

6 Diskussion

6.1 Expression und Aufreinigung von unmarkierter und ^{13}C -markierter RNase T1

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Isolierung von ca. 3 mg RNase T1, die erstmalig nur an den Carbonylkohlenstoffatomen aller vier Proline im Protein ^{13}C -markiert wurde. Des Weiteren wurden ca. 5 mg unmarkierter RNase T1 Wildtyp hergestellt. Als Expressionssystem diente für beide Proteinvarianten der prolinauxotrophe Hefestamm *S. cerevisiae* DT1103.

Ursprünglich war geplant, anstelle der Hefen einen prolinauxotrophen *E. coli* K12-Stamm für die biosynthetische Herstellung der beiden RNase T1-Varianten zu verwenden. Die Beschaffung eines solchen Stamms gelang allerdings zu Beginn dieses Projektes nicht.¹ *E. coli* als Expressionssystem wäre in zweierlei Hinsicht vorteilhaft gewesen: Zum einen exprimiert *E. coli* in der Regel rekombinante Proteine effizienter als *S. cerevisiae* [88], zum anderen existieren bereits einige etablierte Aufreinigungsprotokolle für RNase T1 in diesem Expressionssystem [38, 78, 86, 87]. Der prolinauxotrophe Hefestamm *S. cerevisiae* DT1103 erwies sich bei einer Kultivierung auf Minimalmedium und rationierter Prolinzugabe als ineffizientes Expressionssystem. Die Ausbeuten lagen zwischen 100 und 200 μg Protein pro Liter Kulturmedium.² Erschwerend kam bei den Hefen die Tatsache hinzu, dass aufgrund des völlig anderen Expressionsverhaltens dieser Spezies im Vergleich zu *E. coli* ein grundlegend neues Aufreinigungsprotokoll entwickelt werden musste. Hierbei stellten insbesondere die komplexe Matrix (Sekretion der RNase T1 ins Kulturmedium und nicht ins Periplasma wie bei *E. coli*) und die Entfernung des Ionenpaarbildners TFA aus der Probe nach der Endreinigung mit der RP-HPLC ein Problem dar (siehe Abschnitt 4.1.2.1). Die erfolgreiche Endreinigung der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1 gelang durch eine geeignete Eluentenwahl ohne den Zusatz von TFA. Die exakte Proteinmenge konnte nach der RP-HPLC mit Hilfe einer Kalibrationsmethode sehr genau erfasst werden.

¹Mündliche Mitteilung des Kooperationspartners Prof. U. Hahn (Leipzig).

²In Vollmedium wurde mit dem prolinauxotrophen Hefestamm *S. cerevisiae* DT1103 eine Expressionsrate von ca. 4 mg nicht-markiertem Protein pro Liter Kulturmedium erreicht. Die Expression von RNase T1-Wildtyp aus *E. coli* in Vollmedium erreicht hingegen eine Expressionsrate von bis zu 40 mg pro Liter Kulturmedium [87]. Bislang liegen noch keine Erfahrungen über die Kultivierung von *E. coli*-Mangelmutanten zur Expression von RNase T1 vor.

6.1.1 Charakterisierung der in *S. cerevisiae* exprimierten RNase T1 mit bioanalytischen Methoden

Das hohe Auflösungsvermögen der RP-HPLC macht es möglich Polypeptide voneinander zu trennen, die sich nur in einer einzigen Aminosäure unterscheiden [107]. Es ist sogar mit dieser Methode möglich, die oxidierte Form eines Polypeptids von seiner reduzierten Form zu trennen [108, 109]. Aus diesem Grunde wurde die RP-HPLC gewählt, um die Identität dreier RNase T1-Moleküle unterschiedlichen Ursprungs zu belegen. Hierzu wurde eine Mischung der isotope markierten bzw. unmarkierten RNase T1 aus *S. cerevisiae* und RNase T1-Standard aus *A. oryzae* chromatographiert. Das Chromatogramm 5.1 auf Seite 57 belegt, dass alle drei RNase T1 Spezies mit derselben Retentionszeit eluiert werden. Der singuläre, symmetrische Peak, der nach 19 Minuten detektiert wird, zeigt, dass eine Mischung der drei Proteine mit der RP-HPLC ununterscheidbar ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich um Proteine mit derselben Primärstruktur handelt.

Leider ließ sich mit der RP-HPLC nicht belegen, dass auch die dreidimensionale Struktur dieser unterschiedlich exprimierten RNase T1-Proteine identisch war. Es war deshalb unumgänglich, mit weiteren Methoden die korrekte Faltung der Proteine zu bestätigen. Hierzu boten sich Untersuchungen der enzymatischen Aktivität (siehe Abschnitt 4.1.2.2), die CD-Spektroskopie (siehe Abschnitt 4.2) und natürlich auch die FTIR-Spektroskopie an.

Messungen der spezifischen enzymatischen Aktivität der aus *S. cerevisiae* DT1103 isolierten ^{13}C -markierten und unmarkierten RNase T1 und, zum Vergleich, einer RNase-T1-Standard-Probe aus *A. oryzae*, liefern vergleichbare Werte für alle Proteine. Diese Tatsache gibt einen ersten Hinweis darauf, dass die Proteine nach der HPLC auch dieselbe dreidimensionale Struktur haben. Des Weiteren zeigen die Messungen, dass die Isotopenmarkierung erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der durch das Protein katalysierten Reaktionen hat.

FTIR-spektroskopische Untersuchungen belegen schließlich, dass die aus Hefen exprimierte RNase T1 dieselbe Struktur aufweist wie die üblicherweise aus *E. coli* isolierte, die den bisherigen IR-spektroskopischen Messungen als Untersuchungsobjekt diente [23, 47, 95]. Abbildung 5.3 auf Seite 59 zeigt den Amid-I-Bereich eines IR-Spektrums von 1600 bis 1700 cm^{-1} , sowie den Bereich von 1500 bis 1600 cm^{-1} , in dem die Aminosäureseitenketten absorbieren. Zur Erhöhung der Auflösung sind die zweiten Ableitungen der Spektren dargestellt, in denen die Absorptionsmaxima der Originalspektren nun als Minima abgebildet sind. Die beiden Schwingungsspektren sind sowohl im Amid-I-Bereich als auch im Bereich der Aminosäureseitenketten praktisch identisch. Hervorzuheben ist vor allem die sehr gute Übereinstimmung der Tyrosinbandenposition bei 1515 cm^{-1} , deren Frequenz sehr empfindlich auf geringste Änderung der Proteintertiärstruktur reagiert [23, 47, 60, 100].

Als eine weitere spektroskopische Methode dokumentieren CD-spektroskopische Untersuchungen ebenfalls, dass eventuelle Unterschiede zwischen der isotope markierten und unmarkierten RNase T1 in Schwingungsspektren lediglich auf den Einfluss der ^{13}C -Markierung und nicht auf Unterschiede in der Faltung zurückzuführen sind.

6.2 FTIR-spektroskopische Strukturuntersuchungen

Abbildung 5.2 auf Seite 58 zeigt die CD-Spektren der ^{13}C -markierten und unmarkierten aus *S. cerevisiae* DT1103 isolierten RNase T1. Die CD-Spektren der beiden Proteine sind erwartungsgemäß im Rahmen der Messgenauigkeit identisch. Es liegt deshalb sehr nahe, dass beide Proteine dieselbe räumliche Struktur haben.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten bioanalytischen Untersuchungen zur Reinheit und Struktur der in *S. cerevisiae* DT1103 exprimierten RNase T1 führten zu folgenden Ergebnissen:

- Es konnte ein Protokoll zur Aufreinigung von rekombinant in *S. cerevisiae* exprimierter ^{13}C -markierter und unmarkierter RNase T1 erfolgreich etabliert werden, das hochreine Produkte liefert.
- Die aus den Hefen isolierte RNase T1 hat dieselbe räumliche Struktur wie die aus *E. coli* gewonnene.
- Die unmarkierte und isotoopenmarkierte RNase T1 sind identisch gefaltet. Es lässt sich also daraus ableiten, dass sämtliche Unterschiede zwischen diesen beiden Spezies in IR-Spektren ausschließlich auf die vier ^{13}C -markierten Kohlenstoffatome in den Carbonylgruppen der Proline zurückzuführen sind.

Der Einsatz von RP-Phasen zur Aufreinigung von RNase T1 ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden. Die aus *E. coli* ins Periplasma exprimierte RNase T1 wird nach einer Lyse und anschließender Zentrifugation zunächst über eine Anionenaustauschersäule chromatographiert und dann durch eine Gelfiltration endgereinigt [38, 78, 86, 87]. Dieses aufwendige Verfahren könnte durch den Einsatz der präparativen RP-HPLC erheblich vereinfacht werden, wenn nämlich nach der Lyse der Überstand direkt über eine RP-Phase chromatographiert wird. Die hohe Trennleistung dieser Methode würde eine zweite Säule überflüssig machen und deshalb den Arbeitsablauf der Aufreinigung effizienter gestalten.

6.2 FTIR-spektroskopische Strukturuntersuchungen

In Kapitel 1.2.3.4 wurde bereits erwähnt, dass der Amid-I-Bereich in IR-Spektren sehr gut zur Untersuchung von Proteinstrukturen herangezogen werden kann. Energetisch setzt sich diese Region neben einem geringen Anteil von Absorptionen der Aminosäureseitenketten hauptsächlich aus den C=O-Streckschwingungen aller Peptidbindungen des Proteinerückgrats zusammen. Abhängig von ihren individuellen Konformationen und Mikroumgebungen differieren die Absorptionsfrequenzen der einzelnen C=O-Streckschwingungen voneinander und lassen die Amid-I-Bande deshalb breit und unstrukturiert erscheinen. Selbst auflösungsverstärkende Verfahren (siehe Abschnitt 1.2.2.3) können die Amid-I-Struktur nur begrenzt auflösen. Der physikalische Hintergrund hierfür ist, dass die Energie einer Schwingung und damit ihre Absorptionsbande im IR-Spektrum durch andere Schwingungen im Molekül beeinflusst werden kann. Dieselbe Schwingung einer funktionellen Gruppe hat deshalb in unter-

schiedlichen Umgebungen häufig verschiedene Schwingungsfrequenzen.³ Aus diesem Grund komplizieren im Amid-I-Bereich Kopplungen der C=O-Absorptionsfrequenzen der Peptidgruppen mit anderen geeigneten Schwingungen im Molekül die Interpretation der Daten erheblich. Man kann im Prinzip sagen, dass die Amid-I-Bande alle Informationen über eine Proteinstruktur und -dynamik auf Peptidbindungsebene beinhaltet. Allerdings lassen sich bisher mit der IR-Spektroskopie (im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie) aufgrund der oben geschilderten komplexen Zusammenhänge nur grobe Aussagen über Strukturen von Proteinen machen. Es ist nicht ohne weiteres möglich Strukturinformationen über lokale Umgebungen spezifischer Aminosäuren zu erhalten. Eine Technik, die diese Limitierung überwinden könnte, ist die sogenannte *isotope edited infrared spectroscopy* [110,111]. Hierbei macht man sich den gezielten Einbau von Isotopenmarkierungen im Protein zu Nutze, um detailliertere Strukturinformationen aufgrund der nun lokal veränderten Schwingungsfrequenzen zu erhalten.

¹³C-Isotopenmarkierungen fanden schon einige Male Anwendung, um lokale Konformationen von Aminosäuren mit der IR-Spektroskopie aufzuklären. TADESSE *et al.* markierten in einem Alanin- und Glutamin-reichen Peptid, bestehend aus insgesamt 25 Aminosäuren, je fünf Alanine und fünf Glutamine [112]. Ein Vergleich der Schwingungsspektren der markierten mit denen der unmarkierten Peptide lieferte Rückschlüsse über die Sekundärstrukturen, in denen sich die markierten Aminosäuren befanden. HALVERSON *et al.* untersuchten durch gezielte ¹³C-Markierung die β -Faltblattstrukturbildung eines Peptids, bestehend aus 7 Aminosäuren. Ebenfalls Anwendung fanden Isotopenmarkierungen bei der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen [110,113]. Getrocknete Filme des isotopenmarkierten Proteins Bacteriorhodopsin wurden erfolgreich mit der ATR-Technik untersucht [114] und in dem Membranprotein Phospholamban (52 Aminosäuren) wurden gezielt zwei Leucine ¹³C-markiert und damit deren Position in der α -Helixstruktur bestätigt [98].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei der RNase T1 alle Proline im Protein am C1-Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe ¹³C-markiert. In Abbildung 6.1 auf der nächsten Seite sind die genauen Positionen der Proline in der Kristallstruktur der RNase T1 gekennzeichnet. Von den 104 Aminosäuren in dem Enzym sind das die Proline an den Positionen 39, 55, 60 und 73. Das Prolin an Position 73 befindet sich innerhalb einer Schleifenstruktur (Loop). Das Prolin an der Positionen 60 ist Teil der großen β -Faltblattstruktur. Die Proline an den Position 39 und 55 befinden sich an den Rändern der ersten beiden Stränge dieser β -Faltblattstruktur. Hierbei ist Pro 55 benachbart zu einem π - und β -Turnsystem. Im nativen Protein gehen Pro 39 und Pro 55 *cis*-Polypeptidbindungen voraus, wohingegen sich Pro 60 und Pro 73 in der *trans*-Konformation befinden.

³So absorbiert zum Beispiel die C–O-Streckschwingung des Methanols bei 1034 cm⁻¹, die des Ethanols bei 1053 cm⁻¹ und die des 2-Butanols bei 1105 cm⁻¹. Solche Variabilitäten resultieren aus Kopplungen der C–O-Streckschwingung mit benachbarten Schwingungen ähnlicher Energien und gleicher Symmetrien wie C–C-Streckschwingungen oder C–H-Schwingungen [49].

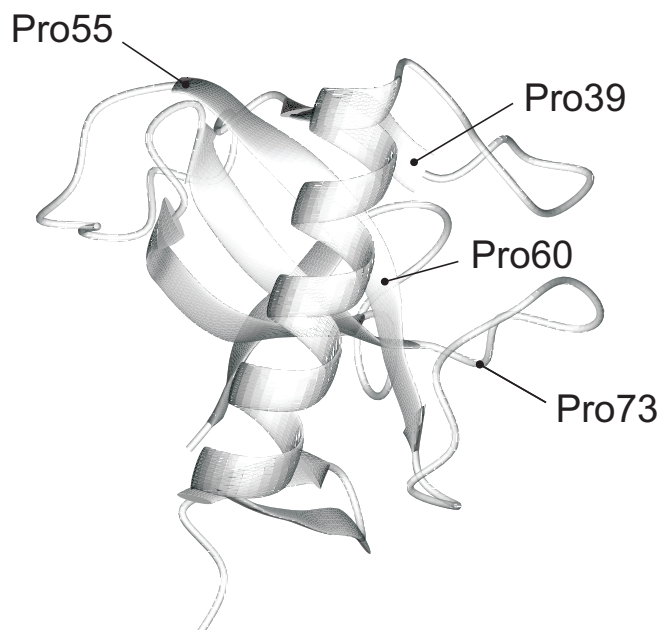


Abbildung 6.1: Kristallstruktur von RNase T1 (Datei 9RNT.pdb) [42]. Die Positionen aller vier Proline im Molekül sind gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mit der Software MOLMOL 2.5.1 erstellt.

6.2.1 Diskussion der spektralen Unterschiede zwischen unmarkierter und ^{13}C -markierter RNase T1 unter Bedingungen des thermodynamischen Gleichgewichts

Vergleichende FTIR-spektroskopische Untersuchungen unter Bedingungen des thermodynamischen Gleichgewichts an der unmarkierten und isotope markierten RNase T1 sollten dazu beitragen, die Proline anhand von Veränderungen strukturspezifischer Markerbanden im nativ gefalteten RNase-T1-Molekül gemäß der vorhandenen Kristallstruktur zu lokalisieren. Außerdem wurden die beiden Proteinvarianten thermisch entfaltet, um auch den Effekt der Isotopenmarkierungen auf die Spektren der denaturierten Proteine zu studieren. Die Differenzspektren in Abbildung 5.9 a und b auf Seite 68 zwischen der isotope markierten und unmarkierten RNase T1 zeigen, dass die Isotopenmarkierungen nur im nativ gefalteten Protein detektiert werden können. Die spektralen Unterschiede zwischen der markierten und unmarkierten RNase T1 sind hier sogar größer, als man nach einem Austausch von nur vier Kohlenstoffatomen erwarten würde.⁴ Aus den Differenzspektren von Abbildung 5.9 lässt sich nun direkt ablesen, welche struktursensitiven Banden durch die eingeführten ^{13}C -Atome

⁴Als Grund für dieses Phänomen wurden in der Literatur Phaseneffekte koppelnder Schwingungen angenommen [115]. Im Falle der isotope markierten Proline wird eine Kopplung der N-terminalen tertiären Amidschwingung des Prolins mit der $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Schwingung vermutet. Durch die Isotopenmarkierung kommt es zu einer Senkung der $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Schwingungsfrequenz, so dass eine verstärkte Kopplung mit der Amidgruppenschwingung möglich wird [116].

beeinflusst werden und mit Hilfe der bekannten Bandenzuordnung von Tabelle 5.1 auf Seite 62 lassen sich die Proline in bestimmten Sekundärstrukturelementen der RNase T1 lokalisieren.

Die IR-Spektroskopie ist sehr empfindlich für die Detektion von β -Faltblattstrukturen in Proteinen. Spektrale Differenzen zwischen dem unmarkierten und ^{13}C -markierten Protein in den typischen β -Faltblattmarkerbanden deuten darauf hin, dass zumindest einige der isotope markierten Proline in diesem Sekundärstrukturelement lokalisiert sein müssen (bei 1626, 1633, 1679 und 1687 cm^{-1}). Diese Feststellung wird nachhaltig durch die Kristallstruktur der RNase T1 (siehe Abbildung 6.1 auf der vorherigen Seite) bestätigt. Demnach befindet sich Pro 60 mitten in dem großen antiparallelen β -Faltblatt während sich Pro 39 und Pro 55 an den Rändern der ersten beiden Stränge dieses β -Faltblatts befinden.

Spektrale Differenzen in den Bereichen, in denen Turnstrukturen absorbieren (1645, 1654, 1658, 1666, 1670, 1679 und 1687 cm^{-1}), deuten darauf hin, dass auch die Absorptionen dieser Strukturen durch die Isotopenmarkierungen beeinflusst werden. Die Kristallstruktur der RNase T1 (Abbildung 6.1) belegt, dass sich Pro 39 in der Nähe eines π -Turns, der von den Aminosäuren 33 bis 38 gebildet wird und eines β -Turns, der die Aminosäuren 34 bis 37 einschließt, befindet [42].

6.2.1.1 Einfluss der Isotopenmarkierungen auf die Schwingungsspektren der RNase T1 im thermisch entfalteten Zustand

Der Einfluss der Isotopenmarkierungen auf das IR-Spektrum der RNase T1 ist im nativen Zustand am stärksten ausgeprägt und nimmt mit zunehmender Temperaturerhöhung immer weiter ab (siehe Abbildungen 5.4 und 5.5 auf den Seiten 60 und 61). Bei 80 °C sind die Spektren der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1 praktisch ununterscheidbar (siehe zum Beispiel Abbildung 5.8 auf Seite 66).

Ihre native dreidimensionale Struktur erhält die Polypeptidkette durch schwache intramolekulare Wechselwirkungen. Mit zunehmender Temperatur bzw. kinetischer Energie werden diese immer instabiler – das Protein „schmilzt“. Bei der RNase T1 verläuft dieser Prozess für alle struktursensitiven Markerbanden unter Gleichgewichtsbedingungen kooperativ ab (siehe Abbildung 5.11 auf Seite 71).⁵ Für die C=O-Gruppen, die ja hauptsächlich im Amid-I-Bereich absorbieren, hat das folgende Konsequenzen:

- Ein Aufschmelzen der Wasserstoffbrückenbindungen hat zur Folge, dass auch die im nativen Zustand definierten Sekundärstrukturelemente verschwinden und sich dadurch die Mikroumgebungen der individuellen C=O-Gruppen immer ähnlicher werden.
- Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen können nicht mehr die Elektronendichte in der C=O-Bindung und damit deren individuelle Schwingungsfrequenz spezifisch beeinflussen (vergleiche Abschnitt 1.2.3.4).

⁵Dies ist nicht für alle reversibel ent- und rückfaltbaren Proteine der Fall [117].

- Die C=O-Streckschwingungen können nicht mehr über intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen koppeln.
- Die Polypeptidkette hat keine definierte räumliche Struktur mehr (random coil), das heißt eine Kopplung der C=O-Gruppen über *transition dipole coupling* (TDC, siehe Abschnitte 1.2.3.4 und insbesondere Abschnitt 6.2.1.2) ist nicht mehr möglich.

Im Amid-I-Bereich der IR-Spektren macht sich das thermisch induzierte Aufschmelzen des Proteins durch ein Verschwinden der Feinstruktur bemerkbar. Selbst in den auflösungsverstärkten Spektren ist jetzt nur noch eine breite, nahezu konturlose Bande um ca. 1650 cm^{-1} zu detektieren. Die isotoopenmarkierten Proline in der RNase T1, die ca. 4% der Aminosäuren ausmachen, können unter diesen Bedingungen nicht mehr aufgelöst werden. In der Literatur wird bestätigt, dass selbst bei isotoopenmarkierten, thermisch entfalteten Peptiden, bei denen der Anteil an ^{13}C -markierten Aminosäuren 20% beträgt und damit fünfmal höher liegt als bei der RNase T1, die Isotoopenmarkierung praktisch kaum noch IR-spektroskopisch zu detektieren sind [101].

6.2.1.2 Einfluss der Isotoopenmarkierungen auf die Schwingungsspektren der RNase T1 im nativ gefalteten Zustand

Polypeptide mit antiparallelen β -Faltblattstrukturen lassen sich schwingungsspektroskopisch besonders gut aufgrund von C=O-Streckschwingungskopplungen der Peptidbindungen detektieren [62]. Im Spektrum kommt es zu einer Aufspaltung der C=O-Streckschwingungsbanden in eine Bande höherer Energie und eine Bande niedrigerer Energie. Eine solche Aufspaltung kann bis zu 60 cm^{-1} betragen [62]. Eine Berechnung dieses Phänomens wurde erstmals von MIYAZAWA auf Basis von Schwingungskopplungen über Valenz- und Wasserstoffbrückenbindungen mit Hilfe der Störungstheorie versucht [65]. Eingehendere Untersuchungen von KRIMM *et al.* unter Einbeziehung von Normalkoordinatenanalysen verschiedener Polypeptidstrukturen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (TDC) führten zu akzeptablen Ergebnissen beim Vergleich experimenteller Daten und theoretischer Berechnungen [62,74]. BRAUNER *et al.* zeigten schließlich in einer Kombination beider Ansätze, dass sich IR-Spektren von markierten und ^{13}C -markierten Peptiden mit α -helikalen- und β -Faltblattstrukturen in hoher Übereinstimmung mit den tatsächlich gemessenen IR-Spektren berechnen lassen [77]. Eine Simulation der Amid-I-Absorptionen von mehrsträngigen Oligopeptid β -Faltblattstrukturen wurde kürzlich von KUBELKA *et al.* durchgeführt [115]. Diese *ab-initio*-Berechnungen zeigen, dass die Aufspaltungen und Intensitäten der in β -Faltblattstrukturen involvierter C=O-Absorptionsschwingungsbanden unmarkierter und ^{13}C -markierter β -Stränge mit zunehmender Ausdehnung der Stränge ansteigen.

Wie bereits in Kapitel 5.2 gezeigt wurde, führen die in der β -Faltblattstruktur der RNase T1 lokalisierten isotoopenmarkierten Proline hauptsächlich zu einem Intensitätsverlust der β -Faltblattmarkerbanden bei 1678 und 1626 cm^{-1} im nativ gefalteten Protein (Abbildung 5.9 a und b). Im entfalteten Zustand kann die Isotoopenmarkierung nicht mehr detektiert werden. Der hohe Intensitätsverlust der β -Falt-

blattmarkerbanden kann nicht durch die erwartete einfache Verschiebung der entsprechenden Schwingungen um ca. 35 cm^{-1} (siehe Gleichung 5.1 auf Seite 63) nach niedrigerer Energie erklärt werden. In diesem Fall müssten die beiden Banden um den entsprechenden Betrag nach niedrigerer Energie verschoben sein, was nicht beobachtet wird. Ebenso wenig können Wasserstoffbrückenbindungen einen Einfluss haben (vergleiche Abschnitt 1.2.3.4), weil durch den Isotopenaustausch das Wasserstoffbrückenbindungsmuster in der RNase T1 nicht verändert wurde. Vielmehr muss *transition dipole coupling* (TDC, siehe auch Abschnitt 1.2.3.4) als Ursache für die spektralen Unterschiede zwischen der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1 bei den β -Faltblattmarkerbanden angenommen werden. Abbildung 6.2 auf der nächsten Seite zeigt eine idealisierte, antiparallele β -Faltblattstruktur bestehend aus drei antiparallelen Strängen, die von Glycin-Molekülen gebildet werden. Neben Wasserstoffbrückenbindungen sind mögliche TDC zwischen der im mittleren Strang hervorgehobenen C=O-Gruppe und anderen C=O-Gruppen desselben und benachbarter Stränge eingezeichnet. Hierbei bezeichnet D_{st} eine Kopplung *via* TDC zwischen den C=O-Bindungen der Peptidgruppen separiert durch s Peptidgruppen und t β -Faltblattstränge. MOORE *et al.* zeigten, dass $D_{10} \cong 0$ ist und nur durch die Kopplungen D_{11} , also Kopplungen zu den übernächsten Peptidgruppen in den nächst benachbarten β -Faltblattsträngen, die Aufspaltung der Amid-I-Bande theoretisch hergeleitet werden kann [75]. Darüber hinaus sind natürlich auch noch Kopplungen zu weiteren C=O-Gruppen möglich.

Ähnliche Kopplungsmechanismen zwischen den C=O-Gruppen spielen auch im großen β -Faltblatt der RNase T1 eine Rolle. Stellt man sich nun vor, dass eine oder mehrere dieser C=O-Gruppen durch ^{13}C =O-Gruppen ersetzt sind, so hätte das auch Konsequenzen für die resultierenden Schwingungsspektren. Aufgrund der unterschiedlichen Schwingungsfrequenzen von $^{12}\text{C}=\text{O}$ und $^{13}\text{C}=\text{O}$ kann zwischen den Übergangsdipolmomenten keine Kopplung mehr stattfinden, das heißt die hoch- bzw. niederfrequenten β -Faltblattbanden verlieren an Intensität [112, 118]. Genau diesen Effekt zeigt das Differenzspektrum zwischen der ^{13}C -markierten und unmarkierten RNase T1 (Abbildung 5.9 auf Seite 68). Den größten Intensitätsverlust erfahren die hoch- und niederfrequente β -Faltblattbande bei 1626 und 1679 cm^{-1} , weil drei der im großen β -Faltblatt lokalisierten Proline isotopenmarkiert wurden. Die nun entkoppelten $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Gruppen können natürlich untereinander koppeln, was zu einer ähnlichen Bandenaufspaltung im Amid-I-Bereich führen würde wie bei den $^{12}\text{C}=\text{O}$ -Gruppen, allerdings bei um ca. 35 cm^{-1} niedrigerer Energie.⁶ Hierzu reichen aber die wenigen markierten Proline im β -Faltblatt sicherlich nicht aus. Vielmehr ist zu erwarten, dass die entkoppelten $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Gruppen in *einer* mehr oder weniger breiten positiven Bande niederfrequent im Differenzspektrum erscheinen. Das Differenzspektrum in Abbildung 5.9 auf Seite 68 zeigt eine ungewöhnlich starke positive Bande bei 1614 cm^{-1} . An dieser Position ist in den Spektren der unmarkierten RNase T1

⁶Ein Spektrum der komplett ^{13}C -markierten RNase T1 ist in der Tat vom Bandenmuster her mit dem der unmarkierten RNase T1 identisch jedoch um ca. 43 cm^{-1} niederfrequent verschoben (mündliche Mitteilung von Dr. Heinz Fabian, MDC-Berlin).

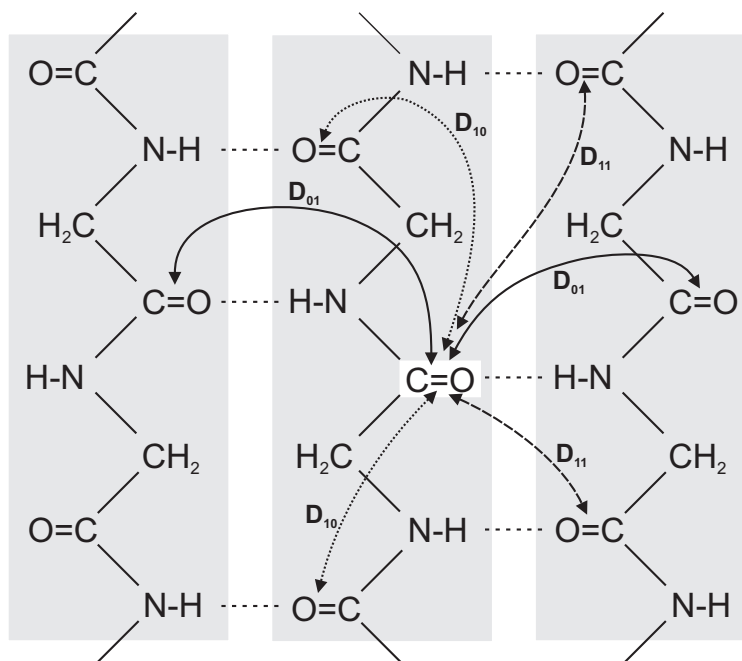


Abbildung 6.2: TDC einer C=O -Gruppe in einer idealisierten β -Faltblattstruktur eines Polyglycins. D_{st} bezeichnet Kopplungen der markierten Peptidgruppe zu durch s Peptidgruppen separierte C=O -Gruppen des t -ten Strangs (nach [75]).

bisher noch keine Bande detektiert worden. Diese Bande ist nicht nur im Differenzspektrum zu sehen, sondern auch im FSD-Spektrum (Abbildung 5.6 auf Seite 64) und in der zweiten Ableitung des Absorbanzspektrums (Abbildungen 5.5 und 5.8 auf den Seiten 61 bzw. 66). Es muss sich hier also zweifellos um eine Absorptionsbande handeln, die durch die Isotopenmarkierungen induziert wurde. Banden ungewöhnlicher Frequenz und starker Intensität wurden in isotopenmarkierten Polypeptidspektren mit β -Faltblattstruktur im Bereich zwischen 1604 und 1611 cm^{-1} [77] und in isotopenmarkierten Spektren einer β -Amyloid bildenden Peptidsequenz [118] gefunden. Im letzteren Fall wurde das Auftauchen dieser niederfrequenten Bande, ebenso wie oben angedeutet, auf koppelnde $^{13}\text{C=O}$ -Schwingungen der isotopenmarkierten Aminosäuren im β -Faltblatt zurückgeführt. Detaillierte Berechnungen an den unterschiedlich isotopenmarkierten Polypeptiden [77] zeigten jedoch, dass diese Bande aus $^{13}\text{C=O}$ - $^{12}\text{C=O}$ -Kopplungen über Valenzbindungen [73] resultiert. Hierbei bestimmen die Positionen der Isotopenmarkierungen in den Strängen empfindlich die Intensität und Frequenz der Bande. Auf der Basis von *ab-initio*-Berechnungen haben KUBELKA *et al.* vorgeschlagen, dass das Auftreten einer solchen Bande durch eine einzelne ^{13}C -Schwingung verursacht werden kann. Hierbei war der Effekt am größten, wenn diese in der Mitte eines β -Faltblattstranges ihres mehrsträngigen Modellpeptids lokalisiert war [115]. Demnach sollte Pro60 den größten Beitrag zu der Bande

bei 1614 cm^{-1} leisten. Eine mathematische Berechnung der Amid-I-Konturen der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1 aus den geometrischen Koordinaten der Kristallstruktur, könnte hier künftig eine Klärung des Problems herbeiführen (siehe Abschnitt 6.2.2).

Eine weitere interessante Entdeckung machten HALVERSON *et al.* bei einer Analyse einer isotoopenmarkierten β -Amyloid bildenden Peptidsequenz [118]. Nach Einführung der entkoppelten $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Schwingungen in die β -Amyloidstruktur war die Gesamtkopplung der „übrigen“ $^{12}\text{C}=\text{O}$ reduziert und die verbleibenden $^{12}\text{C}=\text{O}$ -Gruppen absorbierten bei einer etwas höheren Frequenz [118]. Die Abbildungen 5.6 und 5.9 zeigen bei 1633 cm^{-1} eine positive Intensität in den Spektren der ^{13}C -markierten RNase T1. Dieser Effekt könnte auf eine Frequenzverschiebung einiger $^{12}\text{C}=\text{O}$ -Schwingungen zu höherer Energie zurückgeführt werden.

Die Absorptionen von Turnstrukturen im Amid-I-Bereich von IR-Spektren zeichnen sich nicht durch charakteristische Bandenaufspaltungen aus, wie sie bei antiparallelen β -Faltblattstrukturen beobachtet werden. Turnstrukturen absorbieren in der Regel im Amid-I-Bereich zwischen 1640 und 1690 cm^{-1} [62, 119, 120]. Ebenso wie in den β -Faltblättern bestimmt TDC die genauen Absorptionsfrequenzen. Da TDC sehr stark von der Geometrie der beteiligten $\text{C}=\text{O}$ -Gruppen abhängt [121, 122] und damit auch von den Bindungswinkeln innerhalb der Turns, überlappen die entsprechenden Absorptionsbanden häufig mit denen anderer Sekundärstrukturelemente im Spektrum [62]. Die Kristallstruktur (Abbildung 6.1) zeigt Pro 39 benachbart zu einem π -Turn, der von den Aminosäuren 33 bis 38 und zu einem β -Turn, der von den Aminosäuren 34 bis 37 gebildet wird [42]. Ein TDC zwischen Pro 39 und diesen beiden Turns wäre durchaus denkbar. Stellt man sich nun vor, dass nach der Isotopenmarkierung die $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Gruppe, ähnlich wie zuvor bei den β -Faltblattstrukturen geschildert, aufgrund einer anderen Schwingungsfrequenz nicht mehr *via* TDC mit den Turns koppeln kann, so sollte sich auch dieser Effekt im Differenzspektrum niederschlagen.

Die Differenzspektren in Abbildung 5.9 auf Seite 68 zeigen noch eine Reihe weiterer Differenzbanden neben den bereits diskutierten bei 1678 , 1633 , 1626 und 1614 cm^{-1} : Das FSD-Differenzspektrum (Abbildung 5.9 b) löst die relativ breite negative Kontur bei 1679 cm^{-1} besser auf als das Differenzspektrum aus den Absorbanzspektren (5.9 a). Bei 1687 cm^{-1} ist deutlich eine Schulter zu erkennen. Daraus kann man schließen, dass die Isotopenmarkierungen nicht nur $\text{C}=\text{O}$ -Schwingungen im antiparallelen β -Faltblatt beeinflussen, wie bereits diskutiert wurde, sondern auch $\text{C}=\text{O}$ -Schwingungen anderer Sekundärstrukturelemente.⁷ Diese Tatsache wird noch dadurch unterstützt, dass man auch Differenzen bei 1645 , 1654 , 1658 , 1666 und 1670 cm^{-1} sieht. Bei 1654 und 1670 cm^{-1} führt die Isotopenmarkierung zu einer höheren und bei 1645 , 1658 und 1666 cm^{-1} zu einer niedrigeren Intensität. In diesen Bereichen absorbieren ebenfalls Turnstrukturen (siehe Tabelle 5.1). Überträgt man das Konzept der entkoppelten $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Schwingungen von den β -Faltblättern auf Turnstrukturen, dann

⁷Die Schulter bei 1687 cm^{-1} ist auch sehr gut beim FSD-Spektrum in Abbildung 5.6 auf Seite 64 und in dem entsprechenden Literaturspektrum der unmarkierten RNase T1 aus *E. coli* [60] zu erkennen.

lässt sich der Einfluss des dem π - und β -Turnsystem benachbarten Prolin an Position 39 aufgrund seiner Isotopenmarkierung im Amid-I-Bereich des IR-Spektrums verfolgen. So könnte nämlich die Absorption dieser entkoppelten $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Gruppe einerseits ebenfalls zur positiven Absorption bei 1614 cm^{-1} beitragen, andererseits ist sie aber sicherlich für spektrale Differenzen zwischen den beiden RNase T1-Varianten in der Region von 1640 bis 1690 cm^{-1} verantwortlich.

6.2.2 Berechnung der Schwingungsspektren unmarkierter und ^{13}C -markierter RNase T1

Aussagen über Proteinstrukturen aus IR-Spektren basieren hauptsächlich auf Erkenntnissen, die aus empirischen Messungen an „idealen“ Modellsubstanzen gewonnen wurden (siehe Abschnitt 1.2.3.4). Die Strukturen von Proteinen weisen naturgemäß Unregelmäßigkeiten bzw. Störungen in der Ausprägung von Sekundärstrukturen auf, die deshalb häufig zu Abweichungen von den idealen Absorptionsfrequenzen führen. Neben der Isotopenmarkierung einzelner Aminosäuren in der Proteinstruktur, bietet auch die theoretische Simulation von Spektren auf Basis eines geeigneten mathematischen Verfahrens die Möglichkeit einen Zugang zu den spektralen Informationen eines experimentell ermittelten Spektrums zu finden. Ein sehr guter Test für die Anwendbarkeit solcher Simulationsverfahren bieten die Spektren der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1, die zwar strukturell identisch sind, deren experimentelle Spektren sich aber aufgrund der Isotopenmarkierungen unterscheiden. Mit Hilfe der theoretischen Spektrensimulationen sollte es nun auch möglich werden, die Einflüsse der Isotopenmarkierung im Amid-I-Bereich zu berücksichtigen. Hierzu war es notwendig, zunächst einmal experimentell gemessene Spektren mit berechneten Spektren zu vergleichen.

Neben der Normalkoordinatenanalyse [62] und Störungstheorie [65], lassen sich IR-Spektren auch mit *ab-initio*-Rechnungen [115] simulieren. Da die Anzahl von Atomen in einem Protein sehr groß sein kann und alle Schwingungsfreiheitsgrade berücksichtigt werden müssen, sind *ab-initio*-Rechnungen zur Zeit noch auf kleine Peptide beschränkt und erfordern den Einsatz leistungsfähiger Computer bzw. lange Rechenzeiten [76]. Einen ganz anderen Ansatz bietet die Simulation des Amid-I-Bereichs mit TDC-Rechnungen [76, 96, 97]. TDC-Spektrensimulationen haben folgende Vorteile:

- Die Anzahl der berücksichtigten Schwingungen (Freiheitsgrade) wird auf die $\text{C}=\text{O}$ -Gruppen im Polypeptid reduziert. Im Gegensatz zu *ab-initio*-Rechnungen kann dadurch der Amid-I-Bereich eines Spektrums innerhalb weniger Sekunden auf einem handelsüblichen PC berechnet werden.
- Die Aufspaltung der Absorptionsbanden der in eine β -Faltblattstruktur involvierten $\text{C}=\text{O}$ -Moden kann mit TDC erklärt werden. Die Störungstheorie ist dazu nicht in der Lage [74].
- Für das Beispiel der RNase T1 lassen sich die Koordinaten für die $\text{C}=\text{O}$ -Oszillatoren leicht aus den Kristallstrukturdaten ermitteln. Aufgrund der hohen

Solvatisierung der Proteinmoleküle in Kristallen sind diese deshalb auch gute Modellstrukturen für Proteine in Lösung.

Auf der anderen Seite finden verschieden Faktoren bei diesem Ansatz der Spektrensimulation keine Berücksichtigung. Hierzu zählen hauptsächlich die Einflüsse des Lösemittels auf die Amidgruppen und die Kopplungen der C=O-Moden *via* Valenz- und Wasserstoffbrückenbindungen. TORII *et al.* konnten jedoch zeigen, dass diese Einflüsse vernachlässigbar sind [76]. Insgesamt gesehen hat TDC einen wichtigen, wenn nicht sogar den dominantesten Einfluss auf die Amid-I-Kontur [62, 123].

In Abbildung 5.12 auf Seite 73 sind die nach der in Abschnitt 4.4 beschriebenen Methode berechneten Amid-I-Banden der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1 dargestellt. Solche Rechnungen wurden bereits für globuläre [76], jedoch noch nie für isotoopenmarkierte Proteine durchgeführt. Die aus den Isotoopenmarkierungen resultierenden Unterschiede zwischen den beiden berechneten Spektren werden besonders gut im entsprechenden Differenzspektrum deutlich, das in Abbildung 5.13 auf Seite 73 dargestellt ist. Dieses simulierte Differenzspektrum ist dem experimentell ermittelten Differenzspektrum von Abbildung 5.9 auf Seite 68 sehr ähnlich. Besonders frappierend ist die Übereinstimmung der Differenzspektren im Bereich zwischen 1610 und 1620 cm^{-1} und zwischen 1670 und 1690 cm^{-1} . Dies gilt insbesondere, wenn man die berechneten mit den FSD-Spektren in Abbildung 5.9 b vergleicht. Ebenso wie in den gemessenen Spektren zeigen die berechneten Spektren neben der hochfrequenten β -Faltblattbande bei 1677 cm^{-1} (1679 cm^{-1} im gemessenen Spektrum) eine Schulter bei 1684 cm^{-1} (1687 cm^{-1} im gemessenen Spektrum). Die negative Kontur bei 1645 cm^{-1} in Abbildung 5.9 ist im simulierten Spektrum sieben Wellenzahlen nach höherer Energie verschoben. Die niederfrequente β -Faltblattbande bei 1626 cm^{-1} in den experimentellen Spektren ist in Abbildung 5.13 acht Wellenzahlen hochfrequent verschoben. Die positive Kontur im Bereich von 1650 bis 1670 cm^{-1} in Abbildung 5.9 b ist in Abbildung 5.13 viel stärker und nicht so differenziert ausgeprägt.

Ein Vergleich der auf Basis von TDC-Rechnungen simulierten mit den experimentell ermittelten IR-Spektren zeigt, dass dieser kombinierte Ansatz das Potenzial hat auf Polypeptidebene detaillierte Strukturinformationen zu liefern. Durch die Simulation von Proteinteilstrukturen kann sogar der Beitrag einzelner isotoopenmarkierter Proline zum Gesamtspektrum zugänglich werden. Dieses Projekt wird zur Zeit gemeinsam mit Prof. Max Diem (Hunter College, New York) realisiert. Die ersten Ergebnisse sind sehr viel versprechend. Sie zeigen, dass alle vier ^{13}C -markierten Proline zu spektralen Änderungen im Amid-I-Bereich führen. Diese sind am kleinsten für Pro 73, das in einer Schleifenstruktur lokalisiert ist (Abbildung 6.1) und am größten für Pro 55 und Pro 60, die sich im großen β -Faltblatt der RNase T1 befinden [116]. Ferner konnten die Berechnungen zeigen, dass Pro 39 und Pro 55 zu dem signifikanten Intensitätsverlust der hochfrequenten β -Faltblattbande in Abbildung 5.13 beitragen. Dies bestätigt auch die in Kapitel 6.2.1.2 getroffene Zuordnung für Pro 39.

6.2.3 Zeitaufgelöste FTIR-Spektren von unmarkierter und ^{13}C -markierter RNase T1 unter Bedingungen des thermodynamischen Nicht-Gleichgewichts

Die thermisch induzierte Ent- bzw. Rückfaltung von Proteinen unter Gleichgewichtsbedingungen liefert Erkenntnisse über die mit diesen Vorgängen verbundenen strukturellen Änderungen der Polypeptidkette und damit auch über ihre thermodynamische Stabilität. Eine langsame, graduelle Temperaturveränderung erlaubt es dem Protein zu jedem Zeitpunkt seine energetisch günstigste Konformation einzunehmen. Will man allerdings die Rückfaltungskinetiken von Proteinen untersuchen, so ist es zweckmäßig die thermodynamischen Bedingungen bei denen sich die Proteine in entfalteten Zuständen befinden, schlagartig in die Bedingungen zu verändern, in denen die native Proteinstruktur die höchste thermodynamische Stabilität hat. Je schneller die thermodynamischen Bedingungen geändert werden, desto genauer wird das in Abschnitt 1.1.2 angesprochene „Faltungsproblem“ experimentell angenähert, das heißt, desto besser lassen sich die Prozesse mit der FTIR-Spektroskopie auf molekularer Ebene zeitaufgelöst verfolgen, die die Polypeptidketten durchlaufen, bis sie ihre native Konformation eingenommen haben.

Zur Durchführung solcher Experimente ist in der Arbeitsgruppe eine Temperatursprungapparatur entwickelt worden, mit der bereits die Rückfaltungskinetiken der RNase T1 und einiger ihrer Varianten untersucht wurden [3, 23, 47, 94, 95]. Im Rahmen dieser Arbeit kam eine weiterentwickelte Temperatursprungapparatur zum Einsatz (siehe Abschnitt 4.3.2.2), die in folgenden Punkten verbessert wurde:

- Das benötigte Probenvolumen konnte um 60 % auf 40 μL verringert werden.
- Mit einer Probenfüllung waren nun mehrere Messungen möglich.
- Die Handhabbarkeit und Zuverlässigkeit der Apparatur konnte zugunsten einer höheren Messeffizienz verbessert werden.

Mit dieser weiterentwickelten Apparatur wurden die thermisch induzierten Rückfaltungskinetiken von unmarkierter und an allen vier Prolinen ^{13}C -markierter RNase T1 untersucht. Nach einer thermischen Entfaltung bei 65 °C erfolgte die Rückfaltung bei 10, 20 und 45 °C. Nach Abbildung 5.11 auf Seite 71 hat die native Struktur der RNase T1-Moleküle bei allen Rückfaltungstemperaturen die höchste thermodynamische Stabilität.

Wie in den letzten Abschnitten gezeigt wurde, hat die Isotopenmarkierung an den Prolinen einen erheblichen Einfluss auf die C=O-Streckschwingungsfrequenzen im Amid-I-Bereich. Bei einer genaueren Analyse der Spektren wurde insbesondere die Bedeutung von Kopplungen bzw. Nicht-Kopplungen einzelner $^{12}\text{C}=\text{O}$ - und $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingungen *via* TDC deutlich. Es konnte ferner gezeigt werden, dass TDC von den räumlichen Orientierungen der C=O-Dipole abhängig ist. Prozesse während der Rückfaltung, bei denen sich die räumlichen Orientierungen der $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Dipole in der RNase T1 verändern, sollten deshalb durch einen direkten Vergleich der

Rückfaltungskinetiken der unmarkierten mit denen der ^{13}C -markierten RNase T1 detektiert werden können. Von besonderem Interesse sind hierbei die Prolin-*trans*→*cis*-Isomerisierungsreaktionen von Pro 39 und Pro 55 (siehe Abbildung 6.3 und Abschnitt 1.1.4.2).

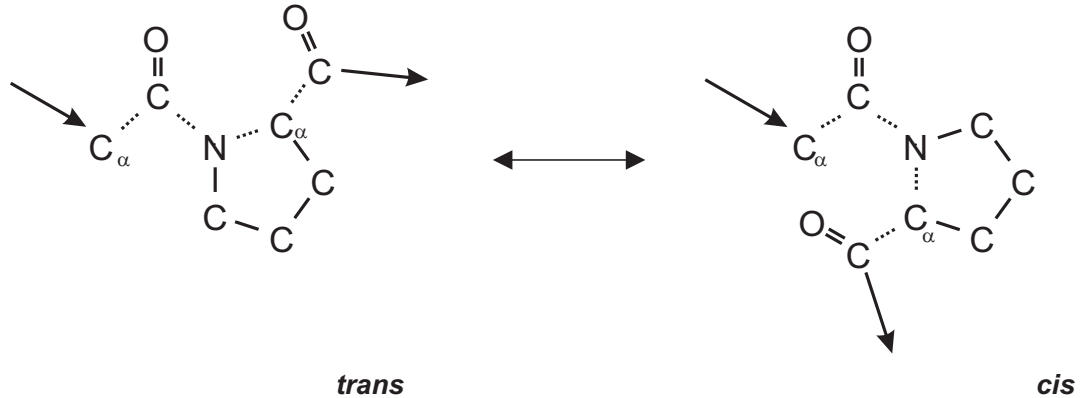


Abbildung 6.3: *trans*- und *cis*-Konformation von Prolin. Die Pfeile markieren den Verlauf des Polypeptidrückgrats.

Generell werden in Nicht-Prolinpeptidbindungen *trans*-Isomere stark favorisiert. Der *cis*-Anteil beträgt hier nur 0,03 % [124]. In Prolinpeptidbindungen (Xaa-Pro) hingegen findet man einen *cis*-Anteil von 5,2 % [124]. Trotzdem ist in der RNase T1 der Anteil von 50 % *cis*-Prolinpeptidbindungen ungewöhnlich hoch (*cis*: Pro 39, Pro 55; *trans*: Pro 60, Pro 73). Der Grund für das häufigere Auftreten von *cis*-Prolinpeptidbindungen im Gegensatz zu *cis*-Nicht-Prolinpeptidbindungen liegt in dem geringeren Energieunterschied der beiden Isomere. Bei Nicht-Prolinpeptidbindungen beträgt dieser etwa 2,4 kcal/mol [125], wohingegen er bei Prolinpeptidbindungen nur 0,5 kcal/mol ausmacht [126]. Die endgültige Konformation der jeweiligen Prolinpeptidbindungen im nativ gefalteten Protein hängt deshalb in erster Linie von den sterischen Anforderungen ihrer individuellen Umgebung ab. Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung existiert eine beträchtliche Rotationsbarriere von ca. 20 kcal/mol um die C–N-Bindung [127]. Diese Barriere ist verantwortlich für die langsame Isomerisierungsreaktion bei Raumtemperatur.

Der Einfluss der *trans*→*cis*-Isomerisierung der Proline an den Positionen 39 und 55 auf die Rückfaltungskinetik der RNase T1 ist schon von einigen Autoren mit unterschiedlichen Methoden untersucht worden [15, 21–23, 33, 44]. KIEFHABER *et al.* zeigten, dass die Prolin *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro 39 durch eine partielle Strukturbildung verlangsamt wird [44]. Mit Hilfe von *double-jump*-Experimenten konnte die Proteinfaltung von der Prolinisomerisierung separiert und dann UV-spektroskopisch detektiert werden [48]. Durch Anwendung von *stopped-flow*-Experimenten, die eine Rückfaltung der RNase T1 durch eine schlagartige Verdünnung der Denaturanzkonzentration induzierten, wurden bei 10 °C und pH 8 für Pro 39 und Pro 55

trans→*cis*-Relaxationszeiten von 3000 s und 500 s ermittelt [22]. Bei einer Verringerung des pH-Wertes auf pH 5 stieg die Relaxationszeit für Pro 39 auf 7000 s während sie für Pro 55 auf 250 s sank [22]. Abbildung 6.3 macht deutlich, welche strukturellen Veränderungen die Prolinomerisierung mit sich bringt. Da es sich hierbei um eine sehr langsame Reaktion handelt, sollte ihr Einfluss auf die Schwingungsspektren, insbesondere der von Pro 39, in einer späten Phase der Rückfaltung durch einen direkten Vergleich der zeitaufgelösten Differenzspektren von unmarkierter und ^{13}C -markierter RNase T1 detektiert werden können.

In Kapitel 5.4 sind die Ergebnisse der Temperatursprungexperimente der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1 von 65 °C auf 10, 20 und 45 °C dokumentiert. FTIR-spektroskopische Untersuchungen an der RNase T1 und einiger Varianten haben bereits gezeigt, dass die RNase T1 bei 45 °C sehr viel schneller ihre native Struktur erreicht als bei 20 °C [23, 47]. Zum ersten Mal wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Rückfaltungskinetiken bei einer Rückfaltungstemperatur von 10 °C untersucht.

6.2.3.1 Diskussion der Rückfaltung von unmarkierter und ^{13}C -markierter RNase T1 bei unterschiedlichen Rückfaltungstemperaturen

Aus den Differenzspektren (Abbildungen 5.14, 5.15 und 5.16 auf den Seiten 75 bis 77) wurden die Intensitätsverläufe einiger struktursensitiver Markerbanden ausgelesen. Diese Rückfaltungskinetiken der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1 bei den jeweiligen Rückfaltungstemperaturen (Abbildung 5.17 auf Seite 79) zeigen erwartungsgemäß einen qualitativ ähnlichen Verlauf und deuten deshalb bereits darauf hin, dass die Isotopenmarkierung keinen Einfluss auf die Faltungskinetik der RNase T1 hat. Aus Abbildung 5.17 ist schnell ersichtlich, dass die Intensitätsverläufe der struktursensitiven Markerbanden stark von den jeweiligen Rückfaltungstemperaturen abhängig sind. Abbildung 6.4 auf der nächsten Seite zeigt exemplarisch die ersten vier Minuten der Temperatursprungexperimente mit unmarkierter RNase T1 von 65 °C auf 10, 20 und 45 °C anhand des Verlaufs der struktursensitiven Markerbande bei 1626 cm^{-1} . Es ist offensichtlich, dass sich bei einer Rückfaltungstemperatur von 10 °C in den ersten 5 Sekunden der Rückfaltung viel mehr Struktur bildet als bei 20 und 45 °C. Nach ca. 5 Sekunden werden dann die Rückfaltungsgeschwindigkeiten bei 10 und 20 °C sehr viel geringer. Bereits nach einer halben Minute „überholt“ der Rückfaltungsprozess bei 45 °C den bei 20 und nach weniger als einer Minute den bei 10 °C. Nach nur vier Minuten ist die Rückfaltung bei 45 so gut wie abgeschlossen. Bei einer Rückfaltungstemperatur von 10 bzw. 20 °C dauert die Faltung noch mindestens eine halbe Stunde an (Abbildung 5.17). Des Weiteren zeigt Abbildung 6.4, dass diese letzte, geschwindigkeitsbestimmende Phase der Strukturbildung bei einer Rückfaltungstemperatur von 10 °C langsamer abläuft als bei 20 °C.

Betrachtet man nun die anderen Intensitätsverläufe in Abbildung 5.17, so stellt man auch hier fest, dass sich bei den niedrigen Rückfaltungstemperaturen nach einer ersten Faltungsphase, in der viel Struktur gebildet wird, eine sehr langsame weitere Phase anschließt. Allgemein kann man sagen, dass je niedriger die Temperatur ist, sich umso mehr Struktur zu Beginn der Rückfaltung bildet, die zweite Phase der

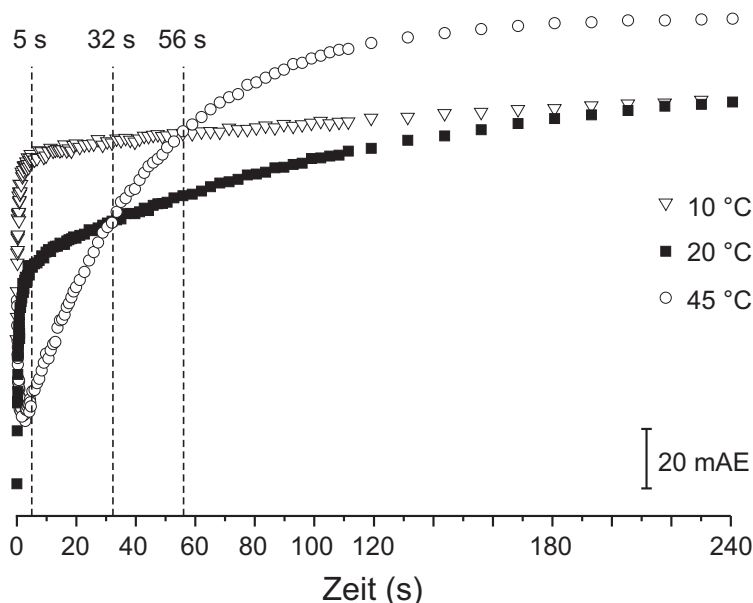


Abbildung 6.4: Intensitätsverläufe der Markerbande bei 1626 cm^{-1} von unmarkierter RNase T1 nach Temperatursprüngen von 65 °C auf 10 , 20 und 45 °C .

Rückfaltung aber umso langsamer ist. Demnach verläuft diese langsame Phase bei 20 °C schneller als bei 10 °C . Offensichtlich verläuft sie bei 45 °C so schnell, dass sie nicht mehr den „Flaschenhals“ im Rückfaltungsprozess der Proteine darstellt.

Diese Tatsache wird unterstützt durch Tabelle 5.3 auf Seite 80. Die qualitativen Beobachtungen der Rückfaltungsverläufe bei hohen und niedrigen Temperaturen werden hier quantitativ in Form von Zeitkonstanten und den dazugehörigen Amplituden wiederspiegelt.⁸ Tabelle 5.3 zeigt, dass bei 45 °C die Rückfaltung mit einer einfacheren und schnelleren Kinetik erfolgt als bei 10 oder 20 °C . Außerdem belegt sie in Analogie zu Abbildung 6.4, dass sich in der ersten aufgelösten kinetischen Phase bei 10 °C mehr Struktur bildet als bei 20 °C .

Nach Auslösung der Rückfaltung falten nicht alle RNase T1-Moleküle mit derselben Geschwindigkeit in den nativen Zustand zurück. Eine kleine Fraktion der Proteine ($3,5\%$) nimmt schon innerhalb der experimentellen Totzeit die native Struktur an [33] (siehe Abbildung 6.5 auf der nächsten Seite). Hierbei handelt es sich um die Moleküle, die bereits beide Proline in der „richtigen“ *cis*-Konformation haben, obwohl das Gleichgewicht nach der Entfaltung weitestgehend auf Seiten der *trans*-Konformation liegt. Weitere, parallele Faltungswege ergeben sich für die restlichen

⁸Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass sich der gesamte Prozess der Proteinerückfaltung aus sehr vielen parallelen Faltungswegen zusammensetzt, die unterschiedlich popularisiert sind. Insbesondere bei niedrigen Rückfaltungstemperaturen stellt sich die Proteinfaltung deshalb sehr komplex dar. Sicherlich sind drei aufgelöste Exponentialfunktionen zu wenig, um sie detailliert zu beschreiben. Aus diesem Grunde kann eine Interpretation der tatsächlichen Faltungsereignisse auf molekularer Ebene in den einzelnen, aufgelösten Phasen nur mit größter Vorsicht erfolgen [47].

6.2 FTIR-spektroskopische Strukturuntersuchungen

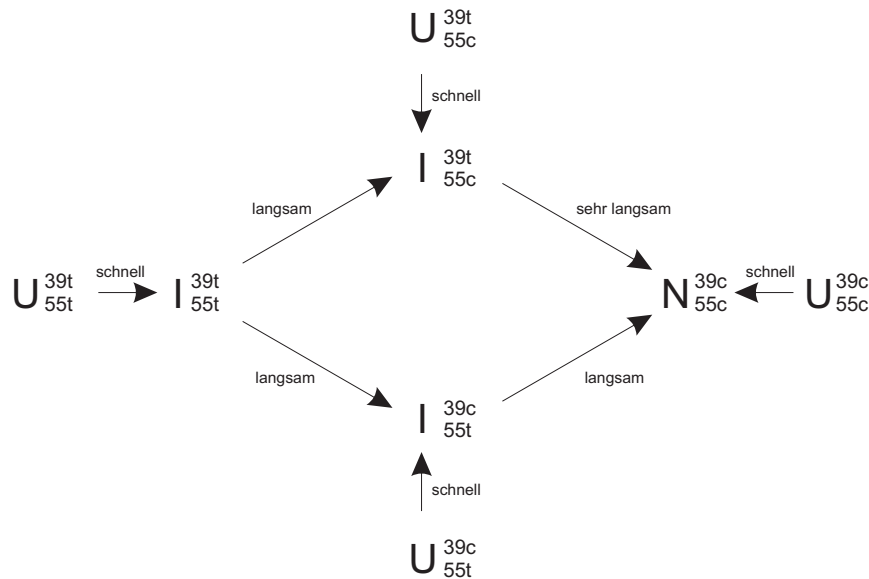


Abbildung 6.5: Faltungswege der RNase T1 (nach [48]). U bezeichnet entfaltete Moleküle der RNase T1, I Intermediatstrukturen und N nativ gefaltete Moleküle. t (*trans*) und c (*cis*) bezeichnen die jeweiligen Konformationen der Proline an den Positionen 39 und 55.

96,5 % der entfalteten Moleküle, in denen entweder eines der beiden Proline die *cis*-Konformation einnimmt oder beide Proline die *trans*-Konformation einnehmen. Insgesamt ergeben sich so vier parallele Faltungswege, von denen einer sehr schnell abläuft und die anderen durch eine oder zwei langsame Prolinisomerisierungsreaktionen beeinflusst werden [33].⁹

Die Proteinfaltung ist, ebenso wie die Prolinisomerisierung, von der Temperatur abhängig. Die native Struktur wird hauptsächlich durch unpolare Gruppen (VAN-DEER-WAALS-Wechselwirkungen) und hydrophobe Effekte stabilisiert [24]. Aus diesem Grund kollabieren unter nativen Rückfaltungsbedingungen in einer sehr schnellen Faltungsphase alle hydrophoben Gruppen ins Innere des Proteins und entziehen sich somit den Lösemittelmolekülen. Während am Schmelzpunkt des Proteins der native Zustand und denaturierte Zustände dieselbe freie Energie besitzen, nimmt diese mit abnehmender Temperatur für die native Struktur ab [24]. Bei niedrigen Rückfaltungstemperaturen bildet sich kurz nach dem Auslösen der Rückfaltung durch das konzertierte Zurückziehen aller hydrophoben Gruppen in den Proteinkern mehr Struktur als bei höheren Temperaturen. In dieser sehr frühen Phase der Rückfaltung entspricht die Anzahl der nativen Kontakte jedoch eher einem denaturierten Zustand als dem nativen Zustand [24], dennoch haben diese Übergangszustände eine geringere freie Energie als die entfaltete Polypeptidkette. Weil jedoch die native Struktur

⁹Um die Sache nicht weiter zu verkomplizieren, bleiben die sehr kleinen Fraktionen von Molekülen, in denen sich im entfalteten Zustand Pro60 und Pro73 in der *cis*-Konformation befinden, unberücksichtigt.

6 Diskussion

die niedrigste freie Energie hat, schreitet die Rückfaltung bis zum Erreichen dieser Struktur fort. Dieser Prozess lässt sich anhand des Faltungsmodells von DILL *et al.* verdeutlichen [10]. Demnach stellt sich die Energieoberfläche eines Faltungstrichters (Abbildung 6.6) bei niedrigen Rückfaltungstemperaturen als relativ steil und „rau“ dar. Bis zum Erreichen ihrer nativen Struktur am unteren Rand des Trichters können

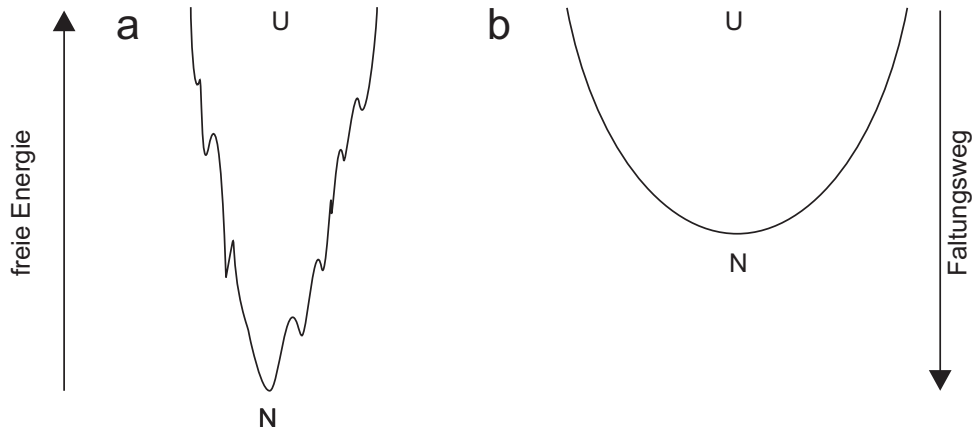


Abbildung 6.6: Schematischer Querschnitt durch einen Faltungstrichter bei niedriger Rückfaltungstemperatur (a) und bei hoher Rückfaltungstemperatur (b). Am oberen Rand des Trichters befinden sich die Proteine in denaturierten Zuständen U. Am Trichterboden befinden sie sich im Zustand der geringsten freien Energie – im nativen Zustand N (nach [10]).

die Proteine als Intermediatstrukturen vorübergehend in Nebenminima *getrapped* werden.

Die sehr schnellen Phasen im Rückfaltungsprozess der RNase T1 sind demnach stark von der Rückfaltungstemperatur abhängig und Überlagerungen aus zwei voneinander unabhängigen Prozessen, nämlich:

- einer kleinen Fraktion von Molekülen mit beiden Prolinen in der „richtigen“ *cis*-Konformation, die im Millisekundenbereich in die native Struktur zurückfalten und
- einer Hauptfraktion von Molekülen mit einem oder beiden Prolinen in der „falschen“ *trans*-Konformation, die im Millisekunden- bis Sekundenbereich Intermediatstrukturen bilden.

Man muss die Kinetik der Faltung und der Prolinisomerisierung getrennt voneinander betrachten, weil jede von ihnen einen eigenen Beitrag bzw. eigene Beiträge zur Gesamtrückfaltungskinetik der RNase T1 beisteuert. Weiter erschwert wird die Diskussion der Proteinfaltung dadurch, dass die Faltung und die Prolinisomerisierung miteinander koppeln können [19, 20]. Die Prolinisomerisierung wird viel stärker von der Temperatur beeinflusst als die Proteinfaltung [48]. Aus diesem Grund ist

zu erwarten, dass die Prolinomerisierung bei 10°C sehr viel langsamer verläuft als bei 20 oder 45°C. Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt wurde, existieren im entfalteten Zustand Molekülpopulationen mit unterschiedlichen Prolinkonformationen. Dieser Umstand führt aufgrund vieler möglicher Kopplungen zu unterschiedlichen Rückfaltungskinetiken, die einander überlagern und sich deshalb nicht unter den Versuchsbedingungen im Rahmen dieser Arbeit voneinander trennen lassen.¹⁰

Die Auswirkungen der Kopplungen auf die experimentell beobachtbaren Kinetiken hängen stark von den Geschwindigkeiten der Prolinomerisierungen und der Proteinfaltung ab. So kann die schnellste beobachtbare Phase in der Rückfaltungskinetik nur dann mit der Proteinfaltung assoziiert werden, wenn diese sehr viel schneller abläuft als die Prolinomerisierung [19, 20]. Dies ist bei den Rückfaltungskinetiken bei 10 und 20°C der Fall. Die langsame Phase ist dann eine Überlagerung der Isomerisierungsreaktionen von Pro 39 und Pro 55 unterschiedlich starker Molekülpopulationen auf verschiedenen parallelen Rückfaltungswegen. Die starke Temperaturabhängigkeit der Prolinomerisierungen wird auch anhand der Intensitätsplots in den Abbildungen 6.4 und 5.17 deutlich. Nach einer sehr schnellen Phase, in der viel Struktur gebildet wird, schließen sich langsame Phasen an, die mit den Prolinomerisierungen assoziiert sind [23, 47]. Die Temperatursprungexperimente bei den Rückfaltungstemperaturen von 10 und 20°C zeigen eindeutig, dass diese langsamen Phasen bei 20°C beschleunigt sind.

Das Verhältnis der Geschwindigkeiten von Proteinfaltung und Prolinomerisierung ist bei den Temperatursprungexperimenten mit einer Rückfaltungstemperatur von 45°C offensichtlich anders als bei den Experimenten mit niedrigen Rückfaltungstemperaturen. Übergangszustände mit nicht nativer Konformation sind bei hohen Temperaturen destabilisiert. Nach dem Faltungsmodell von DILL *et al.* gestaltet sich die Energieoberfläche des Faltungstrichters nun sehr viel flacher, als bei stark stabilisierenden Temperaturen [10]. Wie in Abbildung 6.6 auf der vorherigen Seite deutlich zu erkennen ist fehlen Energieminima, in denen Intermediatzustände popularisiert werden können, vollkommen – der Faltungstrichter hat eine glatte Oberfläche. Hinzu kommt, dass die Prolinomerisierung aufgrund der höheren Energie nun um ein vielfaches beschleunigt ist. Dies machen auch die Intensitätskurvenverläufe in Abbildung 5.17 auf Seite 79 deutlich. Sie zeigen einen apparenten Zweizustandsübergang an. Eingehende kinetische Untersuchungen an der RNase T1 und einigen Varianten haben gezeigt, dass dieses Phänomen beobachtet wird, wenn die Prolinomerisierungsgeschwindigkeit gleich schnell oder viel schneller ist als die Proteinfaltung [19, 20].

Das unterschiedliche Rückfaltungsverhalten der RNase T1 bei 10, 20 und 45°C wird auch durch die Differenzspektren zwischen diskreten Zeitintervallen deutlich (Abbildungen 5.18 bis 5.23 auf den Seiten 82 bis 87). Das flache, glatte Energieprofil des Rückfaltungstrichters bei 45°C (Abbildung 6.6 a) wird durch die diskreten Differenzspektren 5.22 und 5.23 auf den Seiten 86 und 87 widerspiegelt. Die Differenzspektren zeigen nach einer kurzen Phase, in der keine Struktur gebildet wird, einen ko-

¹⁰Dies konnte jedoch bereits unter Anwendung anderer Versuchsbedingungen und Messtechniken erreicht werden. Einen guten Übersichtsartikel liefert [48].

operativen Verlauf. Im Gegensatz dazu zeigen die entsprechenden Spektren bei den Rückfaltungstemperaturen von 10 und 20 °C (Abbildungen 5.18 bis 5.21 auf den Seiten 82 bis 85) zu Beginn der Rückfaltung stark fluktuierende Intensitätsverhältnisse, die das „rauhe“ Energieprofil des Faltungstrichters widerspiegeln. Im weiteren Verlauf wird auch bei 10 und 20 °C die Rückfaltung zunehmend kooperativ.

6.2.3.2 Einfluss der Prolinisomerisierung auf die zeitaufgelösten Schwingungsspektren der unmarkierten und isotopenmarkierten RNase T1

Die im vorherigen Kapitel durgeführte FTIR-spektroskopische Analyse der Rückfaltungskinetiken von unmarkierter und ^{13}C -markierter RNase T1 anhand ausgewählter struktursensitiver Markerbanden konnte keine Informationen liefern, die direkt auf Prolinisomerisierungsreaktionen während der Proteinrückfaltung hindeuten. Es ist klar ersichtlich, dass die durch die Isomerisierungen der isotopenmarkierten Proline hervorgerufenen Auswirkungen auf die zeitaufgelösten Schwingungsspektren wahrscheinlich sehr viel kleiner sind als die bei den statischen Messungen detektierten Unterschiede. Während bei diesen vier ^{13}C -Atome zu den spektralen Differenzen zwischen den beiden Varianten führen, sind nur zwei markierte Proline unmittelbar an den Isomerisierungsreaktionen beteiligt, nämlich Pro 39 und Pro 55. Hinzu kommt, wie bereits weiter oben erwähnt wurde, dass nicht beide Proline mit derselben Kinetik isomerisieren. Für die Temperatursprungexperimente im Rahmen dieser Arbeit haben die unterschiedlichen Abklingzeiten für Pro 39 und Pro 55 auf dem langsameren der beiden parallelen Faltungswege, den ungefähr die Hälfte der Moleküle bestreitet, für die Spektrenauswertung folgende Konsequenzen:¹¹

- Die Temperatursprungexperimente wurden bei pH 7,1 durchgeführt. Dies bedeutet, die Ergebnisse von UV-Experimenten zugrundelegend [48], für die Isomerisierung von Pro 39 eine Abklingzeit zwischen 3000 und 7000 s und für Pro 55 eine Abklingzeit zwischen 250 und 500 s bei 10 °C. Folglich ist bei einer Rückfaltungstemperatur von 10 °C die Abklingzeit für Pro 39 leider viel länger als die im Rahmen dieser Arbeit realisierte Messzeit von 30 Minuten. Hinzu kommt, dass sich die Abklingzeit für die Isomerisierung von Pro 55 nicht von den Isomerisierungsreaktionen des schnelleren Faltungsweges trennen lässt.
- Bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C sollte die Isomerisierung von Pro 39 aufgrund der höheren Temperatur gegenüber den Messungen bei 10 °C beschleunigt sein und deshalb zum größten Teil innerhalb der Messzeit beobachtet werden können. Die Isomerisierung von Pro 55 wird bereits in den ersten Sekunden bis Minuten des Experimentes beendet sein und lässt sich deshalb sehr gut von der Isomerisierung von Pro 39 separieren.

¹¹Auf dem schnelleren der beiden parallelen Faltungswege sind die Isomerisierungen von beiden Prolinen sowohl bei pH 8 als auch bei pH 5 schon nach 600 bis 700 s abgeschlossen [48].

6.2 FTIR-spektroskopische Strukturuntersuchungen

- Bei einer Rückfaltungstemperatur von 45 °C haben bereits vorhergehende FTIR-spektroskopische Rückfaltungsstudien gezeigt, dass die Isomerisierungen von beiden Prolinen so stark beschleunigt sind, dass bereits innerhalb weniger Sekunden der gesamte Rückfaltungsprozess abgeschlossen ist [23, 47].

Man kann hieraus also folgern, dass in den Temperatursprungexperimenten bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C die Isomerisierung von Pro 39 auf dem langsameren Faltungsweg sowohl von der Isomerisierung von Pro 55 als auch von den Isomerisierungen von Pro 39 und Pro 55 auf dem schnelleren der beiden parallelen Faltungswege zeitlich separiert ist. Aus diesem Grund lassen sich spektrale Unterschiede in den Rückfaltungskinetiken der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1, die besonders gegen Ende der Temperatursprungexperimente von 65 nach 20 °C auftreten, spezifisch mit den Isomerisierungen der Pro 39-Moleküle in der Probe assoziieren.

Die Abbildungen 6.7 und 6.8 auf den Seiten 114 und 115 zeigen noch einmal die Differenzspektren zwischen je zwei Messpunkten bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C. Im Bereich von 1500 bis 1650 cm^{-1} sind die bereits bekannten struktursensitiven Markerbanden, deren Kinetik im vorherigen Kapitel diskutiert wurde, für beide Varianten mit den entsprechenden Wellenzahlen gekennzeichnet. In diesem spektralen Fenster sind keine Unterschiede im Verlauf der Rückfaltung zwischen der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1 zu erkennen, die sich mit einer Prolinomerisierungsreaktion assoziieren lassen. Anders verhält es sich bei einer näheren Betrachtung des Bereichs von 1660 bis 1690 cm^{-1} :

Zunächst nimmt bei beiden RNase T1-Varianten die Intensität, also die Strukturbildung, der hochfrequenten β -Faltblattbande bei 1678 cm^{-1} mit fortschreitender Messzeit ab. Bei der ^{13}C -markierten RNase T1 ist in den letzten 800 s der Messung sogar eine negative Differenzbande, also eine Rückbildung von β -Faltblattstruktur festzustellen. In Abschnitt 6.2 wurde die Schulter bei 1687 cm^{-1} im Spektrum der unmarkierten RNase T1 den Absorptionen von Turnstrukturen zugewiesen. In Abbildung 6.7 kann nun die Bildung dieser Turnstrukturen nachvollzogen werden. Die Differenzspektren der ^{13}C -markierten RNase T1 in Abbildung 6.8 zeigen an dieser Stelle keine Intensität. Hingegen lässt sich im selben Zeitfenster bei 1669 cm^{-1} die Bildung einer Bande erkennen. Auch in dieser spektralen Region absorbieren Turnstrukturen.

Wie bereits oben erwähnt wurde, wird die letzte Phase der Proteinrückfaltung bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C durch den Isomerisierungsprozess von Pro 39 dominiert. Hieraus lässt sich deshalb ableiten, dass diese spektralen Änderungen im Bereich von 1660 bis 1690 cm^{-1} allein durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro 39 hervorgerufen werden. Diese Erkenntnis wird durch folgende Punkte gestützt:

- Pro 39 ist benachbart zu einem π -Turn, der von den Aminosäuren 33 bis 38 und zu einem β -Turn, der von den Aminosäuren 34 bis 37 gebildet wird. Wie bereits in Abschnitt 6.2.1.2 diskutiert wurde, hat TDC auf die typischen Absorptionsfrequenzen von Turnstrukturen einen starken Einfluss. Eine Isomerisierung von Pro 39 kann deshalb das benachbarte Turnsystem aufgrund einer

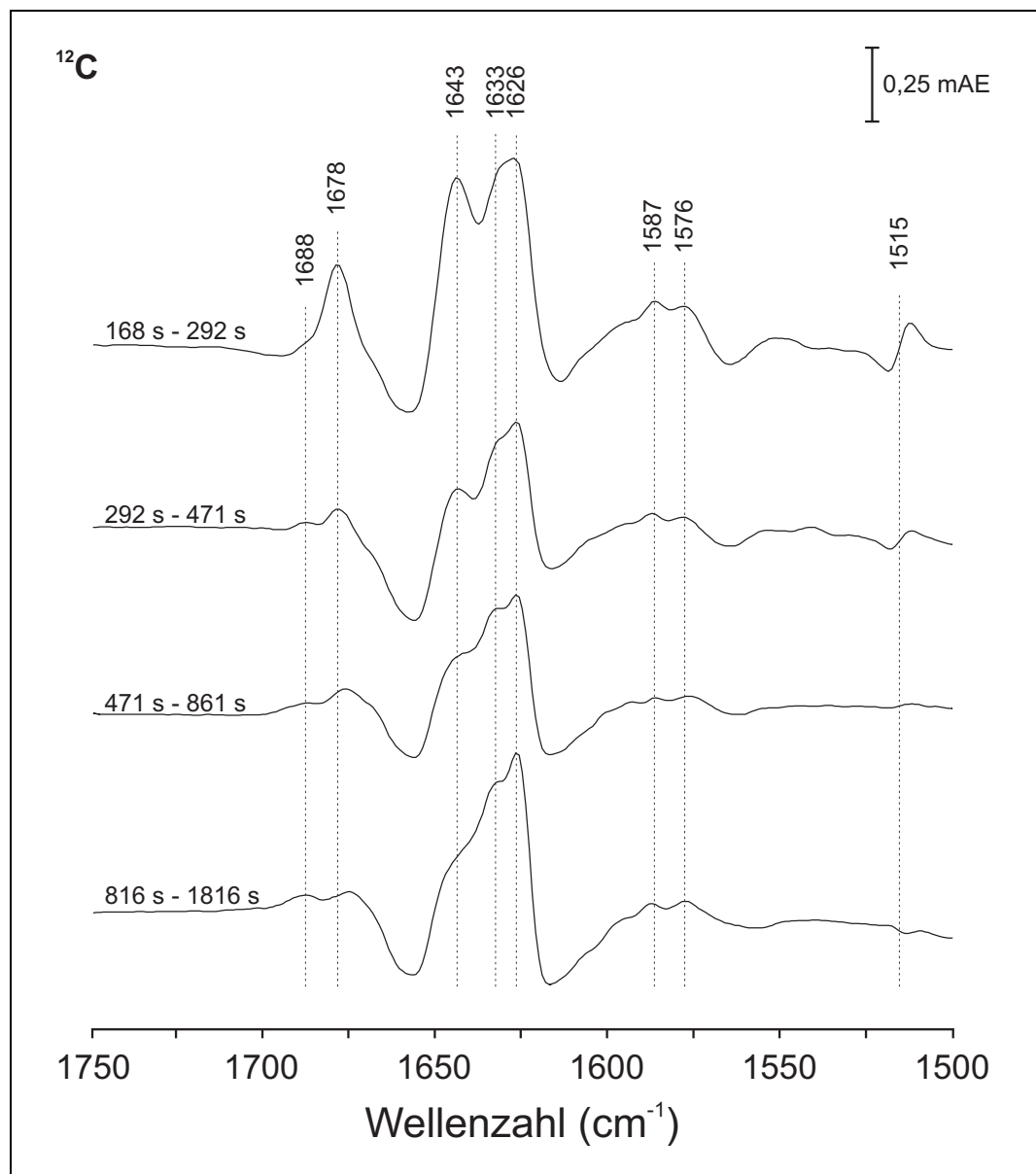


Abbildung 6.7: Späte Ereignisse während der Rückfaltung von unmarkierter RNAse T1 bei einer Rückfaltungstemperatur von 20°C.

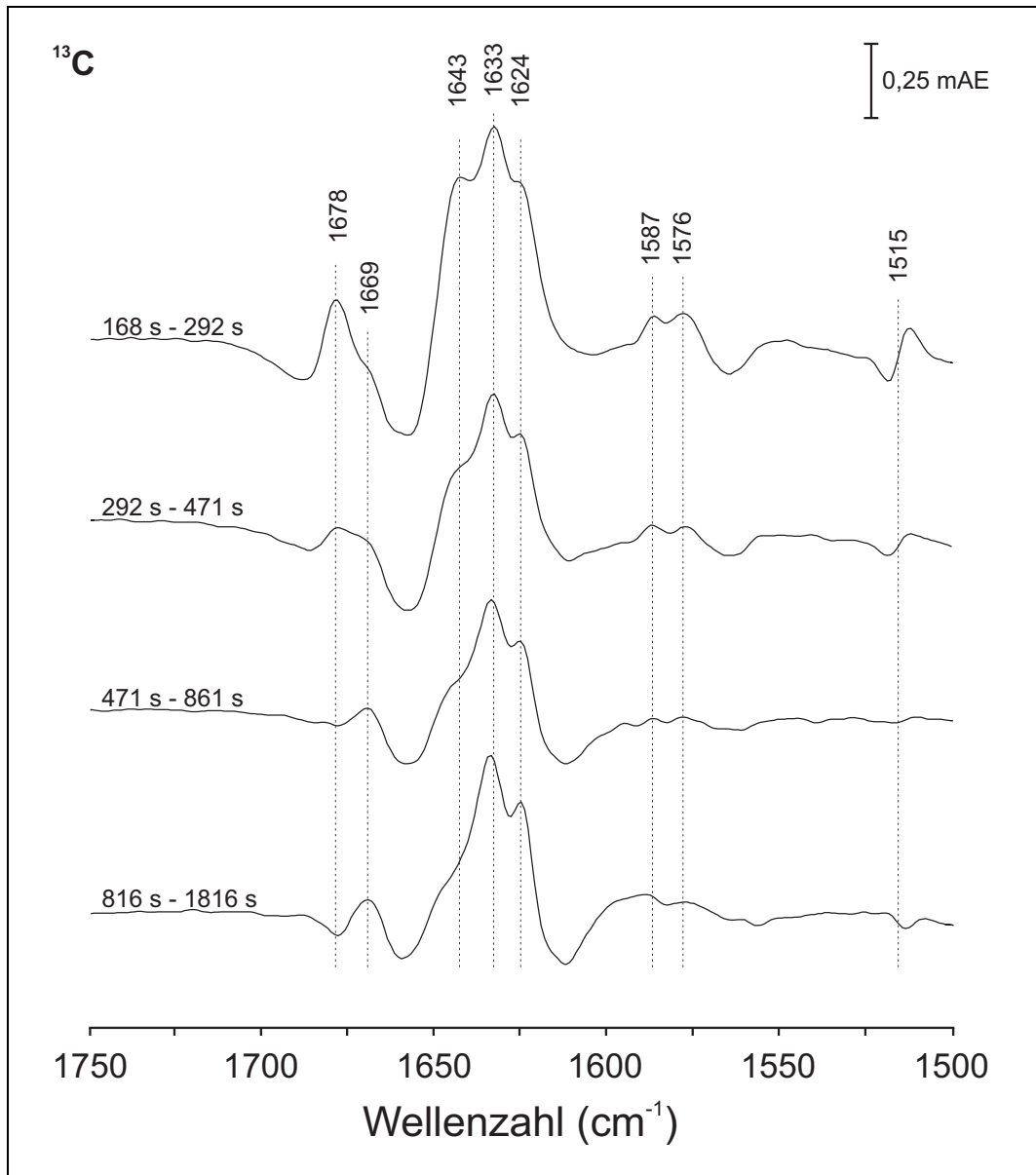


Abbildung 6.8: Späte Ereignisse während der Rückfaltung von ¹³C-markierter RNAse T1 bei einer Rückfaltungstemperatur von 20°C.

veränderten räumlichen Ausrichtung der C=O-Gruppe *via* TDC beeinflussen und seine Absorptionsfrequenz verändern. Betrachtet man nun noch einmal das FSD-Differenzspektrum in Abbildung 5.9 auf Seite 68, das aus den vollständig rückgefalteten Proteinen generiert wurde, so kann man auch hier bei 1687 cm^{-1} eine negative und bei 1670 cm^{-1} eine positive Intensität beobachten. Die Ursache dieser spektralen Differenzen als Konsequenz der Isotopenmarkierungen wurde bereits in Kapitel 6.2.1.2 diskutiert.

- Bei einer Rückfaltungstemperatur von 10°C ist in den ersten 30 Minuten der Rückfaltung bei 1688 und 1669 cm^{-1} kaum eine Intensitätszunahme zu erkennen (siehe Abbildungen 5.18 und 5.19 auf den Seiten 82 und 83). Wie bereits oben erwähnt, läuft die Prolinisomerisierung bei 10°C sehr viel langsamer ab als bei 20°C und kann während der Messzeit nicht detektiert werden. Eine längere Messzeit würde sicherlich dazu beitragen, dass die Isomerisierung von Pro 39 auch bei niedrigen Temperaturen beobachtet werden kann.
- Bei einer Rückfaltungstemperatur von 45°C ist die Kinetik des gesamten Faltungsprozesses augenscheinlich sehr stark vereinfacht (siehe Abbildungen 5.22 und 5.23 auf den Seiten 86 und 87)). Die Faltung und die Prolinisomerisierung sind so sehr beschleunigt, dass sich die einzelnen Phasen nicht mehr auflösen lassen. Schon nach kurzer Zeit ist die Rückfaltung abgeschlossen und die beiden Proteinvarianten sind in ihre native Struktur zurückgefaltet.

Interessant ist die Feststellung, dass nach einer kurzen Anfangsphase mit fluktuierenden Intensitätsverhältnissen der Faltungsprozess bei 10 und 20°C über einen längeren Zeitraum kooperativ verläuft. Man kann daraus ableiten, dass neben den Turnstrukturen auch noch in anderen Bereichen der Proteinstruktur Konsolidierungen mit der *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro 39 synchronisiert sind, wie eindeutig an den Seitengruppenabsorptionen und den Banden bei 1624 , 1626 und 1633 cm^{-1} bei beiden Proteinvarianten festgestellt werden kann. Diese Entdeckung wurde auch schon bei einer 2D-spektroskopischen NMR-Untersuchung der RNase T1 S54G/P55N-Variante in einem *stopped-flow*-Rückfaltungsexperiment gemacht [32]. Weil in der S54G/P55N-Variante Pro 55 substituiert wurde, kann deshalb die langsamste Phase während der Proteinrückfaltung nur mit einer Isomerisierung von Pro 39 assoziiert sein [47]. Die zeitaufgelösten Rückfaltungsexperimente im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Isomerisierung nun zum ersten Mal IR-spektroskopisch visualisieren.