

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