) Structural Studies of Ribonuclease. VIII. Tryptic Hydrolysis of Ribonuclease a at Elevated Temperatures, *Biochemistry*, **2**, 432-437.
- Otzen, D.E., Kristensen, O., Proctor, M., and Oliveberg, M. (1999) Structural changes in the transition state of protein folding: alternative interpretations of curved chevron plots, *Biochemistry*, **38**, 6499-6511.
- Pace, C.N., Hebert, E.J., Shaw, K.L., Schell, D., Both, V., Krajcikova, D., Sevcik, J., Wilson, K.S., Dauter, Z., Hartley, R.W., *et al.* (1998) Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3, *J. Mol. Biol.*, **279**, 271-286.
- Pace, C.N., and Laurents, D.V. (1989) A new method for determining the heat capacity change for protein folding, *Biochemistry*, **28**, 2520-2525.
- Pal, M., and Dasgupta, S. (2003) The nature of the turn in omega loops of proteins, *Proteins*, **51**, 591-606.
- Pappenberger, G., Saudan, C., Becker, M., Merbach, A.E., and Kiefhaber, T. (2000) Denaturant-induced movement of the transition state of protein folding revealed by high-pressure stopped-flow measurements, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 17-22.
- Park, C., and Marqusee, S. (2004) Probing the high energy states in proteins by proteolysis, *J. Mol. Biol.*, **343**, 1467-1476.
- Park, C., and Marqusee, S. (2005) Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding, *Nat. Methods*, **2**, 207-212.
- Parker, M.J., and Marqusee, S. (1999) The cooperativity of burst phase reactions explored, *J. Mol. Biol.*, **293**, 1195-1210.
- Parsell, D.A., and Sauer, R.T. (1989) The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **264**, 7590-7595.
- Pavlakakis, N., and Vogelzang, N.J. (2006) Ranpirnase--an antitumour ribonuclease: its potential role in malignant mesothelioma, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **6**, 391-399.
- Perrett, S., Clarke, J., Hounslow, A.M., and Fersht, A.R. (1995) Relationship between equilibrium amide proton exchange behavior and the folding pathway of barnase, *Biochemistry*, **34**, 9288-9298.
- Pizzo, E., Buonanno, P., Di Maro, A., Ponticelli, S., De Falco, S., Quarto, N., Cubellis, M.V., and D'Alessio, G. (2006) Ribonucleases and angiogenins from fish, *J Biol Chem*, **281**, 27454-27460.
- Plainkum, P., Fuchs, S.M., Wiyakrutta, S., and Raines, R.T. (2003) Creation of a zymogen, *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 115-119.
- Plaxco, K.W., Simons, K.T., and Baker, D. (1998) Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins, *J. Mol. Biol.*, **277**, 985-994.
- Plaza del Pino, I.M., Ibarra-Molero, B., and Sanchez-Ruiz, J.M. (2000) Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases, *Proteins*, **40**, 58-70.
- Plummer, T.H., Jr., and Hirs, C.H. (1963) The isolation of ribonuclease B, a glycoprotein, from bovine pancreatic juice, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1396-1401.

- Poldermans, B. (1990) Industrial uses of enzymes - Proteolytic. In *Enzymes in industry - Production and applications*, 1st ed. (ed. W. Gerhartz), pp. 108-118. VCH, Weinheim.
- Polverino de Laureto, P., Scaramella, E., De Filippis, V., Bruix, M., Rico, M., and Fontana, A. (1997) Limited proteolysis of ribonuclease A with thermolysin in trifluoroethanol, *Protein Sci.*, **6**, 860-872.
- Pradeep, L., Shin, H.C., and Scheraga, H.A. (2006) Correlation of folding kinetics with the number and isomerization states of prolines in three homologous proteins of the RNase family, *FEBS Lett.*, **580**, 5029-5032.
- Pratt, J.M. (1990) Proteases as topological probes for membrane proteins. In *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. (ed. R.J. Beynon, Bond, J. S.), pp. 181-191. IRL Press, Oxford.
- Price, N.C., and Johnson, C.M. (1990) Proteinases as probes of conformation of soluble proteins. In *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. (ed. R.J. Beynon, Bond, J. S.), pp. 163-180. IRL Press, Oxford.
- Puett, D. (1973) Conformational studies on a glycosylated bovine pancreatic ribonuclease, *J. Biol. Chem.*, **248**, 3566-3572.
- Qin, Z.H., Wang, Y., Kegel, K.B., Kazantsev, A., Apostol, B.L., Thompson, L.M., Yoder, J., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2003) Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments, *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 3231-3244.
- Qu, Y., and Bolen, D.W. (2003) Hydrogen exchange kinetics of RNase A and the urea:TMAO paradigm, *Biochemistry*, **42**, 5837-5849.
- Rabow, A.A., and Scheraga, H.A. (1993) Lattice neural network minimization. Application of neural network optimization for locating the global-minimum conformations of proteins, *J. Mol. Biol.*, **232**, 1157-1168.
- Raines, R.T. (1999) Ribonuclease A: from model system to cancer chemotherapeutic. In *Enzymatic Mechanisms*. (eds. P.A. Frey, and D.B. Northrop), pp. 235-249. IOS Press, Washington, DC.
- Ramos, C.H., and Baldwin, R.L. (2002) Sulfate anion stabilization of native ribonuclease A both by anion binding and by the Hofmeister effect, *Protein Sci.*, **11**, 1771-1778.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 597-635.
- Rassow, J., Mohrs, K., Koidl, S., Barthelmess, I.B., Pfanner, N., and Tropschug, M. (1995) Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones Hsp70 and Hsp60, *Mol. Cell Biol.*, **15**, 2654-2662.
- Rauber, N.R., Jany, K.D., and Pfeleiderer, G. (1978) Ribonuclease A digestion by proteinase K, *Z. Naturforsch. [C]*, **33**, 660-663.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., and Barrett, A.J. (2006) MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res.*, **34**, D270-272.
- Rehage, A., and Schmid, F.X. (1982) Fast- and slow-refolding forms of unfolded ribonuclease A differ in tyrosine fluorescence, *Biochemistry*, **21**, 1499-1505.
- Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M., and Fischer, G. (1998) Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation, *J. Mol. Biol.*, **279**, 449-460.
- Renner, C., Alefelder, S., Bae, J.H., Budisa, N., Huber, R., and Moroder, L. (2001) Fluoroproline as Tools for Protein Design and Engineering, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **40**, 923-925.
- Richards, F.M. (1997) Protein stability: still an unsolved problem, *Cell. Mol. Life Sci.*, **53**, 790-802.
- Richards, F.M., and Vithayathil, P.J. (1959) The preparation of subtilisin-modified ribonuclease and the separation of the peptide and protein components, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1459-1465.
- Richardson, R.M., Pares, X., and Cuchillo, C.M. (1990) Chemical modification by pyridoxal 5'-phosphate and cyclohexane-1,2-dione indicates that Lys-7 and Arg-10 are involved in the p2 phosphate-binding subsite of bovine pancreatic ribonuclease A, *Biochem. J.*, **267**, 593-599.
- Riedl, S.J., and Shi, Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 897-907.
- Rietz, A. (2006) Untersuchung der Proteolysestabilität der Ribonuclease A-Tandemenzyme, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science*, **234**, 364-368.
- Rubinsztein, D.C. (2006) The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration, *Nature*, **443**, 780-786.
- Rudolph, R. (1985) The use of limited proteolysis in studies on protein folding and association, *Biochem. Soc. Trans.*, **13**, 308-311.
- Rupley, J.A., and Scheraga, H.A. (1963) Structural Studies of Ribonuclease. VII. Chymotryptic Hydrolysis of Ribonuclease a at Elevated Temperatures, *Biochemistry*, **2**, 421-431.
- Rutkoski, T.J., Kurten, E.L., Mitchell, J.C., and Raines, R.T. (2005) Disruption of shape-complementarity markers to create cytotoxic variants of ribonuclease A, *J. Mol. Biol.*, **354**, 41-54.
- Rybak, S.M., and Newton, D.L. (1999) Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential, *Exp. Cell. Res.*, **253**, 325-335.
- Sackett, D.L., Bhattacharyya, B., and Wolff, J. (1994) Local unfolding and the stepwise loss of the functional properties of tubulin, *Biochemistry*, **33**, 12868-12878.
- Safarian, S., Moosavi-Movahedi, A.A., Hosseinkhani, S., Xia, Z., Habibi-Rezaei, M., Hosseini, G., Sorenson, C., and Sheibani, N. (2003) The structural and functional studies of His119 and His12 in RNase A via chemical modification, *J. Protein Chem.*, **22**, 643-654.
- Sahni, G., Cho, Y.J., Iyer, K.S., Khan, S.A., Seetharam, R., and Acharya, A.S. (1989) Semisynthetic hemoglobin A: reconstitution of functional tetramer from semisynthetic alpha-globin, *Biochemistry*, **28**, 5456-5461.
- Santoro, M.M., and Bolen, D.W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants, *Biochemistry*, **27**, 8063-8068.
- Saunders, M., Wishnia, A., and Kirkwood, J.G. (1957) The nuclear magnetic resonance spectrum of ribonuclease, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3289-3290.
- Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157-162.
- Schellenberger, A., and Ulbrich, R. (1989) Protein stabilization by blocking the native unfolding nucleus, *Biomed. Biochim. Acta*, **48**, 63-67.
- Schellman, J.A. (1994) The thermodynamics of solvent exchange, *Biopolymers*, **34**, 1015-1026.
- Schellman, J.A. (2002) Fifty years of solvent denaturation, *Biophys. Chem.*, **96**, 91-101.
- Schiene, C., and Fischer, G. (2000) Enzymes that catalyse the restructuring of proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 40-45.
- Schmid, F., and Blaschek, H. (1984) An early intermediate in the folding of ribonuclease A is protected against cleavage by pepsin, *Biochemistry*, **23**, 2128-2133.
- Schmid, F.X. (1981) A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 1. Detection by tyrosine fluorescence changes, *Eur. J. Biochem.*, **114**, 105-109.
- Schmid, F.X. (1983) Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates, *Biochemistry*, **22**, 4690-4696.
- Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. (1978) Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 4764-4768.
- Schmid, F.X., and Blaschek, H. (1981) A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 2. Comparison of its properties to native ribonuclease A, *Eur. J. Biochem.*, **114**, 111-117.
- Schmid, F.X., Grafl, R., Wrba, A., and Beintema, J.J. (1986) Role of proline peptide bond isomerization in unfolding and refolding of ribonuclease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 872-876.
- Schröter, C.J., Braun, M., Englert, J., Beck, H., Schmid, H., and Kalbacher, H. (1999) A rapid method to separate endosomes from lysosomal contents using differential centrifugation and hypotonic lysis of lysosomes, *J. Immunol. Methods*, **227**, 161-168.
- Schulenburg, C., Martinez-Senac, M.d.M., Löw, C., Golbik, R., Ulbrich-Hofman, R., and Arnold, U. (2007) Identification of three phases in onconase refolding, *FEBS J., im Druck*.

- Schultz, D.A., and Baldwin, R.L. (1992) Cis proline mutants of ribonuclease A. I. Thermal stability, *Protein Sci.*, **1**, 910-916.
- Schultz, D.A., Friedman, A.M., White, M.A., and Fox, R.O. (2005) The crystal structure of the cis-proline to glycine variant (P114G) of ribonuclease A, *Protein Sci.*, **14**, 2862-2870.
- Schultz, D.A., Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. (1992) Cis proline mutants of ribonuclease A. II. Elimination of the slow-folding forms by mutation, *Protein Sci.*, **1**, 917-924.
- Schultz, L.W., Hargraves, S.R., Klink, T.A., and Raines, R.T. (1998) Structure and stability of the P93G variant of ribonuclease A, *Protein Sci.*, **7**, 1620-1625.
- Shakhnovich, E., Abkevich, V., and Ptitsyn, O. (1996) Conserved residues and the mechanism of protein folding, *Nature*, **379**, 96-98.
- Siddiqui, K.S., Rangarajan, M., Hartley, B.S., Kitmitto, A., Panico, M., Blench, I.P., and Morris, H.R. (1993) Arthrobacter D-xylose isomerase: partial proteolysis with thermolysin, *Biochem. J.*, **289**, 201-208.
- Spolaore, B., Bermejo, R., Zambonin, M., and Fontana, A. (2001) Protein interactions leading to conformational changes monitored by limited proteolysis: apo form and fragments of horse cytochrome c, *Biochemistry*, **40**, 9460-9468.
- Sridevi, K., and Udgaonkar, J.B. (2002) Unfolding rates of barstar determined in native and low denaturant conditions indicate the presence of intermediates, *Biochemistry*, **41**, 1568-1578.
- Stein, E.A., and Fischer, E.H. (1958) The resistance of alpha-amylases towards proteolytic attack, *J. Biol. Chem.*, **232**, 867-879.
- Steiner, H., and Haass, C. (2000) Intramembrane proteolysis by presenilins, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **1**, 217-224.
- Steinmann, B., Bruckner, P., and Superti-Furga, A. (1991) Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation *in vivo*: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase, *J. Biol. Chem.*, **266**, 1299-1303.
- Stewart, D.E., Sarkar, A., and Wampler, J.E. (1990) Occurrence and role of *cis* peptide bonds in protein structures, *J. Mol. Biol.*, **214**, 253-260.
- Stinson, R.A. (1977) Use of isoelectric focusing and a chromophoric organomercurial to monitor urea-induced conformational changes of yeast phosphoglycerate kinase, *Biochem J.*, **167**, 65-70.
- Stoller, G., Rucknagel, K.P., Nierhaus, K.H., Schmid, F.X., Fischer, G., and Rahfeld, J.U. (1995) A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor, *EMBO J.*, **14**, 4939-4948.
- Takagi, H., and Takahashi, M. (2003) A new approach for alteration of protease functions: pro-sequence engineering, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 1-9.
- Tams, J.W., and Welinder, K.G. (1996) Unfolding and refolding of *Coprinus cinereus* peroxidase at high pH, in urea, and at high temperature. Effect of organic and ionic additives on these processes, *Biochemistry*, **35**, 7573-7579.
- Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R., and Baumeister, W. (1995) The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*, *Curr. Biol.*, **5**, 766-774.
- Tanaka, K. (1998) Proteasomes: structure and biology, *J. Biochem.*, **123**, 195-204.
- Tanaka, K., Ii, K., Ichihara, A., Waxman, L., and Goldberg, A.L. (1986) A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution, *J. Biol. Chem.*, **261**, 15197-15203.
- Tanford, C. (1968) Protein denaturation, *Adv. Protein Chem.*, **23**, 121-282.
- Tanford, C. (1970) Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation, *Adv. Protein Chem.*, **24**, 1-95.
- Teschner, W., and Rudolph, R. (1989) A carboxypeptidase Y pulse method to study the accessibility of the C-terminal end during the refolding of ribonuclease A, *Biochem. J.*, **260**, 583-587.
- Thompson, R.C., and Blout, E.R. (1973) Restrictions on the binding of proline-containing peptides to elastase, *Biochemistry*, **12**, 51-57.

- Truhlar, S.M., and Agard, D.A. (2005) The folding landscape of an alpha-lytic protease variant reveals the role of a conserved beta-hairpin in the development of kinetic stability, *Proteins*, **61**, 105-114.
- Tsong, T.Y., Baldwin, R.L., and Elson, E.L. (1972) Properties of the refolding and unfolding reactions of ribonuclease A, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 1809-1812.
- Udgaonkar, J.B., and Baldwin, R.L. (1988) NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A, *Nature*, **335**, 694-699.
- Udgaonkar, J.B., and Baldwin, R.L. (1990) Early folding intermediate of ribonuclease A, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 8197-8201.
- Udgaonkar, J.B., and Baldwin, R.L. (1995) Nature of the early folding intermediate of ribonuclease A, *Biochemistry*, **34**, 4088-4096.
- Ulbrich-Hofmann, R., Arnold, U., and Mansfeld, J. (1999) The concept of the unfolding region for approaching the mechanisms of enzyme stabilization, *J. Mol. Catal. B*, **7**, 125-131.
- Ulbrich-Hofmann, R., Golbik, R., and Damerau, W. (1993) Fixation of the unfolding region - a hypothesis of enzyme stabilization. In *Stability and stabilization of enzymes*, 1st ed. (eds. W.J.J. van den Tweel, A. Harder, and R.M. Buitelaar), pp. 497-504. Elsevier, Amsterdam.
- Ullmann, D., and Jakubke, H.-D. (1999) Protease-catalyzed peptide synthesis. In *Proteolytic enzymes - Tools and targets*, 1st ed. (eds. E.E. Sterchi, and W. Stöcker), pp. 312-328. Springer-Verlag, Berlin.
- Urfer, R., and Kirschner, K. (1992) The importance of surface loops for stabilizing an eightfold beta alpha barrel protein, *Protein Sci.*, **1**, 31-45.
- Uversky, V.N. (2002) What does it mean to be natively unfolded?, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2-12.
- van den Burg, B., Vriend, G., Veltman, O.R., Venema, G., and Eijssink, V.G. (1998) Engineering an enzyme to resist boiling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 2056-2060.
- Varshavsky, A. (1997) The N-end rule pathway of protein degradation, *Genes Cells*, **2**, 13-28.
- Vasandani, V.M., Burris, J.A., and Sung, C. (1999) Reversible nephrotoxicity of onconase and effect of lysine pH on renal onconase uptake, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **44**, 164-169.
- Vieille, C., and Zeikus, G.J. (1996) Thermozyms: Identifying molecular determinants of protein structural and functional stability, *Trends Biotechnol.*, **14**, 183-190.
- Vieille, C., and Zeikus, G.J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 1-43.
- Wang, L., Chen, R.X., and Kallenbach, N.R. (1998) Proteolysis as a probe of thermal unfolding of cytochrome c, *Proteins*, **30**, 435-441.
- Wang, L., and Kallenbach, N.R. (1998) Proteolysis as a measure of the free energy difference between cytochrome c and its derivatives, *Protein Sci.*, **7**, 2460-2464.
- Wang, N., Gottesman, S., Willingham, M.C., Gottesman, M.M., and Maurizi, M.R. (1993) A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 11247-11251.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E., and Scheraga, H.A. (2002) Proline cis-trans isomerization and protein folding, *Biochemistry*, **41**, 14637-14644.
- Wehbi, Z., Perez, M.D., Dalgalarondo, M., Sanchez, L., Calvo, M., Chobert, J.M., and Haertle, T. (2006) Study of ethanol-induced conformational changes of holo and apo alpha-lactalbumin by spectroscopy and limited proteolysis, *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 34-43.
- Wehofsky, N., Koglin, N., Thust, S., and Bordusa, F. (2003) Reverse proteolysis promoted by in situ generated peptide ester fragments, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6126-6133.
- Weiss, M.S., Jabs, A., and Hilgenfeld, R. (1998) Peptide bonds revisited, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 676.
- Welinder, K.G. (1988) Generation of peptides suitable for sequence analysis by proteolytic cleavage in reversed-phase high-performance liquid chromatography solvents, *Anal. Biochem.*, **174**, 54-64.
- Wenger, D.A., Coppola, S., and Liu, S.L. (2002) Lysosomal storage disorders: diagnostic dilemmas and prospects for therapy, *Genet. Med.*, **4**, 412-419.

- Wiederanders, B., Kaulmann, G., and Schilling, K. (2003) Functions of propeptide parts in cysteine proteases, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **4**, 309-326.
- Wieker, H.J., and Witzel, H. (1967) On the mechanism of the ribonuclease reaction. 3. Relationship between the kinetic parameters  $k+1$ ,  $k-1$ ,  $k+2$  and interpretation of  $K_m$ , *Eur. J. Biochem.*, **1**, 251-258.
- Winchester, B.G., Mathias, A.P., and Rabin, B.R. (1970) Study of the thermal denaturation of ribonuclease A by differential thermal analysis and susceptibility to proteolysis, *Biochem. J.*, **117**, 299-307.
- Wlodawer, A., Bott, R., and Sjolín, L. (1982) The refined crystal structure of ribonuclease A at 2.0 Å resolution, *J. Biol. Chem.*, **257**, 1325-1332.
- Wolf, W.M., Bajorath, J., Müller, A., Raghunathan, S., Singh, T.P., Hinrichs, W., and Saenger, W. (1991) Inhibition of proteinase K by methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Ala-chloromethyl ketone. An x-ray study at 2.2-Å resolution, *J. Biol. Chem.*, **266**, 17695-17699.
- Woods, R.J., Edge, C.J., and Dwek, R.A. (1994) Protein surface oligosaccharides and protein function, *Nat. Struct. Biol.*, **1**, 499-501.
- Xiong, Y., Juminaga, D., Swapna, G.V., Wedemeyer, W.J., Scheraga, H.A., and Montelione, G.T. (2000) Solution NMR evidence for a cis Tyr-Ala peptide group in the structure of [Pro93Ala] bovine pancreatic ribonuclease A, *Protein Sci.*, **9**, 421-426.
- Yang, H.J., and Tsou, C.L. (1995) Inactivation during denaturation of ribonuclease A by guanidinium chloride is accompanied by unfolding at the active site, *Biochem. J.*, **305**, 379-384.
- Yon, J.M. (2002) Protein folding in the post-genomic era, *J. Cell. Mol. Med.*, **6**, 307-327.
- Young, T.A., Skordalakes, E., and Marqusee, S. (2007) Comparison of proteolytic susceptibility in phosphoglycerate kinases from yeast and E. coli: modulation of conformational ensembles without altering structure or stability, *J. Mol. Biol.*, **368**, 1438-1447.
- Yuan, Z., Zhao, J., and Wang, Z.X. (2003) Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors, *Protein Eng.*, **16**, 109-114.
- Zettlmeissl, G., Rudolph, R., and Jaenicke, R. (1983) Limited proteolysis as a tool to study the kinetics of protein folding: conformational rearrangements in acid-dissociated lactic dehydrogenase as determined by pepsin digestion, *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**, 161-168.
- Zhang, J., Dyer, K.D., and Rosenberg, H.F. (2002) RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1169-1175.
- Zimmerman, S.B., and Minton, A.P. (1993) Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 27-65.
- Zündorf, I., and Dingermann, T. (2001) Vom Rinder-, Schweine-, Pferde-Insulin zum Humaninsulin: Die biotechnische und gentechnische Insulin-Herstellung, *Pharm. i.u.Z.*, **30**, 27-32.

## 8 Anhang

### 8.1 Anmerkungen

**Anm. 1:** Der älteste Zweig der Biotechnologie ist die weiße Biotechnologie; bereits um 6000 v.u.Z wurden Trauben zu Wein vergoren („fermentiert“), 2000 Jahre später begann in Ägypten die Brotherstellung mittels Hefekulturen, gefolgt von der Bier-, Essig- und Joghurtherstellung. Erst Mitte des 19. Jh. jedoch konnte Louis Pasteur nachweisen, dass der Fermentationsprozess von lebenden Organismen angetrieben wird. Eduard Büchner gelang es 1897, Enzyme (griechisch *en zyme* = in Hefe) aus Hefe zu extrahieren und zu zeigen, dass diese Zucker zu Alkohol umsetzen. Allerdings erbrachte erst 1926 James B. Sumner den Nachweis, dass es sich bei Enzymen um Proteine handelt; er kristallisierte Urease und erhielt dafür 1955 den Nobelpreis.

**Anm. 2:** Zur Unterscheidung der „biochemischen Standardbedingungen“ (101,325 kPa, 298,15 K, pH 7,0, Aktivität der Reaktanden 1,0) von den „physikochemischen Standardbedingungen“ (100 kPa, 298,15 K, Konzentration gelöster Substanzen = 1 mol l<sup>-1</sup>, d.h. pH 0) wird die „biochemische“ Freie Enthalpie auch mit  $\Delta G^{\circ}$  angegeben; nur in dem (unwahrscheinlichen) Fall, dass weder H<sub>2</sub>O, H<sup>+</sup> oder andere Ionen in die Reaktion involviert sind, gilt  $\Delta G^{\circ} = \Delta G^0$ .

**Anm. 3:** Der *molten globule*-Zustand wird als Zustand mit nativ-ähnlichen Sekundärstrukturen, aber fluktuierender Tertiärstruktur (ohne die recht feste Packung der Seitenketten der Aminosäurereste, dafür mit erhöhter Bindungsfähigkeit für Farbstoffe wie 1-Anilino-naphthalen-8-sulfonsäure durch die Ausbildung hydrophober Cluster) beschrieben. Daher wurde er als generell auftretendes, frühes Intermediat bei der Faltung von Proteinen postuliert (Kuwajima and Arai 2000). Für einige Proteine konnte jedoch gezeigt werden, dass die sich früh ausbildenden Sekundärstrukturen später einer Reorganisation unterliegen. Auch die Kollabierung (Kompaktierung) der entfalteten Polypeptidkette innerhalb der Totzeit der spektroskopischen *stopped-flow* Messverfahren (*burst phase*) wird als diskreter Schritt der Proteinfaltung, jedoch auch als Respons der entfalteten Polypeptidkette auf die veränderten Bedingungen, d.h. als entfalteter Zustand unter nativen Bedingungen, betrachtet (Bieri and Kiefhaber 2000).

**Anm. 4:** Gl. 11 wurde jedoch ursprünglich für Reaktionen in der Gasphase aufgestellt, so dass für die Übertragung auf Reaktionen in Lösungen die Viskosität des Mediums, d.h. die Diffusion der Teilchen, berücksichtigt werden muss. Experimente zur Bedeutung der Diffusion „innerhalb“ der entfalteten Polypeptidkette für die Kontaktbildung ergaben, dass für die Proteinfaltung in Gl. 11 statt des prä-exponentiellen Faktors  $\kappa \cdot k_B \cdot T / h$  von  $6 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$  (bei 25°C) ein Wert von  $10^8 \text{ s}^{-1}$  eingesetzt werden müsste. Für die Entfaltung von Myoglobin wurde tatsächlich ein Wert von  $2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$  bestimmt, wobei noch eine große Unsicherheit über den Einfluss anderer Prozesse (wie z.B. dem Eindringen von Wasser in das hydrophobe Innere des Proteins und der damit verbundenen entropischen Beiträge) auf die Energiebarriere besteht. Eine ausführliche Abhandlung dieses Themas findet sich bei Bieri & Kiefhaber (Bieri and Kiefhaber 2000).

**Anm. 5:** Ein Maß für den energetischen Beitrag, den diese individuelle Seitenkette zur Proteinfaltung liefert, ist der  $\Phi$ -Wert (Jackson *et al.* 1993; Fersht 2000), der das Verhältnis des Effekts auf den Übergangszustand im Verhältnis zum Grundzustand beschreibt. Der Effekt auf U wird als energetisch

neutral angesehen (Ausnahmen s.u.), so dass man bei der  $\Phi$ -Wert-Analyse üblicherweise die Faltungsreaktion betrachtet (analog gilt dieses Verfahren aber auch für die Entfaltungsreaktion; die Indices „WT“ und „Mut“ zeigen die Wildtyp-Form eines Proteins und die durch die o.g. Methoden veränderte Variante an).

$$\Phi_f = \frac{\Delta G_{f(WT)}^\ddagger - \Delta G_{f(Mut)}^\ddagger}{\Delta G_{f(WT)}^{(H_2O)} - \Delta G_{f(Mut)}^{(H_2O)}} = \frac{\Delta\Delta G_f^\ddagger}{\Delta\Delta G_f^{(H_2O)}} \quad (24)$$

Ein  $\Phi_f$ -Wert von 1 bedeutet, dass der Einfluss der Mutation auf den Übergangszustand der gleiche wie auf den nativen Zustand ist und daher die Struktur um den entsprechenden Rest im Übergangszustand der der nativen Konformation entspricht. Umgekehrt bedeutet ein  $\Phi_f$ -Wert von 0, dass die Struktur um den entsprechenden Rest im Übergangszustand noch entfaltet vorliegt. Limitierend für diese Methode ist, dass der Austausch der Aminosäurereste nicht zu dramatischen Änderungen führen darf (zu starke Destabilisierung von N, Änderung von Faltungswegen), weswegen meistens Aminosäurereste mit großen Seitenketten (Trp, Phe, Tyr) gegen welche mit kleineren Seitenketten (Val, Ala) ausgetauscht werden. Eine weitere grundsätzliche Limitierung ist, dass zwar strukturelle Effekte von Mutationen auf den nativen Zustand recht gut untersucht werden können, dies jedoch für den entfalteten Zustand praktisch unmöglich ist (Myers and Oas 2002). Insbesondere die Einführung bzw. das Entfernen von Disulfidbrücken oder der in ihrer Drehbarkeit um die Peptidbindung stark eingeschränkten Prolinreste können starke Veränderungen des entfalteten Zustands nach sich ziehen.

**Anm. 6:** Aus einer Nicht-Beschleunigung kann jedoch nicht automatisch auf eine Nicht-Involvierung von Prolinisomerisierungsschritten geschlossen werden, da nicht jede Xaa-Pro-Peptidbindung ein Substrat für alle PPIasen darstellt. Die Involvierung von PPIasen in das Faltungsgeschehen *in vivo* wurde durch Inhibierung der PPIase Cyclophilin durch Cyclosporin A nachgewiesen. Durch die Inhibierung wurde die Kollagen-Reifung, in der Prolinisomerisierungen eine wichtige Rolle spielen, in Hühnerembryos verzögert (Steinmann *et al.* 1991) und in Mitochondrien importierte Proteine zeigten nach Cyclosporinapplikation eine verzögerte Resistenzausbildung gegen proteolytischen Angriff (Matouschek *et al.* 1995; Rassow *et al.* 1995). In Bakterien konnte eine Ribosomen-assoziierte PPIase, die die *cis-trans*-Isomerisierung in naszierenden Polypeptidketten katalysiert und als *trigger factor* bezeichnet wird, nachgewiesen werden (Stoller *et al.* 1995; Hartl and Hayer-Hartl 2002). *In vivo* spielen aufgrund der hohen Konzentration an Makromolekülen (*molecular crowding*, Ellis 2001) auch zahlreiche andere Proteine eine entscheidende Rolle bei der Proteinfaltung. Diese umfassen v.a. Faltungshelferproteine oder „Chaperone“ (*chaperone*, engl. „Anstandsdame“; sie sollen „unreife [naszierende] Proteine vor schädlichen Kontakten bewahren“), ohne dass an dieser Stelle näher darauf eingegangen werden soll (Reviews s. Buchner 2002; Hartl and Hayer-Hartl 2002). Zu bedenken gilt jedoch immer, dass – insbesondere bei größeren Proteinen – langsame Schritte der Faltungsreaktion auch durch eine Reorganisation bereits gefalteter Bereiche hervorgerufen werden können.

**Anm. 7:** Die Amplituden sind dabei zu der aktuellen Konzentration der entsprechenden Spezies proportional; bei mehrphasigen Reaktionen addieren sich somit die Einzelamplituden.

**Anm. 8:** Im Gegensatz zu diesem insgesamt 26S-Partikel der Eukaryonten, das in den verschiedenen Geweben 0,1–1% des löslichen Proteins ausmacht (Tanaka *et al.* 1986), wurde bei Bakterien nur der

20S-Komplex nachgewiesen (Tamura *et al.* 1995). Jedoch erfolgt auch hier die Substraterkennung und -translokierung in den Kernkomplex in einem ATP-abhängigen Prozess. Im Unterschied zu dem prokaryontischen Kernkomplex, bei dem auf jeder der 14 identischen Untereinheiten ein aktives Zentrum zu finden ist, weisen eukaryontische Proteasomen nur 6 aktive Zentren auf (je 3 pro  $\beta$ -Untereinheitenheptamer, Heinemeyer *et al.* 1997).

**Anm. 9:** Über das Lys48 des Ubiquitins können Polyubiquitinketten entstehen, die von den Proteasomen erkannt werden. Nach der so genannten N-End-Regel (*N-end rule*) beeinflusst der N-terminale Aminosäurerest grundlegend die Halbwertszeit des Proteins, indem die Ubiquitynylierung begünstigt (z.B. Arg, Lys, His) oder erschwert (z.B. Ala, Met, Pro) wird (Varshavsky 1997). Ein weiteres Ubiquitynylierungssignal stellt die PEST-Sequenz dar (Rogers *et al.* 1986). Proteine, die eine etwa 8 Aminosäurereste lange, Prolin-(P)-Glutamat-(E)-Serin-(S)-Threonin-(T)-reiche Sequenz aufweisen, besitzen Halbwertszeiten von nur wenigen Minuten.

**Anm. 10:** Zu diesem Zweck fusionieren die Lysosomen mit den entsprechenden Vesikeln und bauen die Makromoleküle durch eine Vielzahl von Hydrolasen – derzeit sind bereits über 40 verschiedene lysosomale Hydrolasen bekannt – ab. Die lysosomalen Enzyme besitzen für ihre katalytische Aktivität ein pH-Optimum um pH 5; das saure Milieu in den Lysosomen wird durch ATP-abhängige Protonenpumpen aufrechterhalten. Diese pH-Abhängigkeit ist auch als Schutzfunktion zu verstehen, damit lysosomale Enzyme, sollten sie „versehentlich“ ins Zytosol gelangen, dort nicht aktiv sind. Insbesondere die Wirkung der lysosomalen Proteasen, die hauptsächlich durch die Familie der Cathepsine gestellt werden, im Zytosol wäre für die Zelle fatal. Daher gibt es im Zytosol zudem eine große Anzahl von Cathepsininhibitoren.

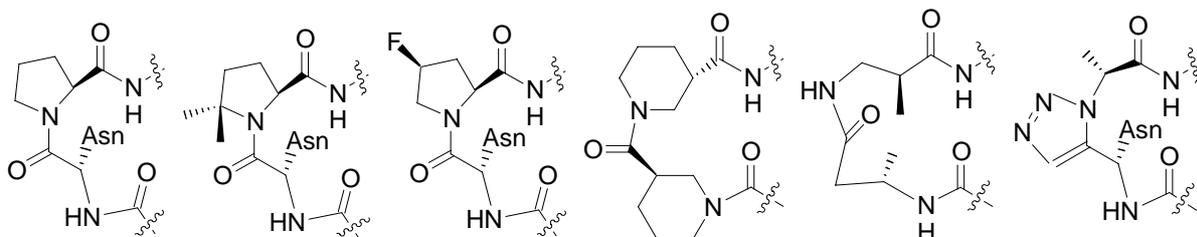
**Anm. 11:** Eine Vielzahl weiterer pathogener Erscheinungen ist mit der Wirkung von Cathepsinen verbunden. So ist Cathepsin K in den Knochenumbauprozess involviert (starke Expression in Osteoklasten); eine Fehlfunktion führt zur Pyknodysostose (Osteosklerose, Knochenbrüchigkeit, Minderwuchs, Gelb *et al.* 1996), eine Überfunktion zu vermehrtem Knochenabbau (Osteoporose, Motyckova *et al.* 2001). Zudem führt eine Fehlfunktion von Cathepsinen zu einer Akkumulation von abzubauenen Verbindungen in den Lysosomen und damit letztendlich zu einer „Vergiftung“ der Zelle (*lysosomal storage disorder*, LSD, Wenger *et al.* 2002).

**Anm. 12:** Interessanterweise weisen auch diverse Protein bzw. Peptide, die mit pathologischen Störungen verbunden sind, das KFERQ-Motiv auf (Massey *et al.* 2004; Massey *et al.* 2006). Bei Huntington Chorea, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer kommt es aufgrund von Veränderungen der „normalen“ Proteine zu Störungen der Proteinabbauprozesse in den betroffenen Zellen. Huntingtin (htt), ein Protein aus 3144 Aminosäureresten, das am *trafficking* von Vesikeln in Zellen und an der Endozytose beteiligt ist, besitzt im „normalen“ Zustand im N-terminalen Bereich bis zu 34 Gln-Reste; der Abbau erfolgt in den Lysosomen. Mutanten (mhht), die bis 155 Gln-Reste aufweisen können, werden nicht mehr in die Lysosomen transportiert und bilden im Zytosol Aggregate (Qin *et al.* 2003). Das *amyloid precursor protein* (APP, je nach Prozessierung bis 753 Aminosäurereste lang), ein Transmembranprotein, wird normalerweise durch Spaltung in der Amyloid- $\beta$ -Peptid-Sequenz durch  $\alpha$ -Secretase abgebaut. Erfolgt jedoch die Spaltung durch  $\beta$ -Secretase und  $\gamma$ -Secretase, so entsteht das 40 oder 42 Aminosäurereste lange A $\beta$ , welches (v.a. in Interaktion mit dem *microtubule-associated protein* Tau) Aggregate, so genannte Plaques, bildet (Steiner and Haass

2000).  $\alpha$ -Synuclein, ein präsynaptisches, neuronales Protein aus 140 Aminosäureresten, liegt nativ im entfalteten Zustand vor (*natively unfolded*, Uversky 2002). Dadurch neigt es zur Aggregation und Fibrillenbildung und wird so in den so genannten *Lewis bodies*, einem Symptom der Parkinson-Krankheit, gefunden (Junn *et al.* 2003). Die Umstände, die zum Auslösen der Aggregation führen, sind noch weitgehend unverstanden, jedoch sind auch Mutationen als Auslöser identifiziert worden. Während  $\alpha$ -Synuclein in seiner Wildtyp-Form über den CMA-Weg in den Lysosomen abgebaut werden kann, konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Synucleinmutanten zwar von hsc70/lamp2a gebunden, aber nicht in die Lysosomen transferiert werden, was zum „Verstopfen“ dieses Proteinabbauweges führt (Cuervo *et al.* 2004). In der Folge der Aggregatbildungen bzw. der Beeinträchtigung der „normalen“ Abbauweg kommt es zu einer verstärkten Autophagie (Rubinsztein 2006).

**Anm. 13:** Auch ein Schutz beider Inhibitoren gegen Trypsin und Chymotrypsin unter thermischer Entfaltung von RNase A wurde beschrieben, wobei der Effekt durch 2'-CMP deutlich ausgeprägter war als der durch 3'-CMP. Es konnte jedoch nicht unterschieden werden, ob die Spaltstellen durch die Inhibitorbindung abgeschirmt wurden oder die Entfaltungsreaktion der RNase A durch die Liganden herabgesetzt wurde, da die (in der ligandfreien RNase A) identifizierten primären Spaltstellen (Ooi *et al.* 1963; Rupley and Scheraga 1963), die nicht in der Nähe der Substratbindungsstellen lokalisiert sind.

**Anm. 14:** Strukturen der  $\beta$ -turn-Mimetika, die verwendet wurden, um *cis*-Pro114 (und ggf. Asn113) in RNase A zu substituieren (gezeigt sind auch die Carbonylgruppe des voranstehenden Gly112 und die Amidgruppe des nachfolgenden Tyr115). V.l.n.r. Asn-Pro, Asn-5',5'-dimethylprolin, Asn-(4S)-Fluorprolin, *R,S*-Nip,  $\beta^3$ -hAla- $\beta^2$ -hAla und Asn-1,5-triazol-Ala. Die Verbindungen wurden von den Arbeitsgruppen von Prof. R.T. Raines bzw. S.H. Gellman, UW-Madison, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Synthese der entsprechenden Peptide erfolgte am UW-Biotechnology Center unter freundlicher Anleitung von Dr. Gary Case.



**Anm. 15:** Auch für Onconase wurde über einen Abbau durch Proteinase K bei 37°C berichtet (Kim *et al.* 2004). Dieser Befund konnte jedoch durch die eigenen Arbeiten nicht bestätigt werden. Ein Nicht-Abbau von Onconase unter nativen Bedingungen wahrscheinlich, da die den Abbau der nativen RNase A ermöglichende Aminosäuresequenz TSAASS in Onconase durch TNTRDVD ersetzt ist. Somit enthält Onconase in dieser Region keine der Substratspezifität der Proteinase K entsprechende Sequenz.

**Anm. 16:** Die Aminosäuresequenz des *loops* der RNase A, in der sich die primäre Spaltstelle für Trypsin befindet (MKSRNLTKDRC), ist in Onconase verkürzt und enthält mit MSTNLFHC keine Spaltstelle für Trypsin.

## 8.2 Anlagen

- A1: Arnold, U., Köditz, J., Markert, Y. & Ulbrich-Hofmann, R.**  
Local fluctuations vs. global unfolding of proteins investigated by limited proteolysis  
*Biocatalysis Biotransformation*, **23**, 2005, 159-167  
[http://www.informaworld.com/smpp/content~db=all~content=a727198291?words=ulrich\\*|arnold\\*](http://www.informaworld.com/smpp/content~db=all~content=a727198291?words=ulrich*|arnold*)
- A2: Markert, Y., Köditz, J., Vriend, G., Mansfeld, J., Arnold, U. & Ulbrich-Hofmann, R.**  
Increased proteolytic resistance of ribonuclease A by protein engineering  
*Protein Engineering*, **14**, 2001, 791-796  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=11739898&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11739898&dopt=Abstract)
- A3: Markert, Y., Köditz, J., Ulbrich-Hofmann, R. & Arnold, U.**  
Proline vs. charge concept for protein stabilization against proteolytic attack  
*Protein Engineering*, **16**, 2003, 1041-1046  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=14983085&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=14983085&dopt=Abstract)
- A4: Arnold, U., Schierhorn, A. & Ulbrich-Hofmann, R.**  
Influence of the carbohydrate moiety on the proteolytic cleavage sites in ribonuclease B  
*Journal of Protein Chemistry*, **17**, 1998, 397-405  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=9717736&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9717736&dopt=Abstract)
- A5: Arnold, U. & Ulbrich-Hofmann, R.**  
Differences in the denaturation behavior of ribonuclease A induced by temperature and guanidine hydrochloride  
*Journal of Protein Chemistry*, **19**, 2000, 345-352  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=11131141&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11131141&dopt=Abstract)
- A6: Köditz, J., Arnold, U. & Ulbrich-Hofmann, R.**  
Dissecting the effect of trifluoroethanol on ribonuclease A: Subtle structural changes detected by nonspecific proteases  
*European Journal of Biochemistry*, **269**, 2002, 3831-3837  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=12153580&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12153580&dopt=Abstract)
- A7: Arnold, U. & Ulbrich-Hofmann, R.**  
Proteolytic degradation of ribonuclease A in the pretransition region of thermally and urea-induced unfolding  
*European Journal of Biochemistry*, **268**, 2001, 93-97  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=11121107&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11121107&dopt=Abstract)
- A8: Arnold, U., Schierhorn, A. & Ulbrich-Hofmann, R.**  
Modification of the unfolding region in bovine pancreatic ribonuclease and its influence on the thermal stability and proteolytic fragmentation  
*European Journal of Biochemistry*, **259**, 1999, 470-475  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=9914529&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9914529&dopt=Abstract)

- A9: Arnold, U., Hinderaker, M.P., Köditz, J., Golbik, R., Ulbrich-Hofmann, R. & Raines, R. T.**  
Protein prosthesis: a nonnatural residue accelerates folding and increases stability  
*Journal of the American Chemical Society*, **125**, 2003, 7500-7501  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=12812474&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12812474&dopt=Abstract)
- A10: Köditz, J., Ulbrich-Hofmann, R. & Arnold, U.**  
Probing the unfolding region of ribonuclease A by site-directed mutagenesis  
*European Journal of Biochemistry*, **271**, 2004, 4147-4156  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=15479244&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=15479244&dopt=Abstract)
- A11: Tam, A., Arnold, U., Soellner, M. B. & Raines, R. T.**  
Protein rosthesis: 1,5-disubstituted-[1,2,3]-triazoles as *cis*-peptide bond surrogates  
*Journal of the American Chemical Society*, akzeptiert  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=17914828&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=17914828&dopt=Abstract)
- A12: Arnold, U., Schulenburg, C., Schmidt, D. & Ulbrich-Hofmann**  
Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics  
*Biochemistry*, **45**, 2006, 3580-3587  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=16533040&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=16533040&dopt=Abstract)
- A13: Leich, F., Köditz, J., Ulbrich-Hofmann, R. & Arnold, U.**  
Tandemization endows bovine pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity  
*Journal of Molecular Biology*, **358**, 2006, 1305-1313  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=16580680&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=16580680&dopt=Abstract)
- A14: Schulenburg, C., Ardelt, B., Ardelt, W., Arnold, U., Shogen, K., Ulbrich-Hofmann, R. & Darzynkiewicz, Z.**  
The interdependence between catalytic activity, conformational stability and cytotoxicity of onconase  
*Cancer Biology & Therapy*, **6**, 2007, *im Druck*  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=17637563&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=17637563&dopt=Abstract)
- A15: Leich, F., Stöhr, N., Rietz, A., Ulbrich-Hofmann, R. & Arnold, U.**  
Endocytotic internalization as a crucial factor for the cytotoxicity of ribonucleases  
*Journal of Biological Chemistry*, 27640-27646  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=17635931&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=17635931&dopt=Abstract)

## CURRICULUM VITAE

Name: Arnold  
Vorname: Ulrich  
geb. am: 30. Oktober 1965  
in: Halle (Saale)  
Familienstand: verheiratet  
Kinder: 3

### Anschrift des Arbeitgebers:

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Institut für Biochemie und Biotechnologie  
Kurt-Mothes-Straße 3  
06120 Halle

Tätigkeit: wissenschaftlicher Mitarbeiter (Biochemiker)  
Dienststellung: wissenschaftlicher Assistent (C1)

### private Anschrift:

Röderberg 13  
06114 Halle

### Schulbildung

09/72 – 08/80 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule „Wilhelm Pieck“, Ilmenau  
09/80 – 08/84 Erweiterte Oberschule „Johann Wolfgang von Goethe“, Ilmenau  
Abschluss 10. Klasse, Gesamtprädikat: *sehr gut*  
Abitur, Gesamtprädikat: *mit Auszeichnung*  
11/84 – 04/86 Wehrdienst in der NVA

## Berufsausbildung

- 09/84 – 10/84    Praktikum im VEG Saatgut und Pflanzenzüchtung Gotha-Friedrichswert
- 05/86 – 08/86    Praktikum im VEG Saatgut und Pflanzenzüchtung Gotha-Friedrichswert
- 09/86 – 11/86    Studium an der Sektion Pflanzenproduktion, Fachrichtung Pflanzenzüchtung,  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 11/86 – 07/91    Studium an der Sektion Biologie, Fachrichtung Biochemie, bzw. am Fachbereich  
Biochemie / Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Hochschulabschluss als Diplombiochemiker, Gesamtprädikat: *sehr gut*  
Thema der Diplomarbeit: Proteolyse als Methode zur Messung der  
Proteindenaturierung
- 08/91 – 08/92    Forschungsstudent am Fachbereich Biochemie / Biotechnologie der MLU
- 09/92 – 03/95    Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 04/95 – 05/96    wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biotechnologie des Fachbereichs  
Biochemie / Biotechnologie der MLU im Rahmen eines DGF-Projekts
- 06/96 – 04/97    Veröffentlichung von Publikationen und Anfertigung der Dissertationsschrift
- 05/97 – 11/99    wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biotechnologie des Fachbereichs  
Biochemie / Biotechnologie der MLU
24. Juli 1997    Verteidigung der Dissertation, Gesamtprädikat: *summa cum laude*  
(ausgezeichnet)  
Thema der Dissertation: Studien zur Entfaltung und Stabilität von  
Ribonuclease A und Ribonuclease B mittels limitierter Proteolyse
- 12/99 – 11/01    ausgezeichnet mit der Luther-Medaille der Martin-Luther-Universität  
postdoctoral training am Department of Biochemistry der University of  
Wisconsin-Madison, gefördert durch ein Stipendium des Arthur-B.-Michael  
Fund
- seit 12/00        wissenschaftlicher Assistent am Institut für Biochemie und Biotechnologie der  
Martin-Luther-Universität; Forschungsaufenthalte an der UW-Madison  
09/02–10/02, 06/03–07/03, 09/04–10/04 und 09/06–10/06

Halle/Saale, September 2007

Ulrich Arnold

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Habilitationsschrift einzureichen oder mich dem Habilitationsverfahren zu unterziehen.

Halle/Saale, September 2007

Ulrich Arnold

## DANKSAGUNG

Für das Zustandekommen dieser Arbeit habe ich vielfältige Unterstützung erhalten, für die ich hier danken möchte. Den Großteil meiner Arbeiten konnte ich unter (An-)leitung von Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, durchführen. Sie lenkte mein wissenschaftliches Interesse auf das spannende Zwischenfeld von biochemischer Grundlagenforschung und angewandter Biotechnologie. Für ihre stete Förderung durch Forderung und Toleranz, ihren Führungs- und Umgangsstil und für ihr Vertrauen in mich und meine Arbeit bin ich ihr zutiefst verbunden. Auch Herrn Prof. em. Dr. Alfred Schellenberger möchte ich in diesem Sinne stellvertretend für die Unterstützung seitens der Martin-Luther-Universität während meines Studiums und der Anfangszeit meiner Promotion danken.

Großen Anteil an meiner wissenschaftlichen Entwicklung trägt auch Prof. Dr. Ronald T. Raines vom Department of Biochemistry der University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA. Während meines Postdoc-Aufenthalts 1999-2001 in seiner Arbeitsgruppe ließ er mir genug wissenschaftliche Freiheiten, um ein wenig in die Welt der chemischen Peptidsynthese eintauchen zu können. Mit ihm und seiner Arbeitsgruppe, aus der Dr. Peter A. Leland, Matthew P. Hinderaker und Annie Tam genannt seien, sowie mit Dr. Gary Case (UW-Biotechnology Center) verbindet mich seitdem eine andauernde und fruchtbringende Kooperation.

Selbstverständlich wäre diese Arbeit ohne die Mitwirkung der Diplomanden und Doktoranden, die ich betreut habe, und der Freunde, Kollegen und Arbeitsgruppen, die mehr oder weniger eng und/oder lange mit den experimentellen Arbeiten und der Auswertung derselben zu tun hatten, so nicht zustande gekommen. Stellvertretend seien hier als die „längsten Begleiter“ Dr. Jens Köditz und Franziska Leich sowie Dr. Johanna Mansfeld, Dr. Angelika Schierhorn und Dr. Ralph Golbik gedankt. Die gute Zusammenarbeit half über so manchen Dämpfer des Labor- und Universitätsalltags hinweg.

Ein nicht unbeträchtlicher Teil akademischer Beschäftigung fließt in Verwaltungsarbeit – für deren Bewältigung möchte stellvertretend Dr. Holger Neef und Cheryl Adams (UW-Madison) danken. Für eine finanzielle Unterstützung danke ich dem Land Sachsen-Anhalt, dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Arthur B. Michael Fund sowie der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für die entgegengebrachte Toleranz v.a. wegen der oftmals langen Abende im Labor und insbesondere meinen Eltern für die Wegbereitung und Rückendeckung. Sie und die vielen Freunde, mit denen ich durch die Musik verbunden bin, haben mir immer einen Ausgleich zur Wissenschaft gegeben.