

RALF MORITZ

Infrarotspektroskopische
Strukturuntersuchungen zur Faltung von
unmarkierter und ^{13}C -markierter
Ribonuklease T1

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

BERLIN 2003

Betreuer und Gutachter der Arbeit: PROF. DR. D. NAUMANN

Zweiter Gutachter der Arbeit: PROF. DR. W. SAENGER

Tag der mündlichen Prüfung: 15. August 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteine	1
1.1.1	Proteinstruktur	1
1.1.2	Proteinfaltung	2
1.1.3	Methoden zur Untersuchung der Proteinstruktur und Proteinfaltung	3
1.1.4	Ribonuklease T1	6
1.2	FOURIER-Transform-Infrarot-Spektroskopie	9
1.2.1	Physikalische Grundlagen der FTIR-Spektroskopie	9
1.2.2	FTIR-Spektrometrie	12
1.2.3	Infrarotspektroskopische Untersuchungen an Proteinen	17
2	Zielsetzung	25
3	Material	27
3.1	Chemikalien	27
3.1.1	Nährmedien	28
3.1.2	Puffer	28
3.2	Materialien und Geräte	29
4	Methoden	31
4.1	Proteinexpression und -aufreinigung	31
4.1.1	Expressionssystem	31
4.1.2	Aufreinigungsprozedur	33
4.2	CD-Spektroskopie	39
4.3	FTIR-Spektroskopie	39
4.3.1	Messungen unter Bedingungen des thermodynamischen Gleichgewichts	40
4.3.2	Zeitaufgelöste Messungen	42
4.4	Berechnung der Amid-I-Bande auf Basis von Übergangsdipolkopplungen (TDC)	54
5	Ergebnisse	57
5.1	Proteinaufreinigung	57
5.1.1	Chromatographie	57

Inhaltsverzeichnis

5.1.2	Spezifische Enzymaktivität	58
5.1.3	CD-Spektroskopie	58
5.1.4	FTIR-Spektroskopie	59
5.2	FTIR-Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen	59
5.2.1	Schmelzkurvenvergleich der beiden Proteinvarianten anhand von IR-Markerbanden	69
5.3	Berechnete Spektren	72
5.4	FTIR-Messungen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen	74
5.4.1	Differenzspektren	74
5.4.2	Totzeitspektren	88
6	Diskussion	93
6.1	Expression und Aufreinigung von unmarkierter und ^{13}C -markierter RNase T1	93
6.1.1	Charakterisierung der in <i>S. cerevisiae</i> exprimierten RNase T1 mit bioanalytischen Methoden	94
6.2	FTIR-spektroskopische Strukturuntersuchungen	95
6.2.1	Diskussion der spektralen Unterschiede zwischen unmarkierter und ^{13}C -markierter RNase T1 unter Bedingungen des thermo- dynamischen Gleichgewichts	97
6.2.2	Berechnung der Schwingungsspektren unmarkierter und ^{13}C - markierter RNase T1	103
6.2.3	Zeitaufgelöste FTIR-Spektren von unmarkierter und ^{13}C -mar- kierter RNase T1 unter Bedingungen des thermodynamischen Nicht-Gleichgewichts	105
7	Ausblick	117

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht der verschiedenen spektralen Regionen im infraroten Spektrum elektromagnetischer Strahlung	9
1.2	Übersicht der Amidbanden	18
1.3	Absorptionen der Aminosäureseitengruppen im Amid-I- und -II-Bereich in D ₂ O	20
1.4	Theoretische Zuordnung von Peptidschwingungsbanden verschiedener Konformationen im Amid-I- und Amid-II-Bereich	21
3.1	Liste der verwendeten Chemikalien	27
3.2	Liste der verwendeten Materialien	29
3.3	Liste der verwendeten Geräte	30
5.1	Bandenzuordnung für den Amid-I-Bereich von RNase T1	62
5.2	Schmelztemperaturen und VAN ´T HOFF-Enthalpieänderungen am Phasenübergang von unmarkierter und ¹³ C-markierter RNase T1 aus <i>S. cerevisiae</i>	72
5.3	Kinetische Konstanten der Temperatursprungexperimente von 65 °C auf 10 °C, 20 °C und 45 °C.	80

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kristallstruktur von RNase T1	7
1.2	Schematischer Aufbau eines MICHELSON-Interferometers.	14
1.3	Interferogramme und die daraus FOURIER-transformierten Spektren einer monochromatischen und polychromatischen Lichtquelle	15
1.4	IR-Spektren von H ₂ O und D ₂ O	19
4.1	RP-HPLC-Chromatogramm von aus Hefen exprimierter RNase T1 nach der ersten Aufreinigung über eine Anionenaustauschersäule	36
4.2	IR-Spektren von aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i> exprimierter RNase T1	37
4.3	RP-HPLC-Chromatogramm von aus Hefen exprimierter RNase T1 nach der ersten Aufreinigung über eine Anionenaustauschersäule. Die Trennung erfolgte mit einer Nucleogel-C 18-Trennsäule, ohne die Verwendung von TFA als Ionenpaarbildner.	38
4.4	RP-HPLC-Kalibrationsgerade für RNase T1	39
4.5	Neuentwickelten Temperatursprungapparat (schematischer Aufbau)	44
4.6	Neuentwickelte Temperatursprungapparat (Dokumentation der Langzeitstabilität)	46
4.7	Weiterentwickelte Temperatursprungapparat (schematischer Aufbau)	47
4.8	Dokumentation des nötigen Probenvolumens für die weiterentwickelte Temperatursprungapparat	48
4.9	Dokumentation der Resttemperaturanpassung bei einem Temperatursprungexperiment mit der weiterentwickelten Temperatursprungapparat	50
4.10	Dokumentation der Standardabweichung während eines Temperatursprungexperimentes	52
5.1	RP-HPLC-Chromatogramm einer Mischung von RNase-T1-Standard aus <i>A. oryzae</i> und ¹³ C-markierter sowie unmarkierter RNase T1 aus <i>S. cerevisiae</i> DT1103.	57
5.2	CD-Spektren von aus <i>S. cerevisiae</i> DT1103 exprimierter ¹³ C-markierter und unmarkierter RNase T1	58
5.3	Zweite Ableitungen der IR-Spektren von aus <i>S. cerevisiae</i> DT1103 und aus <i>E. coli</i> exprimierter nicht markierter RNase T1	59

Abbildungsverzeichnis

5.4	Absorbanzspektren, FSD-Spektren und zweite Ableitungen der Absorbanzspektren von unmarkierter RNase T1 im Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C.	60
5.5	Absorbanzspektren, FSD-Spektren und zweite Ableitungen der Absorbanzspektren von ¹³ C-markierter RNase T1 im Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C.	61
5.6	Original- und FSD-Spektrum von ¹³ C-markierter und unmarkierter RNase T1 bei 20 °C.	64
5.7	Original- und FSD-Spektrum von ¹³ C-markierter und unmarkierter RNase T1 bei 80 °C	65
5.8	Differenzspektrum bei 80 °C zwischen den zweiten Ableitungen der ¹³ C-markierten und unmarkierten RNase T1	66
5.9	Differenzspektren zwischen ¹³ C-markierter und unmarkierter RNase T1 bei 20 und 80 °C	68
5.10	Schmelzkurven einiger IR-Banden von ¹³ C-markierter und unmarkierter RNase T1	70
5.11	Normierte Schmelzkurven einiger IR-Banden von ¹³ C-markierter und unmarkierter RNase T1	71
5.12	Amid-I-Bereich der berechneten Spektren von unmarkierter und ¹³ C-markierter RNase T1.	73
5.13	Differenzspektrum der berechneten Spektren von Abbildung 5.12 auf Seite 73.	73
5.14	Differenzspektren von unmarkierter und ¹³ C-markierter RNase T1 bei einem Temperatursprung von 65 nach 10 °C.	75
5.15	Differenzspektren von unmarkierter und ¹³ C-markierter RNase T1 bei einem Temperatursprung von 65 nach 20 °C.	76
5.16	Differenzspektren von unmarkierter und ¹³ C-markierter RNase T1 bei einem Temperatursprung von 65 nach 45 °C.	77
5.17	Intensitätsverläufe der Banden bei 1626, 1633 und 1643 cm ⁻¹ , sowie der zeitliche Verlauf der Tyrosinbandenposition von unmarkierter und ¹³ C-markierter RNase T1.	79
5.18	Differenzspektren während der Rückfaltung von unmarkierter RNase T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von 10 °C.	82
5.19	Differenzspektren während der Rückfaltung von ¹³ C-markierter RNase T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von 10 °C.	83
5.20	Differenzspektren während der Rückfaltung von unmarkierter RNase T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C.	84
5.21	Differenzspektren während der Rückfaltung von ¹³ C-markierter RNase T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C.	85

5.22	Differenzspektren während der Rückfaltung von unmarkierter RNase T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von 45°C.	86
5.23	Differenzspektren während der Rückfaltung von ¹³ C-markierter RNase T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von 45°C.	87
5.24	Spektrale Gesamtänderungen zwischen 20 bzw. 45°C und 65°C im Gleichgewichtsexperiment, detektierte Gesamtänderungen der zeitaufgelösten Experimente und darunter die aus den beiden Differenzspektren berechneten Ereignisse während der ersten 100 ms der Temperatursprungexperimente (Totzeit).	89
6.1	Positionen der isotope-markierten Proline in der Kristallstruktur von RNase T1.	97
6.2	TDC zwischen C=O-Gruppen im antiparallelen β -Faltblatt	101
6.3	<i>trans</i> - und <i>cis</i> -Konformation von Prolin. Die Pfeile markieren den Verlauf des Polypeptidrückgrats.	106
6.4	Intensitätsverläufe der Markerbande bei 1626 cm ⁻¹ von unmarkierter RNase T1 nach Temperatursprüngen von 65°C auf 10, 20 und 45°C.	108
6.5	Faltungswege der RNase T1	109
6.6	Modell eines Faltungstrichters	110
6.7	Späte Ereignisse während der Rückfaltung von unmarkierter RNase T1 bei einer Rückfaltungstemperatur von 20°C.	114
6.8	Späte Ereignisse während der Rückfaltung von ¹³ C-markierter RNase T1 bei einer Rückfaltungstemperatur von 20°C.	115

Abbildungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

<i>a</i>	Beschleunigung
<i>A</i>	Absorbanzspektrum
<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
AcN	Acetonitril
AE	Absorptionseinheiten
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATR	<i>attenuated total reflection</i>
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
<i>c</i>	Konzentration
<i>c</i>	Lichtgeschwindigkeit ($2,99792 \cdot 10^8$ m/s)
cal	Kalorie (4,1868 J)
CD	Circulardichroismus
$\Delta H_{\text{VAN 'T HOFF}}$	Enthalpieänderung (bestimmt mit der VAN 'T HOFF-Gleichung)
$\Delta \bar{\nu}$	Phasendifferenz zweier interferierender Strahlen
<i>d</i>	Abstand zweier Spektrallinien
<i>d</i>	Schichtdicke
<i>D</i>	Differenzspektrum
D ₂ O	² H ₂ O
Da	Dalton (Einheit der relativen Molmasse, <i>keine</i> SI-Einheit)
DFT	Diskrete Variante der FOURIER-Transformation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTGS	Deutertes Triglycinsulfat
ϵ	Extinktionskoeffizient
<i>E</i>	Energie
<i>E</i>	Extinktion (synonym verwendet mit dem Begriff <i>Absorption</i> ; entsprechend <i>engl. absorbance</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
esu	<i>electrostatic unit</i>
<i>F</i>	Kraft
FSD	FOURIER-Selbst-Dekonvolution
FTIR	FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie
Gln	Glutamin

Abkürzungsverzeichnis

Glu	Glutamat
GpC	Dinukleotid der Nucleoside Guanosin und Cytidin, die über eine Phosphatgruppe miteinander verknüpft sind
h	PLANCKSche Konstante ($6,6 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
I	Intensität der Probe
I_0	Intensität der Referenz
$I(x)$	Intensität als Funktion des Spiegelweges x (<i>Interferogramm</i>)
J	Joule
k	Kraftkonstante
K	Kelvin
K12	Bezeichnung für Laborstämme von <i>E. coli</i> , die für die Herstellung rekombinanter Proteine verwendet werden dürfen
λ	Wellenlänge
μ	reduzierte Masse ($\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$)
m	Masse
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MCT	Quecksilber Cadmium Tellurid (<i>mercury cadmium telluride</i>)
MWCO	molecular weight cut off
ν	Frequenz
$\bar{\nu}$	Wellenzahl
N	Anzahl der Atome
N	Newton
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
pH ^D	pH-Wert einer D-Lösung ermittelt mit einer Standard-Glaselektrode ohne Berücksichtigung des Isotopeneffektes
pdb	File-Format der <i>protein data base</i>
PEG	Polyethylenglykol
Pro	Prolin
R	Gaskonstante ($8,31451 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
RMS	<i>root mean square</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase T1	Ribonuklease T1
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
S	Einkanalspektrum
$S(\bar{\nu})$	maximale Intensität des monochromatischen Lichtstrahls der Wellenzahl ($\bar{\nu}$)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S54G/P55N	Ribonuklease T1 mit Glycin statt Serin an Position 54 und Asparagin statt Prolin an Position 55
ss	single stranded
t	Zeit

Abkürzungsverzeichnis

T	Temperatur
T_m	Temperatur des Phasenübergangs (Schmelztemperatur)
TDC	<i>transition dipole coupling</i>
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i>
TOF	<i>time of flight</i>
TRIS	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>
TTL	<i>transistor transistor logic</i>
Tyr	Tyrosin
T-Sprung	Temperatursprung
UV	Ultraviolett
Vis	<i>visible</i>
ν	Schwingungszunatenzahl
W59Y	Ribonuklease T1 mit Tyrosin anstelle von Tryptophan an Position 59
Wellenzahl	$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$ (cm^{-1})
x	Spiegelposition
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
$[\Theta]$	spezifische Elliptizität
Z	Schwingungsfreiheitsgrad

Abkürzungsverzeichnis