

**Das „Leucine-Rich Repeat“ im Invasionsprotein Internalin B:
Stabilität und Faltung eines Solenoidproteins**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker
Alexander Freiberg

Potsdam
November 2004

Für meine Mutter

Zusammenfassung

Für das Verständnis der Strukturbildung bei Proteinen ist es wichtig, allgemein geltende Prinzipien der Stabilität und Faltung zu verstehen. Sehr viel Arbeit wurde bisher in die Erörterung von Gesetzmäßigkeiten zu den Faltungseigenschaften von globulären Proteinen investiert. Die große Proteinklasse der solenoiden Proteine, zu denen z. B. *leucine-rich repeat*- (LRR-), Ankyrin- oder β -Helix-Proteine gehören, wurde dahingegen noch wenig untersucht. Die Proteine dieser Klasse sind durch einen stapelförmigen Aufbau von sich wiederholenden typischen Sequenzeinheiten gekennzeichnet, was in der Ausbildung einer elongierten Tertiärstruktur resultiert. Im Vergleich zu globulären Proteinen erfolgt die Stabilisierung durch eher kurzreichende und lokale Wechselwirkungen. In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die Stabilität und Faltung eines LRR-Proteins mittels verschiedener biophysikalischer Methoden zu charakterisieren. Als Untersuchungsobjekt diente die für die Infektion ausreichende zentrale LRR-Domäne des Invasionsproteins Internalin B (InlB₂₄₁) des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* (Marino *et al.*, 1999). Diese Domäne ist N-terminal von einer kleinen α -helikalen Cap-Domäne flankiert. Des Weiteren sollten die Integrität und die Stabilitäts- und Faltungseigenschaften der sogenannten Internalin-Superdomäne (InlB₃₂₁*) untersucht werden (Schubert *et al.*, 2001). Hierbei handelt es sich um die bei allen Mitgliedern der Internalinfamilie vorkommende Superdomäne, welche aus einer direkten Fusion des C-terminalen Endes der LRR-Domäne mit einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne besteht. Beide Konstrukte liegen in Lösung als monomere Proteine mit einer ungefähren Molekularmasse von 23.3 (InlB₂₄₁) und 32.2 kDa (InlB₃₂₁*) vor. Dies erlaubte die rekombinante Expression dieser zwei Proteine und einer Tryptophanmutante des InlB₃₂₁* (InlB₃₂₁*W124S) als Fusionsproteine mit Glutathion-S-transferase im Cytoplasma von *E. coli*. Die spektroskopischen Eigenschaften der zwei Konstrukte reflektierten die Erwartungen basierend auf der Kristallstruktur (Marino *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2001). Die Circular dichroismus-Spektren beider Varianten, gemessen im fernen ultravioletten (UV) Bereich, sind sich sehr ähnlich und besitzen ein charakteristisches Minimum bei ~200 nm, welches möglicherweise aus dem hohen 3_{10} -Helix-Gehalt in der LRR-Domäne resultiert.

Von beiden Konstrukten konnte eine vollständige thermodynamische Charakterisierung, mit Hilfe von chemisch- bzw. thermisch-induzierten Faltungs- und Entfaltungsübergängen durchgeführt werden. Sowohl InlB₂₄₁ als auch InlB₃₂₁* zeigen einen reversiblen und kooperativen Verlauf der chemisch-induzierten Gleichgewichtsübergänge, was die Anwendung eines Zweizustandsmodells zur Beschreibung der Daten erlaubte. Die zusätzliche Immunglobulin-ähnliche Domäne im InlB₃₂₁* resultierte im Vergleich zum InlB₂₄₁ in einer Erhöhung der freien Enthalpie der Entfaltung ΔG_U ($8.8 \pm 0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ im Vergleich zu $4.7 \pm 0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ bei 20 °C und pH 7.5). Diese Stabilitätszunahme äußerte sich sowohl in einer Verschiebung des Übergangsmittelpunktes zu höheren

Guanidiniumchlorid-Konzentrationen als auch in einer Erhöhung der Kooperativität des Gleichgewichtsübergangs ($9.7 \pm 0.2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ im Vergleich zu $7.1 \pm 0.4 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ bei 20°C bei pH 7.5). Diese Beobachtungen zeigen dass die einzelnen Sequenzeinheiten der LRR-Domäne nicht unabhängig voneinander falten und dass die Immunglobulin-ähnliche Domäne, obwohl sie nicht direkt mit dem Wirtszellrezeptor während der Invasion interagiert, eine kritische Rolle für die *in vivo* Stabilität des Internalin B spielt. Des weiteren spiegelt die Kooperativität des Übergangs die Integrität der Internalin-Superdomäne wieder und deutet darauf hin, dass bei beiden Proteinen keine Intermediate vorliegen.

Kinetische Messungen über Tryptophanfluoreszenz und Fern-UV Circular dichroismus deuteten auf die Existenz eines relativ stabilen Intermediates auf dem Faltungsweg der LRR-Domäne hin. Faltungskinetiken aus einem in pH 2 denaturierten Zustand zeigten ein reversibles Verhalten und verliefen über ein Intermediat. Eine Erhöhung der Salzkonzentration des sauer-denaturierten Proteins führte zu einer Kompaktierung der entfalteten Struktur und resultierte im Übergang zu einem alternativ gefalteten Zustand.

Bei der Internalin-Superdomäne deuteten kinetische Messungen des Fluoreszenz- und Fern-UV Circular dichroismus-Signals während der Entfaltung möglicherweise auf die Präsenz von zwei Prozessen hin. Der erste langsame Entfaltungsprozess kurz nach dem Übergangsmittelpunkt bei 0.9 M Guanidiniumchlorid zeigte eine starke Abhängigkeit von der Temperatur, während der zweite schnellere Prozess der Entfaltung stärker von der Guanidiniumchlorid-Konzentration abhing. Renaturierungskinetiken zeigten das Auftreten von mindestens einem Faltungsintermediat. Kinetische Daten aus Prolin-Doppelsprungexperimenten lieferten für die Erklärung der langsamen Faltungsphase zunächst keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Prolinisomerisierungsreaktion. Die vollständige Amplitude während der Renaturierung konnte nicht detektiert werden, weswegen von einer zweiten schnellen Phase im Submillisekundenbereich ausgegangen werden kann.

Abkürzungen und Formelzeichen

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ANS	8-Anilino-1-Naphthalensulfonsäure
AS	Aminosäure
Bicine	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glyzin
bzw.	beziehungsweise
cal	Kalorie (1 cal = 4.184 Joule)
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CHES	2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
Cm	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
Δ ASA	<i>accessible surface area</i> (Änderung der Oberflächenzugänglichkeit)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTT	1,4-Dithiothreit
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GdmCl	Guanidiniumchlorid
Gl.	Gleichung
GS	Glutathion-Sepharose
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
InlA	Internalin A
InlB	Internalin B
InlB ₂₄₈	Fragment des Internalin B bestehend aus der N-terminalen <i>Cap</i> -Domäne und der LRR-Domäne (Aminosäuren 30 bis 248)
InlB ₂₄₁	verkürztes Fragment von InlB ₂₄₈ (Aminosäuren 30 bis 241)

InlB ₃₂₁	Fragment des Internalin B bestehend aus N-terminaler <i>Cap</i> -Domäne, zentraler LRR-Domäne und Ig-ähnlicher Domäne (Aminosäuren 30 bis 321)
InlB ₃₂₁ *	Punktmutante des InlB ₃₂₁ , Cystein 242 gegen Serin ausgetauscht
InlB ₃₂₁ *W124S	Punktmutante des InlB ₃₂₁ *, Tryptophan 124 gegen Serin ausgetauscht
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LRR	<i>leucine-rich repeat</i> (Leucin-reiche Wiederholungssequenz)
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
MW	Molekularmasse
NaP	Natriumphosphat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Proteindatenbank)
Pefabloc SC	4-(2-Aminoethyl)-benzensulonylfluorid-hydrochlorid
psi	<i>pounds per square inch</i> (Pfund pro Quadratzoll)
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
U	<i>Units</i> (Enzymaktivität)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
(v/v)	Volumenanteil
(w/v)	Gewichtsanteil

Für Aminosäuren wurde entweder die Drei- bzw. Ein-Buchstaben Standardabkürzung verwendet.

Formelzeichen

c	mg ml^{-1}	Konzentration
C_m	M	Übergangsmittelpunkt
d	cm	Schichtdicke
k	s	Geschwindigkeitskonstante
m	$\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}$	Kooperativitätsmaß
t	s, min, h	Zeit
T	$^{\circ}\text{C}$	Temperatur
v	l	Volumen
ε	$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	molarer Extinktionskoeffizient
ΔC_p	$\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	Änderung der partiellen molaren Wärmekapazität
ΔG_U	kcal mol^{-1}	freie Enthalpie der Entfaltung
ΔH_{cal}	kcal mol^{-1}	kalorimetrisch bestimmte Enthalpieänderung
$\Delta H_{\text{v.H.}}$	kcal mol^{-1}	Enthalpieänderung bestimmt nach Privalov & Khechinashvili (1974)
λ	nm	Wellenlänge
Θ	grad	Elliptizität
$[\Theta]$	$\text{grad cm}^2 \text{dmol}^{-1}$	molare Elliptizität
$[\Theta]_{\text{MRW}}$	$\text{grad cm}^2 \text{dmol}^{-1}$	mittlere molare Elliptizität
τ	s	Relaxationszeit ($=1/k$)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungen und Formelzeichen	III
Inhaltsverzeichnis	VI

1. Einleitung

1.1 Das humanpathogene Bakterium <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2 Der Infektionszyklus und die Virulenzfaktoren von <i>L. monocytogenes</i>	2
1.3 Die Invasionsproteine von <i>L. monocytogenes</i>	4
1.3.1 Internalin aus <i>L. monocytogenes</i> und sein Rezeptor	4
1.3.2 Internalin B aus <i>L. monocytogenes</i> und seine Rezeptoren	6
1.4 Das Strukturmotiv der Internaline	8
1.5 LRR-Domänen als Module für die Interaktion bei Protein-Protein-Wechselwirkungen	11
1.6 Proteine mit repetitiven Sequenzen: Struktur, Funktion, Evolution und Design	14
1.7 Faltung und Stabilität von Proteinen	16
1.7.1 Faltungsprozesse und Intermediate	17
1.7.2 Modelle für die Proteinfaltung	18
1.7.3 Bestimmung von Stabilitätsparametern	19
1.8 Vergleich der Faltung von globulären und solenoiden Proteinen	20
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit	22

2. Material und Methoden

2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Standards und Kits	24
2.1.3 Enzyme und Proteine	24
2.1.4 Medien, Antibiotika und Puffer	24
2.1.5 Sonstiges Material	25
2.1.6 Geräte	25
2.1.7 Organismen	26
2.1.8 Plasmide	27
2.1.9 Oligodesoxynukleotide	27

2.2	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1	Kultivierung von Bakterien	28
2.2.2	Reinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	28
2.2.3	Ortsgerichtete Mutagenese	28
2.2.4	Sequenzierung von Plasmid-DNA	29
2.2.5	Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen	29
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.3	Proteinchemische Methoden	30
2.3.1	Produktion rekombinanter Fusionsproteine	30
2.3.1.1	Anzucht und Induktion von Bakterien	30
2.3.1.2	Zellaufschluss	31
2.3.1.3	Proteinreinigung	31
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.3.3	Proteinfärbung	32
2.3.3.1	<i>Coomassie</i> -Färbung	32
2.3.3.2	Silberfärbung	32
2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration und der Extinktionskoeffizienten	33
2.3.5	Proteintransfer auf Membranen	33
2.3.6	N-terminale Proteinsequenzierung	33
2.3.7	Titration von freien Thiolgruppen mit DTNB	34
2.4	Biophysikalische Methoden	34
2.4.1	Absorptionsspektroskopie	34
2.4.2	Fluoreszenzspektroskopie	34
2.4.2.1	Fluoreszenzspektren	35
2.4.2.2	Fluoreszenzkinetiken	35
2.4.2.3	<i>stopped-flow</i> -Experimente	35
2.4.2.4	ANS-Fluoreszenzspektroskopie	35
2.4.2.5	Fluoreszenzlöschung mittels Acrylamid	36
2.4.3	CD-Spektroskopie	36
2.4.3.1	Nah- und Fern-UV-CD-Spektren	36
2.4.3.2	Thermische Denaturierung	37
2.4.3.3	Fern-UV-CD-Kinetiken	38
2.4.3.4	<i>stopped-flow</i> -Experimente	38
2.4.4	Gleichgewichtsentfaltung und -rückfaltung	38
2.4.5	pH-Gleichgewichtsübergang	39
2.4.6	Sprungexperimente zur Charakterisierung des langsamen Faltungsschrittes	39
2.4.7	Refraktometrie	39

2.4.8	Massenspektrometrie	40
2.4.9	Analytische Ultrazentrifugation	40
2.4.10	Lichtstremessungen	40
2.4.11	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>	40
2.4.12	Mathematische Auswertung	41
2.4.12.1	Auswertung konformationeller Gleichgewichtsübergänge	41
2.4.12.2	Vorhersage thermodynamischer Parameter	43
2.4.12.3	Auswertung der Entfaltungs- und Faltungskinetiken	43
2.4.12.4	Auswertung der DSC-Messungen	44
2.4.12.5	Bestimmung der freien Enthalpie der Stabilisierung	44
3.	Ergebnisse und Diskussion	
3.1	Reinigung des rekombinanten Internalin B aus <i>Listeria monocytogenes</i>	46
3.2	Biophysikalische Charakterisierung der LRR- und Internalin-Domäne von Internalin B	47
3.2.1	UV-Absorptionsspektroskopie	49
3.2.2	CD-Spektroskopie	51
3.2.3	Fluoreszenzspektroskopie	56
3.3.	<i>In vitro</i> Faltung und thermodynamische Stabilität	58
3.3.1	Stabilität der LRR- und Internalin-Domäne	58
3.3.1.1	De- und Renaturierungsgleichgewichtsübergänge	58
3.3.1.2	Thermische Stabilität	63
3.3.1.3	Bestimmung der freien Enthalpie der Stabilisierung	66
3.3.1.4	Einfluss des pH-Wertes auf die Faltung	76
3.3.1.5	Bindung von Calcium an die N-terminale <i>Cap</i> -Domäne des InIB	78
3.3.2	Faltungsmechanismus der LRR- und Internalin-Domäne	81
3.3.2.1	Faltungs- und Entfaltungskinetiken der LRR-Domäne	81
3.3.2.2	Faltungs- und Entfaltungskinetiken der Internalin-Domäne	85
3.3.2.3	Bedeutung der <i>cis-trans</i> -Prolinisomerisierung	90
3.3.3	Charakterisierung eines im Säuren alternativ gefalteten Zustandes der LRR-Domäne des Internalin B	93
3.3.3.1	Spektroskopische Eigenschaften der LRR-Domäne im sauren pH-Bereich	93
3.3.3.2	Strukturelle Charakterisierung des alternativ gefalteten Zustandes	97
3.3.3.3	Stabilität und Faltung unter sauren Bedingungen	101
4.	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	106

5. Literaturverzeichnis _____ 112

6. Anhang _____ 123

Danksagung

1. Einleitung

1.1 Das humanpathogene Bakterium *Listeria monocytogenes*

Listerien sind Gram-positive, nicht-sporulierende, stäbchenförmige, fakultativ anaerobe Bakterien. Sie gehören zu den fakultativ intrazellulären Bakterien, was bedeutet, dass sie sowohl zum Wachstum außerhalb, als auch innerhalb von Wirtszellen befähigt sind. Die Gattung der Listerien umfasst sechs Arten (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. murrayi* und *L. ivanovii*), von denen jedoch nur die Spezies *L. monocytogenes* und die sehr seltene Art *L. ivanovii* human- und tierpathogen sind (Seeliger, 1984; Rocourt, 1988).

Listerien sind auf Pflanzen, in Böden und Gewässern zu finden, aber auch Tierprodukte können eine Kontamination durch Listerien aufweisen. *L. monocytogenes* kann beim Menschen die als Listeriose bezeichnete Infektion hervorrufen, welche meist durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel (wie z.B. Salate, Milchprodukte, Soßen und industriell produzierte Fertiggerichte) über den Gastrointestinaltrakt erfolgt. Sie gehören somit zu den enteroinvasiven Erregern von Lebensmittelinfektionen, gelten dabei jedoch als nicht darmpathogen. Neben der Fähigkeit die Darmwand zu überwinden, sind diese Gram-positiven Bakterien auch in der Lage, zwei weitere essentielle Barrieren im menschlichen Körper, nämlich die Blut-Hirn- und die Plazenta-Schranke, zu passieren. Bei immunkompetenten Patienten verläuft die Infektion oft nur sehr schwach und ähnelt eher dem Bild eines grippalen Infektes, da Makrophagen und Neutrophile die Erreger schnell beseitigen können. Anders hingegen ist der Fall bei Immunkompromittierten, also Personen mit T-Zell-Defekten, AIDS-Infizierten, Schwangeren, Säuglingen, Krebspatienten und älteren Menschen (Gellin & Broome, 1989; Lorber, 1997). Hier kann sich eine Listeriose als primäre Septikämie oder in diversen ZNS-Erkrankungen (wie Meningoenzephalitis, Meningitis, Hirnabszess oder Hirnstamm-enzephalitis) manifestieren. Eine Infektion während der Schwangerschaft kann zum Abort oder zur konnatalen Listeriose, d.h. zu einer Septikämie mit multiplen Abszessen und Granulomen in den verschiedensten Organen des Neugeborenen, führen. Die Mortalitätsrate bei schweren Listeriosen beträgt 10-40 %.

L. monocytogenes wird über die kontaminierte Nahrung aufgenommen und gelangt so in den Magen-Darm-Trakt. Im Darm angelangt, werden die Listerien relativ schnell in die Darmepithelzellen aufgenommen. Ist die Darmbarriere erst einmal überwunden, können sie über das Blut oder die Lymphe zur Leber, der Milz und anderen Organen gelangen, und nach Passage der Blut-Hirn-Schranke auch neuronales Gewebe infizieren.

Listerien besitzen die Fähigkeit, sich unter normalerweise sehr unphysiologischen Bedingungen zu vermehren. Diese Bedingungen, wie niedrige Temperaturen ($> 1^{\circ}\text{C}$), hohe Salzkonzentrationen ($> 10\%$), reduzierte Sauerstoffangebote und große pH-Bereiche (pH 4.4 – 9.4), finden im allgemeinen bei der Lagerung und Konservierung von Nahrungsmitteln Anwendung (Junttila *et al.*, 1988; Farber &

Peterkin, 1991; Schlech, 2000). Diese Eigenschaften machen das Bakterium zu einem gefährlichen Lebensmittelkeim und daher stellen sie für die Lebensmittelindustrie ein großes Problem dar.

1.2 Der Infektionszyklus und die Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*

Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes* zeichnet sich durch eine große Anzahl von Wechselwirkungen zwischen Komponenten der Wirtszelle und bakteriellen Virulenzfaktoren aus. Die Charakteristika dieser Interaktionen wurden auf zellulärer Ebene ausführlich untersucht und 1989 von Tilney und Portnoy erstmals beschrieben (Abb. 1.1). Den Beginn der Infektion durch *L. monocytogenes* stellt die Aufnahme des Bakteriums durch den Verzehr kontaminierter Nahrung dar. Das Bakterium wird zunächst von Makrophagen über den Prozess der Phagozytose aufgenommen, es besitzt aber auch die Fähigkeit bei natürlicherweise nicht-phagozytierenden Zellen, wie z. B. Darmepithelzellen, eine Phagozytose zu induzieren. Den initialen Invasionschritt bei der Etablierung der Infektion stellt die Adhäsion von *L. monocytogenes* an die Plasmamembran der Wirtszelle dar, wodurch die Bildung von Membranausstülpungen induziert wird, welche das Bakterium vollständig umschließen (Abb. 1.1A). Dieser primäre Schritt wird durch die beiden bakteriellen Virulenzfaktoren Internalin (InlA) und Internalin B (InlB) vermittelt (Gaillard *et al.*, 1991; Dramsi *et al.*, 1995; Lingnau *et al.*, 1995).

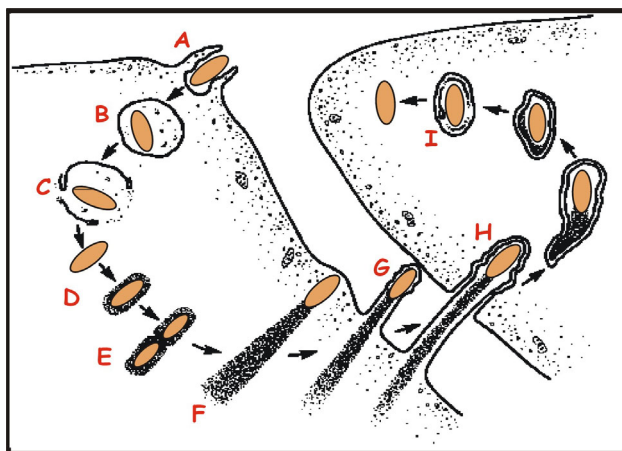


Abb. 1.1: Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

Schematische Darstellung des Infektionsverlaufes zwischen zwei benachbarten Darmepithelzellen. Die Erläuterungen zu den Schritten A bis I finden sich im Text. Die Abbildung wurde leicht abgeändert nach Tilney & Portnoy (1989).

Die Internalisierung der Listerien erfolgt nach dem Reißverschluss- (*zipper*-) Mechanismus, wobei die an der Bakterienoberfläche gebundenen Invasionsproteine die eine Reihe

der Zähne des Reißverschlusses und die Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle die korrespondierende andere Reihe bilden. Nach und nach binden die bakteriellen Ligandenmoleküle an die Rezeptormoleküle, wobei die Plasmamembran der Wirtszelle um die Bakterienzelle gestülpt wird, bis das Bakterium vollständig eingeschlossen ist. Die intrazelluläre Lokalisierung des Pathogens in der Wirtszelle bietet nicht nur Schutz vor dem Angriff des Immunsystems des Wirtes, sondern kann auch der Beginn der Ausbreitung in tieferes Gewebe oder sogar zur systemischen Dissemination sein. Nach der Internalisierung befindet sich *L. monocytogenes* innerhalb eines Phagosoms im Zytoplasma der Wirtszelle (Abb. 1.1B). Aus dieser primären Vakuole befreien sich die Listerien durch Sekretion einer Phosphatidylinositol (PI)-spezifischen Phospholipase C (PlcA) und des porenbildenden Bakterientoxins Listeriolysin O (LLO), welche die Membran lysieren (Abb. 1.1C) (Geoffroy *et al.*,

1987; Leimeister-Wächter & Chakraborty, 1989; Leimeister-Wächter *et al.*, 1991; Camilli *et al.*, 1993). Die Aktivität des LLO zeigt eine strikte Abhängigkeit vom pH-Wert (pH 5.5 bis 6) und ist somit auf das Kompartiment des Lysosoms begrenzt (Glomski *et al.*, 2002). Nach Freisetzung des Bakteriums in das Zytoplasma der Zelle wird die Aktivität stark reduziert.

Im Zytoplasma kommt es dann zur Vermehrung von *L. monocytogenes* (Abb. 1.1D) und zur Aktinakkumulation an der bakteriellen Oberfläche (Abb. 1.1E). An einem Pol der Bakterienzelloberfläche kommt es zur Anlagerung von Aktinfilamenten und der Ausbildung eines bis zu 40 µm langen Aktinschwanzes. Mit Hilfe dieses Aktinschweifes ist das Bakterium befähigt, sich aktiv mit einer Geschwindigkeit von bis zu 1.4 µm s⁻¹ durch das Zytoplasma der Wirtszelle zu bewegen (Abb. 1.1F) (Dabiri *et al.*, 1990; Sanger *et al.*, 1992; Cossart, 2000). Verantwortlich für diese Aktinakkumulation ist das Oberflächenprotein ActA, ein dimeres Protein, dessen C-terminales Ende in der Bakterienmembran verankert ist (Domann *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1999). Für die intrazelluläre Bewegung ist der N-terminale Bereich essentiell. Es rekrutiert diverse Komponenten der Aktinpolymerisations-Maschinerie der Wirtszelle zur Bakterienoberfläche und initiiert dadurch die intrazelluläre Bewegung, ohne jedoch selbst eine Aktinpolymerisationsaktivität zu besitzen (Ireton & Cossart, 1997). Die Kraft, die für die Vorwärtsbewegung notwendig ist, entsteht zum einen durch die Polymerisation bereits vorhandener Aktinfilamente und zum anderen durch die *de novo*-Synthese von F-Aktin (Mogilner & Oster, 1996; Gerbal *et al.*, 2000).

Erreichen die Listerien die Plasmamembran der Wirtszelle, kommt es zur Ausbildung von Zellfortsätzen, sogenannten Pseudopodien, mit dem Bakterium an der Spitze (Abb. 1.1G). Diese Pseudopodien werden von der benachbarten Zelle phagozytiert (Abb. 1.1H). In der neu infizierten Nachbarzelle liegt *L. monocytogenes* in einer sekundären Vakuole vor. Diese aus einer Doppelmembran aufgebaute Vakuole wird von LLO mit Hilfe einer sekretierten Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase (PlcB) lysiert (Abb. 1.1I) (Gedde *et al.*, 2000). Die Listerien liegen anschließend wieder frei im Zytoplasma vor und ein neuer Infektionszyklus kann beginnen (Cossart *et al.*, 2003).

Diesen Verbreitungszyklus mit der Invasion als Überlebensstrategie findet man nicht nur bei Listerien, sondern auch bei anderen obligatorisch intrazellulären Bakterien, wie z. B. den Salmonellen, Shigellen, und Yersinien (Cossart & Sansonetti, 2004). Er ermöglicht ihnen nicht nur von einer Wirtszelle zur nächsten zu gelangen, sondern gibt ihnen auch die Möglichkeit dem Kontakt mit dem extrazellulären Raum zu entgehen und das menschliche Immunsystem zu umgehen (Galan, 2000). Die Bakterien sind somit nicht der Wirkung von Antibiotika, den Angriffen des Immunsystems oder natürlich mechanischen Abwehrmechanismen wie der Peristaltik des Darmes oder dem Cilienschlag in den Bronchien ausgesetzt. Aufgrund dieser Fähigkeiten ist *L. monocytogenes* zu einem wichtigen Modellsystem für fakultativ intrazelluläre Bakterien in der Zell- und Infektionsbiologie geworden.

1.3 Die Invasionsproteine von *L. monocytogenes*

Das Genom von *L. monocytogenes* umfasst insgesamt 19 sogenannte Internalin-ähnliche Gene, von denen bisher jedoch nur acht genauer beschrieben wurden (Dramsi *et al.*, 1997; Raffelsbauer *et al.*, 1998; Glaser *et al.*, 2001). Sie sind auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert und stellen sozusagen die Schlüssel der Listerien dar. Die zwei prominentesten und auch am besten charakterisierten Vertreter dieser Proteinfamilie sind das Internalin (InlA) und das Internalin B (InlB), deren Gene auch auf einem gemeinsamen Operon liegen. Diese beiden Virulenzfaktoren sind für den ersten Schritt der Invasion von nicht-phagozytierenden Zellen verantwortlich und weisen eine unterschiedliche Wirtszell-Spezifität auf. Für den Prozess der Aufnahme nutzen sie verschiedene wirtseigene Signaltransduktionswege. Die Funktion der übrigen Internaline (InlC, InlE, InlF, InlG und InlH) ist bis heute noch nicht eindeutig aufgeklärt. Es konnte bisher gezeigt werden, dass die Deletion des Genclusters *inlGHE* und von *inlC* zu einer Reduktion der Virulenz von *L. monocytogenes* führt (Engelbrecht *et al.*, 1996; Raffelsbauer *et al.*, 1998; Schubert *et al.*, 2001).

Alle Internaline zeichnen sich durch einen modularen Aufbau homologer Sequenzabschnitte aus und sind strukturell durch eine sogenannte Leucin-reiche Wiederholungsregion (*leucine-rich repeat*, LRR-Region) charakterisiert.

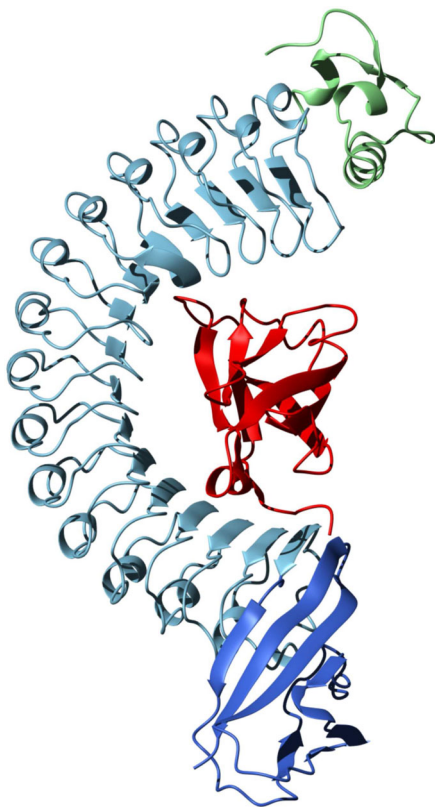
1.3.1 Internalin aus *L. monocytogenes* und sein Rezeptor

1991 wurde InlA (800 Aminosäuren), welches für die Aufnahme der Listerien in humane Caco-2-Zellen und einige andere Säugerepithelzelllinien verantwortlich ist, als erstes Invasionsprotein entdeckt (Gaillard *et al.*, 1991). Es ist kovalent über ein kurzes Sequenzmotiv am C-Terminus in der Zellwand verankert und das wohl am besten charakterisierte Invasionsprotein von *L. monocytogenes*. Mutationen bzw. Defekte im *inlA*-Gen führen zu einem Verlust der Fähigkeit die Darmzellen zu infizieren. Es zeigte sich zudem, dass die avirulenten und nicht-invasiven Bakterien *L. innocua* und *Enterococcus faecalis* invasiv werden, wenn InlA auf ihrer Oberfläche exprimiert wird. Ebenso werden auch synthetische Latexkügelchen, welche mit InlA beschichtet sind, phagozytiert (Gaillard *et al.*, 1991; Lecuit *et al.*, 1997). All diese Ergebnisse zeigen, dass InlA für die Invasion von Caco-2-Zelllinien essentiell ist.

Im Jahre 1996 wurde mit E-Cadherin der humane Rezeptor von InlA identifiziert (Mengaud *et al.*, 1996). Es handelt sich dabei um ein Transmembran-Glykoprotein das auf der Oberfläche des Darmepithels sitzt, und welches in Abhängigkeit von Calcium den Zusammenhalt der Darmzellen durch Zell-Zell-Adhäsion (*adherens junctions*) vermittelt. E-Cadherin gehört zur Superfamilie der Cadherine und besteht aus fünf extrazellulären Domänen (EC1-EC5), einer Transmembranregion und einem konservierten zytoplasmatischen Bereich. Dieser ist im Zytoplasma mit dem Aktinzytoskelett über die Adapterproteine α -, β - und p120-Catenin verbunden. Die Erkennung der E-Cadherine

untereinander erfolgt über homophile Wechselwirkungen der extrazellulären Domäne EC1 (Takeichi, 1990; Geiger & Ayalon, 1992; Kemler, 1993; Yap *et al.*, 1997).

Anhand von E-Cadherin-defizienten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen InlA und seinem Rezeptor ausreicht, um die Aufnahme von *L. monocytogenes* in nicht-phagozytierende Zellen zu vermitteln (Mengaud *et al.*, 1996). Diese Zelllinien verlieren ihre Resistenz gegenüber *L. monocytogenes*, wenn sie mit cDNA für E-Cadherin transfiziert werden. Die Interaktion mit humanem E-Cadherin ist zudem hochspezifisch, da ein einziger Aminosäureaustausch an der Position 16 (Pro→Glu) des Rezeptors, zu einem Verlust der Invasionsfähigkeit der Listerien führt. E-Cadherin aus Mäusen besitzt an dieser kritischen Position ein Glutamat, was der Grund dafür ist, dass Mäuse nach einer oralen Inokulation mit *L. monocytogenes* keine Krankheitssymptome zeigen (Lecuit *et al.*, 1999). Mit dieser Erkenntnis konnte ein transgenes Mausmodell geschaffen werden, welches es erlaubt, Infektionsstudien *in vivo* durchzuführen, die die intestinale und systemische Krankheit die beim Menschen zu beobachten ist, simuliert (Lecuit *et al.*, 2001; 2002).



Mit der kürzlichen Aufklärung der Kristallstruktur des Komplexes zwischen der LRR-Domäne von InlA (InlA') und der N-terminalen Domäne des humanem E-Cadherin Rezeptors (hEC1), kann nun der erste Schritt der Listerieninfektion auf atomarer Ebene nachvollzogen werden (Abb. 1.2) (Schubert *et al.*, 2002). Das sichelförmige InlA' umgreift die hEC1-Domäne fast vollständig, wobei die C-Termini der beiden Domänen in entgegengesetzte Richtungen zeigen. An der Wechselwirkung beider Proteine sind hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren beteiligt. Das bereits oben erwähnte Prolin an Position 16 in hEC1 bindet passgenau in eine hydrophobe Tasche auf der Oberfläche des InlA'; das Glutamat, welches sich im murinen E-Cadherin an dieser Stelle befindet, kann durch seine Größe und negative Ladung nicht mit InlA' wechselwirken (Schubert *et al.*, 2002).

Abb. 1.2: Struktur von InlA' im Komplex mit hEC1

Dargestellt ist die Internalin-Superdomäne des InlA, bestehend aus der Cap- (grün), LRR- (hellblau) und Ig-ähnlichen- (dunkelblau) Domäne. Das hEC1 ist in rot dargestellt. Pfeile repräsentieren β -Faltblattstränge und Bänder α - bzw. 3_{10} -Helices. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

1.3.2 Internalin B aus *L. monocytogenes* und seine Rezeptoren

Das zweite gut charakterisierte Invasionsprotein von *L. monocytogenes* ist das InlB, welches für die Invasion von verschiedenen Zelltypen verantwortlich ist (Cossart *et al.*, 2003; Bierne & Cossart, 2002). Das aus 630 Aminosäuren bestehende Protein vermittelt die Aufnahme sowohl in Hepatocytenculturen, sowie in diverse Epithel- oder Fibroblasten-ähnliche Zelllinien, wie Vero, CHO oder HeLa und ist zudem für die effiziente Replikation in murinen Hepatozyten erforderlich (Dramsi *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 1996; Lingnau *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 1998; Greiffenberg *et al.*, 1998; Parida *et al.*, 1998). Analog zum InlA zeigt ein Defekt im *inlB*-Gen den vollständigen Verlust der Invasivität in diesen Zelllinien (Dramsi *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 1998; Parida *et al.*, 1998). Die Präsenz von InlB auf der Oberfläche von synthetischen Latexkügelchen bzw. der von den apathogenen Bakterien *L. innocua* und *Staphylococcus carnosus* führt zur Aufnahme in die oben genannten Säugerzellen (Braun *et al.*, 1998).

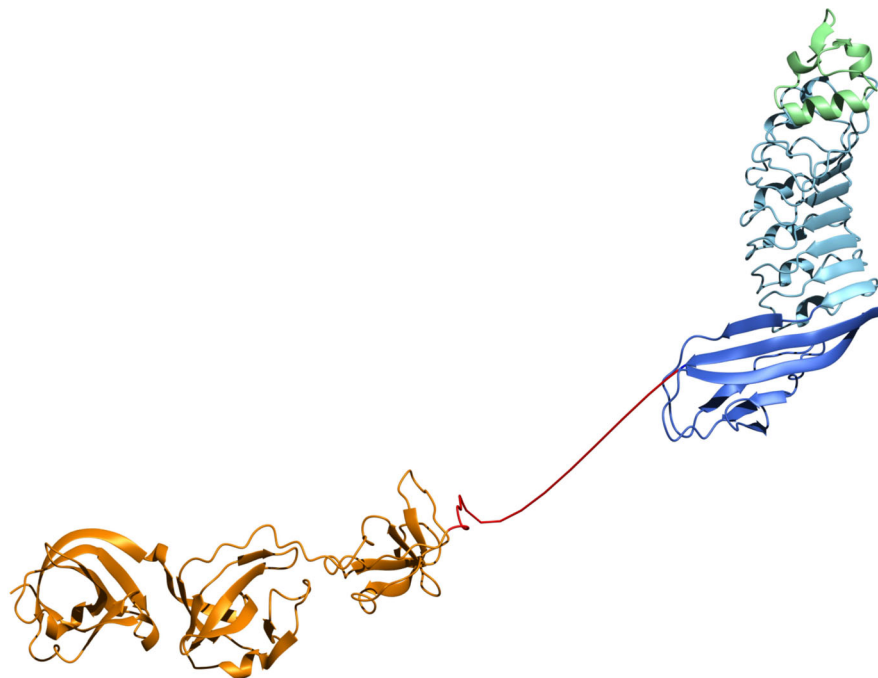


Abb. 1.3: Struktur von InlB

Abgebildet ist die Struktur des gesamten Proteins bestehend aus der *Cap*- (grün), LRR- (hellblau), Ig-ähnlichen (dunkelblau) und GW- (gold) Domäne. Die B-Region, welche im Kristall nur eine schwache Elektronendichte liefert, ist in rot dargestellt. α - bzw. 3_{10} -Helices sind als Bänder und β -Faltblattstrukturen als Pfeile dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Dieses Oberflächenprotein ist locker mit seiner C-terminalen Region, welche aus 3 sogenannten Glycin-Tryptophan (GW)-Domänen besteht, über das Membranlipid Lipoteichonsäure mit der Bakterienoberfläche assoziiert (Abb. 1.3). Aufgrund der fehlenden Verankerung in der Zellwand, kann InlB auch im Überstand von *Listeria*-Kulturen nachgewiesen werden. Das lösliche InlB ist in der Lage mit der Bakterienoberfläche zu reassoziieren und kann Mutanten, die kein InlB synthetisieren, zur Invasion befähigen.

Im Gegensatz zum InlA, konnten für InlB zwei Rezeptoren (gC1q-R und Met) identifiziert und die spezifische Wechselwirkung mit Glycosaminoglycanen beschrieben werden (Braun *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2000; Bierne & Cossart, 2002; Cossart *et al.*, 2003). Zudem sind die durch InlB hervorgerufenen Signalkaskaden in der Wirtszelle bereits teilweise ausführlich charakterisiert. Der relevantere der beiden Rezeptoren ist die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met, dessen natürlicher Ligand der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) ist, welcher für eine große Anzahl von physiologischen Prozessen, wie dem des Zellwachstums, der Wundheilung und der Tumormetastasierung verantwortlich gemacht wird (Birchmeier & Gherardi, 1998; Stella & Comoglio, 1999; Shen *et al.*, 2000). Nach der Bindung des InlB erfolgt eine Autophosphorylierung von spezifischen Tyrosinresten des Met und es kommt zu einer Rekrutierung und Phosphorylierung der Adaptorproteine Cbl, Gab1 und Shc und zur Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) p85-p110, mit der Bildung von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP₃) an der Plasmamembran (Ireton *et al.*, 1996; 1999; Cossart, 2001; Pendaries *et al.*, 2003). Durch den Sekundärbotenstoff PIP₃ kommt es zur Anhäufung von Aktin-regulatorischen Proteinen und zur Umlagerung des Aktinzytoskeletts, die eine Ausstülpung der Plasmamembran hervorruft, sogenannte *membrane ruffles* (Ireton *et al.*, 1999). Auf diese Weise wird das Bakterium nach dem Reisverschluss-Mechanismus in die Wirtszelle eingeschlossen. Die durch die Wechselwirkung mit Met induzierten Signaltransduktionskaskaden ähneln den Vorgängen, die bei der Stimulierung durch den natürlichen Met-Liganden HGF zu beobachten sind (Ireton *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000; Bierne *et al.*, 2000). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass für die Bindung an Met unter anderem eine Reihe von fünf aromatischen Aminosäuren (F104, W124, F126, Y170 und Y214) auf der konkaven Seite der LRR-Domäne essentiell sind (Machner *et al.*, 2003). Ein Austausch von mindestens vier dieser oberflächenexponierten Aromaten gegen Serin führt zu einem kompletten Verlust der Aufnahme von *Listeria*-InlB-Mutanten bzw. von mit InlB beschichteten Latexkugeln in HeLa-Zellen.

InlB interagiert aber auch mit gC1q-R, einem ubiquitären 33 kDa großem Oberflächenprotein, welches zuerst als Rezeptor für den globulären Anteil der Komplementkomponente C1q identifiziert wurde (Ghebrehiwet *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 2000). Es besitzt weder eine Transmembranregion noch einen Glycosylphosphatidylinositolanker, was darauf hindeutet, dass es mit einem anderen Protein wechselwirkt. In Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die GW-Domänen des InlB die spezifische Bindung an den gC1q-R vermitteln und dass dafür die lösliche und nicht die membrangebundene Variante des InlB nötig ist (Marino *et al.*, 2002). Kompetitionsstudien um die Bindung an den Rezeptor zwischen InlB und C1q führten zu einer Inhibierung der InlB-abhängigen *Listeria*-Aufnahme in die Wirtszelle. In einer aktuellen Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen InlB und gC1q-R weder für die Aktivierung von Met noch für die InlB-vermittelte bakterielle Invasion nötig ist (Banerjee *et al.*, 2004).

Der dritte identifizierte Interaktionspartner des InlB sind die Glycosaminoglycane (GAG), negativ geladene Polysaccharide, die an der Oberfläche von allen Zelltypen zu finden sind. Proteoglycane sind

für die optimale Aktivität des HGF und somit für die Aktivierung von Met notwendig (Rusnati & Presta, 1996). Möglicherweise immobilisieren sie die Wachstumsfaktoren an der Zelloberfläche und schützen sie auf diese Weise vor dem Abbau, transportieren sie zu den Rezeptoren und veranlassen ihre Oligomerisierung. InlB bindet an die GAG's über seine GW-Domänen und die InlB-abhängige Invasion wird durch sie signifikant erhöht (Jonquières *et al.*, 2001). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Internalin-Domäne des InlB im Gegensatz zum vollständigen InlB, schwächer in der Met-Aktivierung und der Induktion des Zellscatterings ist (Shen *et al.*, 2000). Somit könnte die Bindung der GW-Domäne an die zellulären GAG's die Wechselwirkung der LRR-Domäne mit Met steigern. Lösliches Heparin führt zur Ablösung des membrangebundenen InlB von der Bakterienoberfläche und induziert sein *clustering*, ähnlich zum HGF (Jonquières *et al.*, 2001). Dies deutet daraufhin, dass sobald GAG's präsent sind, InlB von der Listerien Oberfläche freigesetzt werden kann, da diese mit der Lipoteichonsäure um die Bindung mit den GW-Domänen konkurrieren. Die Beteiligung der GW-Domänen an den Signalkaskaden in der Wirtszelle verdeutlicht, dass InlB wie ein Hormon funktioniert. Diese Idee wird durch die Beobachtung unterstützt, dass HGF in der Lage ist, InlB in der Vermittlung der Invasionsfähigkeit zu ersetzen (Banerjee *et al.*, 2004).

Kürzlich wurde die Existenz eines vierten Rezeptors postuliert, der bis jetzt jedoch noch unbekannt ist (Copp *et al.*, 2003). In dieser Studie zeigte sich, dass die Verwendung von verschiedenen langen InlB-Konstrukten zu einer starken Aktivierung des MAP Kinase Reaktionsweges führte.

1.4 Das Strukturmotiv der Internaline

Alle Mitglieder der Internalin-Familie zeichnen sich durch einen nahezu identischen modularen Aufbau aus repetitiven Segmenten aus. Dies ist exemplarisch am InlA und InlB gezeigt (Abb. 1.4).

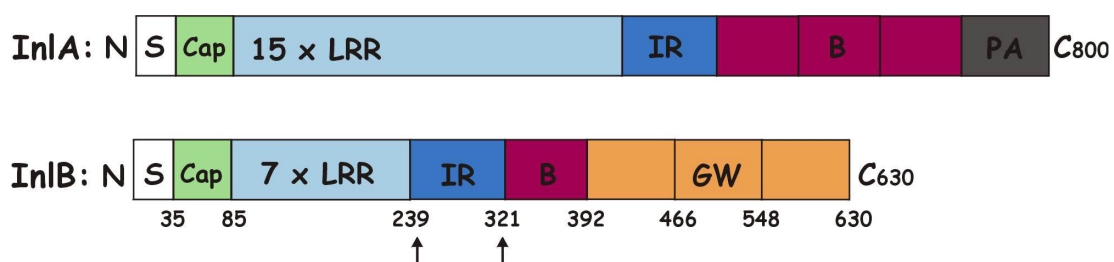


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau der Internaline A und B

Homologe Domänen sind durch gleiche Farben gekennzeichnet und die Zahlen geben die C-terminalen Aminosäuren jeder Domäne an. S, N-terminale Signalsequenz; Cap, Cap-Domäne; LRR, Leucin-reiche Wiederholungssequenz; IR, inter-repeat-Domäne; B, B-Segmente, PA, Peptidoglykananker, GW, GW-Domäne. Die Pfeile beim InlB repräsentieren die C-terminalen Enden der in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte.

Alle Internalin-Proteine sind auf der extrazellulären Seite der Listerien lokalisiert. Sie weisen eine typische 35 Aminosäuren lange N-terminale Signalsequenz auf, die den Export aus der Zelle ermöglicht. Daran schließen sich drei Motive an, die als Internalin-Superdomäne bezeichnet werden. Aus den aufgeklärten Kristallstrukturen der Internaline A, B, E und H zeigte sich, dass diese

Superdomäne nicht aus drei strukturell isolierten Einheiten besteht, sondern einen fließenden Übergang aufweist und dass sich die drei Einheiten einen gemeinsamen hydrophoben Proteinkern teilen (Schubert *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002; Schubert & Heinz, 2003). Sie ist bei allen Vertretern der Internalin-Familie zu finden und vermittelt beim InIA und InIB die Invasionsaktivität (Schubert *et al.*, 2001). Das charakteristische Merkmal der Internalin-Domäne ist ein repetitives Sequenzelement, das eine periodische Anhäufung von Leucinen bzw. Leucin-ähnlichen Aminosäuren (Ile, Val, Phe, Met, Ala) aufweist, und ihr den Namen *leucine-rich repeat* (LRR) gibt. Die LRR-Domäne ist in allen Internalinen von einer N-terminalen *Cap*-Sequenz und einer C-terminalen IR (*inter repeat*)-Region flankiert und unterscheidet sich in der Anzahl der einzelnen Wiederholungseinheiten (5 bis 15). Im folgenden wird für den Begriff Wiederholungseinheit der englische Begriff *repeat* verwendet. In den Internalinen A, E, F, G und H schließt sich an die Internalin-Domäne ein zweiter Bereich an (B-Region), der aus einem bis vier repetitiven Sequenzelementen besteht (B-Segmente). Am C-Terminus dieser Internaline befindet sich ein kurzes charakteristisches Sequenzmotiv (LPxTG, Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht), das für die kovalente Verankerung der Proteine an der Bakterienoberfläche verantwortlich ist. Dieses C-terminale Motiv ist für bakterielle Oberflächenproteine Gram-positiver Bakterien sehr typisch und konnte schon in einer großen Anzahl von Proteinen identifiziert werden (Navarre & Schneewind, 1999). Auf das LPxTG-Motiv folgt eine hydrophobe transmembrane α -Helix und ein positiv geladenes cytoplasmatisches Ende. Das Protein wird durch eine Sortase prozessiert, so dass die letzten beiden Abschnitte im reifen Protein fehlen. Das Enzym spaltet das LPxTG-Motiv zwischen Tyrosin und Glycin, und verankert das Protein kovalent mit der bakteriellen Zellwand (Garandeau *et al.*, 2002; Bierne *et al.*, 2002). Das InIB besitzt im Gegensatz zu den längeren Internalinen nur ein B-Segment und kein LPxTG-Motiv und auch keinen C-terminalen Membrananker. An das B-Segment schließen sich drei wiederholende 70 bis 80 Aminosäurereste große Regionen an, die sogenannten GW-Domänen. Dieses C-terminale Wiederholungsmotiv, welches auch in anderen Oberflächenproteinen von Listerien, wie z. B. Ami, zu finden ist, ist verantwortlich für die nicht-kovalente Assoziation des InIB mit der Lipoteichonsäure in der Mureinschicht der bakteriellen Zellwand (Braun *et al.*, 1997; Jonquières *et al.*, 1999; Cabanes *et al.*, 2002). Die nicht-kovalente Assoziation mit der Zellwand ist dafür verantwortlich, dass einerseits ungefähr die Hälfte der Oberflächen-assoziierten InIB-Proteine im Kulturüberstand von *L. monocytogenes* zu finden sind und andererseits extern appliziertes InIB in der Lage ist, sich nachträglich in die Listerien-Zellwand zu integrieren (Jonquières *et al.*, 1999). Die verkürzten Internaline C und D besitzen weder B-Segmente noch ein LPxTG-Motiv, weswegen diese beiden Proteine von *L. monocytogenes* sekretiert werden.

Die N-terminale *Cap*-Domäne von InIB₃₂₁ (Aminosäuren 36 bis 85) besteht aus drei α -Helices und einem kurzen antiparallelen β -Faltblatt. Es besitzt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu dem Calcium-bindenden EF-Hand-Motiv, das man auch in den Proteinen Calmodulin und Recoverin findet (Flaherty

et al., 1993; Schubert *et al.*, 2001). Die meisten hydrophoben Aminosäuren der *Cap*-Domäne sind bei allen Internalinen hoch konserviert und schirmen den hydrophoben Kern der folgenden LRR-Domäne gegen das hydrophile wässrige Milieu der Umgebung ab. Einige Aminosäurereste der *Cap*-Domäne bilden Wasserstoffbrücken-Bindungen mit der LRR-Domäne aus und beide Domänen bilden zudem einen fließenden Übergang und somit eine einzige Domäne. Es wurden zunächst zwei spezifische Calcium-Bindungsstellen beschrieben, die jedoch in den weiteren gelösten Kristallstrukturen nicht bestätigt werden konnten (Marino *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2001).

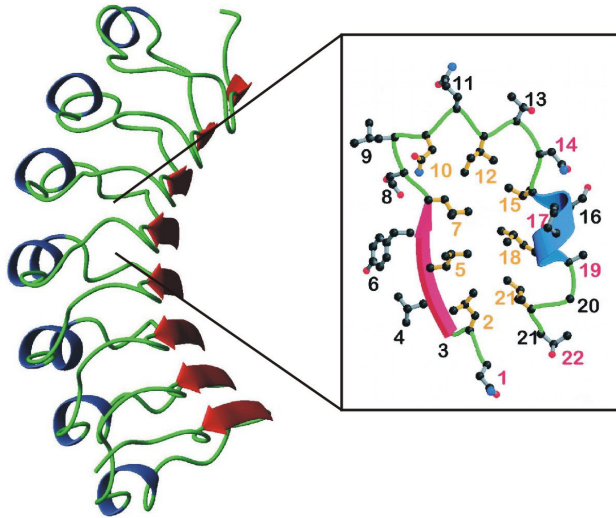


Abb. 1.5: Struktur der LRR-Domäne des InlB

3_{10} -Helices sind als blaue Bänder und β -Faltblattstränge in rot dargestellt. Die Vergrößerung zeigt schematisch eine Wiederholungseinheit des LRR-Motivs (entnommen aus Schubert *et al.*, 2001). Die Zahlen repräsentieren die Positionen der Aminosäuren (gelb und rot: konserviert; grau: variabel). Die Struktur der LRR-Domäne wurde mit dem Programm MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Die LRR-Domäne des InlB besteht aus 7 *repeats*, wobei jedes LRR-Motiv aus 22 Aminosäuren aufgebaut ist (Abb. 1.5). Jedes einzelne *repeat* besteht auf der einen Seite aus einem kurzen β -Strang (bestehend aus 3 Aminosäureresten) und einer dazu antiparallelen 3_{10} -Helix (bestehend aus 3 bis 5 Aminosäureresten) auf der gegenüberliegenden Seite. Diese Sekundärstrukturelemente sind über Schleifen (*loops*) miteinander bzw. mit den angrenzenden LRR-Motiven untereinander verbunden. Die LRR-Domäne bildet dadurch eine rechtsgängige Superhelix, in welcher die spiralförmig angeordneten einzelnen LRR-Motive gestapelt vorliegen. Bei gleicher Orientierung bilden die acht parallelen β -Stränge ein β -Faltblatt,

welches die innere, konkave Seite des Moleküls definiert und die aufeinanderliegenden sieben 3_{10} -Helices die äußere, konvexe Seite bilden.

Im Vergleich zu den schmaleren β -Strängen weisen die 3_{10} -Helices einen erhöhten Platzbedarf auf, der in einer leicht gebogenen Struktur der LRR-Domäne resultiert (12° pro *repeat*) (Schubert *et al.*, 2001). Dabei ist die LRR-Domäne nicht nur um einen zentralen Punkt gewunden, sondern jedes LRR-Motiv ist im Verhältnis zum vorherigen etwas gedreht, was eine zusätzliche Biegung um die zentrale Achse der Superhelix einführt (Schubert & Heinz, 2003). Diese zusätzliche Drehung ist stark von der Anzahl der *repeats* abhängig: während die LRR-Domäne im InlB nur leicht gewunden ist, weist sie im InlA (Abb. 1.2) eine sichelförmige Struktur auf (Schubert *et al.*, 2002). Die β -Stränge besitzen alle die gleiche Länge und sind regulär angeordnet, wohingegen die 3_{10} -Helices in Länge und Positionierung

unterschiedlicher sind (Schubert *et al.*, 2001). Sie stabilisieren auf diese Weise die LRR-Domäne. Jedes Mitglied der Internalin-Familie besitzt LRR-Motive mit einer Länge von 22 Aminosäuren (Marino *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2001). Zehn dieser 22 Reste haben eine strukturelle Funktion und sind hoch konserviert. An sieben Positionen befinden sich Leucine oder Leucin-ähnliche Aminosäuren (2, 5, 7, 12, 15, 18 und 21), die ins Innere der Superhelix weisen und den elongierten hydrophoben Kern bilden. Sie sind somit für die Stabilität der LRR-Domäne verantwortlich. An den Positionen 10 (Asn oder Gln), 14 (Asp) und 17 (Aminosäurereste mit kleinen Seitenketten) sitzen konservierte Aminosäuren, welche mit Hauptkettenatomen ihres jeweiligen LRR-Motivs interagieren und zusätzlich zur Stabilität beitragen. Die verbleibenden 12 Positionen sind von nicht-konservierten und lösungsmittel-exponierten Resten besetzt, so dass mehr als die Hälfte des LRR dazu befähigt ist, Oberflächen für Protein-Protein-Interaktionen zu definieren (Marino *et al.*, 1999).

Auf die LRR-Domäne folgt die IR-Domäne (Aminosäuren 240 bis 321), welche wie die *Cap*-Domäne den hydrophoben Kern der LRR-Domäne gegen die Umgebung abschirmt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der bekannten Internaline zeigt, dass diese Region die am stärksten konservierte im ganzen Protein darstellt. Die Struktur dieser Domäne wird durch ein β -Sandwich, bestehend aus einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt, dominiert, welches aus einem kurzen und drei längeren β -Strängen besteht. Auf der einen Seite wird dieses β -Faltblatt von einem dreisträngigen und einem kurzen zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt flankiert. Der N-terminale β -Strang der IR-Domäne ist eine direkte Verlängerung des letzten C-terminalen β -Strangs der LRR-Domäne. Diese beiden β -Faltblätter gehen fließend ineinander über und sind somit unter anderem für den durchgehenden Proteinkern dieser zwei Domänen verantwortlich. Die Faltungstopologie dieser Domäne ist mit den Immunglobulin (Ig)-Domänen von Antikörpern und diversen eukaryotischen Zelloberflächenproteinen verwandt, besitzt aber einige strukturelle Unterschiede, die sich unter anderem in der Länge und der Orientierung einiger β -Stränge verdeutlichen (Harpaz & Chothia, 1994; Schubert *et al.*, 2001). Sie wird im folgenden als Ig-ähnliche Domäne bezeichnet.

1.5 LRR-Domänen als Module für die Interaktion bei Protein-Protein-Wechselwirkungen

Neben den hier schon erwähnten Internalinen gibt es noch eine Fülle von prokaryontischen und eukaryontischen Proteinen mit dem Strukturmotiv des LRR. Zudem stieg in den letzten Jahren die Anzahl der gelösten Kristallstrukturen dieser LRR-Proteine, teilweise auch im Komplex mit ihren natürlichen Liganden (Kobe & Deisenhofer, 1995a; Papageorgiou *et al.*, 1997; Price *et al.*, 1998). Charakteristisch für Proteine mit LRR-Domänen ist, dass sie hauptsächlich an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind. So handelt es sich bei den eukaryontischen Proteinen um solche, die an biologischen Prozessen, wie z. B. der Signaltransduktion, dem intrazellulären Transport, der Zelladhäsion und Entwicklung, der Enzyminhibition oder der Hormon-Rezeptor-Interaktion beteiligt

sind (Buchanan & Gay, 1996; Kobe & Kajava, 2001). Bei den prokaryontischen Proteinen sind LRR-Motive fast ausschließlich in Virulenzfaktoren pathogener Bakterien zu finden. Zu ihnen gehören neben *Listeria monocytogenes* Bakterien wie *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* oder *Yersinia pestis* (Leung & Straley, 1989; Hartmann *et al.*, 1990; Miao *et al.*, 1999; Kobe & Kajava, 2001). In Tabelle 1.1 sind einige LRR-Proteine verschiedener Herkunft aufgelistet.

Tab. 1.1: Beispiele für eukaryontische und prokaryontische LRR-Proteine

LRR-Protein	Organismus	Funktion	Anzahl der LRR's	Nummer der Proteindatenbank (PDB)
RI	Schwein	Ribonuklease-Inhibitor	15	2BNH 1DFJ (mit RNaseA)
U2A'	Mensch	RNA-Bindung und Splicing	5	1A9N (mit U2B' snRNA)
TAP	Mensch	RNA-Export aus dem Nukleus	4	1FO1
LC1 vom Dynein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Protein-Protein-Interaktion im molekularen Motorkomplex	6	1DS9
InIA	<i>Listeria monocytogenes</i>	Virulenzfaktor (Induktion von Phagozytose)	15	1O6T/1O6V 1O6S (mit E-Cadherin)
InIB	<i>Listeria monocytogenes</i>	Virulenzfaktor (Induktion von Phagozytose)	7.5	1D0B (LRR-Domäne) 1H6T (Internalin-Domäne) 1M9S (ganzes Protein)
PGIP	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Polygalakturonase Inhibitor	10	1OGQ

Erfolgt Kokristallisationen der LRR-Proteine mit ihren Liganden oder wurde von Fragmenten die Struktur gelöst (siehe InIB), so ist dies durch die Ausdrücke in den Klammern nach den PDB-Nummern gekennzeichnet.

Sequenzanalysen von LRR-Proteinen deuten auf die Existenz von mindestens sechs verschiedenen Subfamilien der LRR's hin, die sich in der Länge und Konsensussequenz unterscheiden (Tabelle 1.2) (Buchanan & Gay, 1996; Kajava, 1998; Kajava *et al.*, 1995).

Tab. 1.2: Übersicht über die Subfamilien der LRR-Proteine

LRR Subfamilie	Länge (AS)	Konsensussequenz	Herkunft	Beispiele
<i>typical</i>	24 (20-27)	LxxLxxLxLxxNxLxxLpxxoFxx	Tiere, Pilze	Rab Geranylgeranyltransferase
<i>RI-like</i>	28-29 (28-29)	XxxLxxLxLxxN/CxLxxxgoxxLxxoLxx	Tiere	RI, ran1p
<i>Cys-containing</i>	26 (25-27)	C/LxxLxxLxLxxCxxITDxxoxxLa/gxx	Tiere, Pflanzen, Pilze	Skp2
<i>Plant-specific</i>	24 (23-25)	LxxLxxLxLxxNxLt/sGxIPxxLGx	Pflanzen, prim. Eukaryonten	PGIP
<i>SDS22-like</i>	22 (21-23)	LxxLxxLxLxxNr/kr/kiEN/GLEx	Gram-positive Bakterien, Tiere, Pilze	InIB, U2A'
<i>bacterial</i>	20 (20-22)	PxxLxxLxVxxNxLxxLPD/EL	Gram-negative Bakterien	YopM

Aminosäurereste (dargestellt im Ein-Buchstaben-Code), die fett geschrieben sind, treten in den einzelnen Wiederholungseinheiten mit einer Häufigkeit von mehr als 70 %, groß geschriebene von mehr als 40 % und klein geschriebene mit einer Häufigkeit von mehr als 30 % auf. o steht für einen nicht-polaren Rest und x für jeden beliebigen Rest. Die Tabelle wurde aus Kajava (1998) entnommen.

Das signifikante dieser Klassifizierung ist, dass *repeats* aus verschiedenen Subfamilien niemals in ein und demselben Protein auftauchen, was darauf hindeutet, dass sie sich unabhängig voneinander entwickelt haben müssen (Kajava, 1998; Kobe & Kajava, 2001).

An der N- und C-terminalen Seite besitzen die meisten LRR-Domänen flankierende Regionen, die ein wesentlicher Teil der Struktur sind, da sie den hydrophoben Kern gegen das umgebende Solvens abschirmen (Kobe & Kajava, 2001). Dabei können diese flankierenden Regionen von ganz unterschiedlicher Natur sein. Beispielsweise findet man beim U2A' eine amphipathische α -Helix, beim InlB die N-terminale hydrophile Cap-Domäne und in extrazellulären Proteinen oft eine Cysteinreiche Domäne.

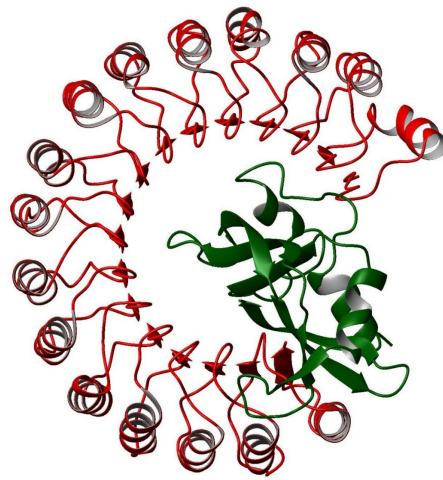


Abb. 1.6: Struktur des Ribonuklease-Inhibitors (RI) aus Schwein im Komplex mit RNase A

Der RI ist in rot und die RNase A in grün gefärbt. α -Helices sind als Bänder und β -Faltblattstränge als Pfeile dargestellt. Die Struktur wurde mit dem Programm MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Die erste und wohl auch prägnanteste Kristallstruktur, die bis jetzt von einem LRR-Protein gelöst wurde, stellt dabei die des Ribonuklease-Inhibitors (RI) dar (Abb. 1.6) (Kobe & Deisenhofer, 1993a,b). RI's konnten bisher in allen Zellen von Säugetieren nachgewiesen werden und enthalten 15 repetitive LRR-Motive (Lee & Vallee, 1993; Kobe & Deisenhofer, 1993b). Durch die regelmäßige Anordnung der LRR-Motive erhält der RI die Form eines Hufeisens.

Alle bisher bekannten LRR-Domänenstrukturen weisen eine elongierte und gebogene Form mit den β -Strängen auf der konkaven Innenseite und den Helices (α bzw. 3_{10}) auf der konvexen Außenseite auf. Diese gekrümmte Struktur prädestiniert diese Proteinfamilie für die Protein-Protein-Interaktionen und die Bindung des jeweiligen Interaktionspartners erfolgt fast ausschließlich über die β -Faltblätter der konkaven Seite (Kobe & Deisenhofer, 1995a,b; Papageorgiou *et al.*, 1997; Price *et al.*, 1998). Informationen über die Ligandenbindung auf atomarer Ebene sind im Moment zwar erst aus relativ wenigen Kristallstrukturen zugänglich, sie konnten aber schon einen ersten Einblick in die allgemeinen strukturellen Grundlagen für die Bindung an ein LRR-Protein geben. Derzeit konnten die Strukturen des Ribonuklease-Inhibitor aus Schwein und Menschen (Kobe & Deisenhofer, 1995a; Papageorgiou *et al.*, 1997), des Protein U2A' aus dem humanen Spleißosom (Price *et al.*, 1998), des

von Willebrand-Faktor (Huizinga *et al.*, 2002) und des Internalin aus *Listeria monocytogenes* (Schubert *et al.*, 2002) im Komplex mit ihren Liganden gelöst werden (Abb. 1.2).

1.6 Proteine mit repetitiven Sequenzen: Struktur, Funktion, Evolution und Design

Proteine, die Motive mit *repeats* besitzen, die aus 20 bis 40 Aminosäuren aufgebaut sind, sind in den pro- und eukaryontischen Genomen oft zu finden (van Belkum *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 2001). Diese Wiederholungsmotive, welche in Eukaryonten bis zu dreimal häufiger anzutreffen sind, scheinen durch Duplikationsereignisse und ungleichmäßiges *crossing-over* in der Evolution der sie kodierenden Gene, entstanden zu sein (Cox & Mirkin, 1997; Heringa, 1998; Marcotte *et al.*, 1999). Strukturell betrachtet bildet diese Klasse von Proteinen eine ausgedehnte kontinuierliche Superhelix, in welcher die sich wiederholenden Einheiten übereinander gestapelt sind (Groves & Barford, 1999; Kobe & Kajava, 2000; Andrade *et al.*, 2001). Bisher wurden ungefähr 20 Proteinklassen mit einem repetitiven Aufbau beschrieben, wobei für jeweils mindestens einen Vertreter die dreidimensionale Struktur aufgeklärt werden konnte (exemplarisch an der Ankyrin-Domäne in Abb. 1.7 gezeigt) (Kajava, 2002; <http://cmm.info.nih.gov/kajava/solenoidtable.html>).

In jeder dieser verschiedenen Klassen, definiert ein aus 20 bis 40 Aminosäuren bestehender *repeat* eine Vielzahl von sekundären Struktureinheiten (Tabelle 1.3). In dem funktionellen Protein gibt es zwei wichtige Kategorien an Interaktionen, die die charakteristische tertiäre Struktur definieren: die Wechselwirkung in einem einzelnen Wiederholungsmotiv und die zwischen zwei benachbarten repetitiven Einheiten. Bis jetzt konnten noch keine einzelnen *repeats* gefunden werden, die eine stabil gefaltete Einheit darstellen. Es scheint daher so zu sein, dass mehrere tandemartig angeordnete *repeats* nötig sind, um eine stabile gefaltete Struktur bilden zu können. Wie jedoch der komplizierte Zusammenhang zwischen der Stabilität, Anzahl des jeweiligen *repeat* Motivs und der Funktion ist, konnte bisher erst ansatzweise untersucht werden.

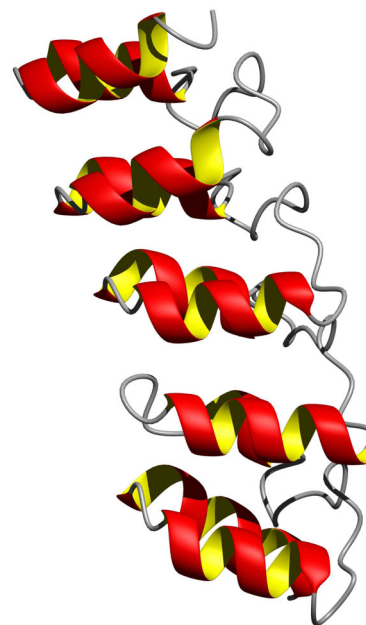


Abb. 1.7: Struktur des p19^{INK4d}

Abgebildet ist die Ankyrin-Domäne des p19^{INK4d}. α -Helices sind in rot/gelb dargestellt und loops in grau. Die Struktur wurde mit dem Programm MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Tab. 1.3: Verschiedene Proteinklassen mit repetitivem Aufbau

repetitives Motiv	Faltungskategorie	Beispiele
Tetratricopeptid (TPR)	rechtsgängiges α -2-Solenoid α Helix - Turn - α Helix	Proteinphosphatase 5
HEAT	rechtsgängiges α -2-Solenoid α Helix - Linker - α Helix	Proteinphosphatase 2A PR65/A Untereinheit
Armadillo	rechtsgängiges α -3-Solenoid α Helix - Loop - α Helix - Loop - α Helix	β -Catenin, Importin- α
Ankyrin (Ank)	rechtsgängiges L-Solenoid α Helix - β Hairpin oder Loop - α Helix	p19 ^{INK4d}
<i>Leucine-rich repeat</i> (LRR)	rechtsgängiges $\alpha/3_{10}$ - β -Solenoid $\alpha/3_{10}$ Helix - Loop - β Strang	Ribonuklease Inhibitor, InIB
β -coil	rechtsgängiges β -3-Solenoid (parallele β -Helix), PelC-ähnlich { β Strang - Linker - β Strang - Linker - β Strang } _n	P22 TSP, Pektat Lyase C (<i>Erwinia chrysanthemi</i>)
GGXGXD	rechtsgängiges β -2-Solenoid (β -roll) { β Strang - Linker - β Strang } _n	Alkalische Protease (<i>P. aeruginosa</i>), Serralysin
Hexapeptid (HPR)	linksgängiges β -3-Solenoid (parallele β -Helix) { β Strang - Linker - β Strang - Linker - β Strang } _n	UDP-N-acetylglucosamin O-acetyltransferase (LpxA) (<i>E. coli</i>) Carbo-Anhydrase (<i>M. thermoophila</i>)

Die Tabelle wurde verändert aus Kobe & Kajava (2000)

Jede *repeat*-reiche Proteinfamilie vermittelt eine spezifische Protein-Protein-Interaktion, die an einer großen Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt ist. Dazu gehören z. B. die Kontrolle des Zellzyklus, die Regulation der Transkription, die angeborene Immunität, der Transport von Vesikeln, die Zelldifferenzierung, die Apoptose, die Abwehrreaktionen bei Pflanzen oder die bakterielle Invasion (Jones & Jones, 1997; Sedgwick & Smerdon, 1999; Andrade *et al.*, 2001; Kobe & Kajava, 2001). Eine Ausnahme stellen hierbei die parallelen β -Helix Proteine dar, die an Zucker binden, z. B. P22 TSP und Pektat Lyase C. Was die *repeat*-Proteine als spezifische Bindeproteine so erfolgreich macht, ist wahrscheinlich durch ihren repetitiven Aufbau zu erklären, der in einer dehnbaren molekularen Oberflächen resultiert, um spezifische Interaktionen vermitteln zu können (Sedgwick & Smerdon, 1999; Andrade *et al.*, 2001; Kobe & Kajava, 2001).

Die strukturelle Anordnung in den *repeat*-Domänen erlaubt es (im Prinzip), einzelne Wiederholungseinheiten austauschen, entfernen oder einfügen zu können, ohne dass dabei die dreidimensionale Struktur zerstört wird, dafür aber die Oberfläche variiert werden kann (Zweifel & Barrick, 2001a; Mello & Barrick, 2004). Einzelne *repeats* bestehen aus Aminosäuren, die in einem bestimmten Rahmen zum einen für die Wechselwirkungen in sowie zwischen den *repeats* und zum anderen als oberflächenexponierte Reste potentiell an der Interaktion mit dem Zielmolekül beteiligt sind. All diese Charakteristika, die man bei globulären Proteinen nicht findet, konnten dazu genutzt werden, um mit Hilfe von multiplen Sequenzalignements und strukturellen Daten, die Reste beschreiben zu können, die in den einzelnen *repeats* wichtig für die Faltung bzw. für die Interaktion mit dem Substrat sind. Somit sollte es möglich sein, Funktionen von bereits existierenden *repeat*-

Proteinen modifizieren bzw. neue Proteine mit neuen Bindungseigenschaften kreieren zu können. Auf die detaillierte Vorgehensweise des „*repeat-based consensus design*“ und der Generierung von sogenannten „*repeat libraries*“ soll an dieser Stelle verzichtet und auf die Originalliteratur verwiesen werden (Main *et al.*, 2003a,b; Forrer *et al.*, 2004). In den letzten Jahren ist es einigen Gruppen gelungen, neuartige Ankyrin-*repeat*, LRR und TPR Proteine zu entwerfen (Mosavi *et al.*, 2002a; Kohl *et al.*, 2003; Binz *et al.*, 2003; Stumpp *et al.*, 2003; Main *et al.*, 2003a,b). Diese artifiziell entworfenen Proteine konnten schließlich mit ihren biophysikalischen Charakterisierungen und den teilweise gelösten Röntgenkristallstrukturen einen beträchtlichen Beitrag zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen Struktur und Sequenz bei den *repeat*-reichen Proteinen liefern.

1.7 Faltung und Stabilität von Proteinen

Proteine besitzen eine einzigartige dreidimensionale Struktur. Die Information dafür, welche Struktur ein Protein einnehmen soll, ist in der Aminosäuresequenz kodiert (Anfinsen, 1973; Jaenicke, 1991; Ptitsyn, 1991). Unter physiologischen Bedingungen stellt die Proteinfaltung einen spontanen Prozess dar, der von außen weder zusätzliche Informationen noch Energiezufuhr benötigt.

In der Zelle beginnt die Faltung eines Proteins nach Freisetzung der synthetisierten Polypeptidkette vom Ribosom (Ban *et al.*, 2000). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* können Proteine innerhalb von wenigen Millisekunden bis Minuten vom denaturierten in den nativen Zustand falten (Jaenicke, 1996). Trotz der in einer Zelle vorkommenden Faltungshelfermoleküle, bilden viele Proteine auch ohne diese Helfer *in vitro* korrekt ihre nativen Strukturen (Jaenicke & Seckler, 1997; Ellis & Hartl, 1999).

Seit langem vermutet man, dass die Faltung einen thermodynamisch kontrollierten Vorgang darstellt. Anfinsen konnte 1973 auf der Grundlage von experimentellen Untersuchungen die thermodynamische Hypothese der Proteinfaltung formulieren, welche besagt, dass die dreidimensionale Struktur eines nativen Proteins diejenige ist, bei der es den niedrigsten Wert der freien Enthalpie annimmt. Dem gegenüber steht jedoch der Einwand Levinthal's (1968), dass eine statistische Suche nach der richtigen nativen Konformation in biologisch relevanten Zeiträumen nicht möglich sei (Levinthal's Paradox). Man hat aus diesen zwei Hypothesen abgeleitet, dass sich zunächst begrenzte Faltungsbezirke bilden müssen. Die Faltung ist also eine sequentielle Abfolge von zunehmend immer stärker strukturierten Zuständen, wobei die native Struktur des Proteins nicht nur über einen Faltungsweg erreicht werden muss (Levinthal, 1968; Kim & Baldwin, 1982; 1990). Seit einigen Jahren wird nun verstärkt diskutiert und untersucht, ob die Faltung unter kinetischer oder thermodynamischer Kontrolle steht. Die thermodynamischen Untersuchungen haben dabei zwei Aufgaben: zum einen am nativ gefalteten Protein die strukturstabilisierenden Kräfte zu untersuchen und zum anderen den Nachweis für thermodynamisch stabile Intermediate bei der Proteinfaltung zu erbringen. Die kinetischen Untersuchungen hingegen dienen der Charakterisierung der am schnellsten gebildeten Zustände auf dem Faltungsweg.

1.7.1 Faltungsprozesse und Intermediate

Bei der *in vitro* Untersuchung der Faltung geht man in der Regel von chemisch- oder thermisch-denaturierten Proteinen aus. Der denaturierte Zustand eines Proteins ist dabei definiert als eine nicht-kovalente, kooperative und im Prinzip reversible Veränderung der nativen Struktur (Dill & Shortle, 1991). Sie zeichnet sich im Allgemeinen durch eine geringe Reststruktur und eine hohe Lösungsmittelzugänglichkeit hydrophober Reste aus (Shortle, 1996). Spricht man vom entfalteten Zustand eines Proteins, so beziehen sich die Aussagen auf die denaturierten Zustände, bei denen alle nativen Elemente der Struktur verloren gegangen sind. Diese entfaltete Struktur sollte im Idealfall einer frei beweglichen Kette mit zufälliger Anordnung, also einem Zufallsknäuel (*random coil*), entsprechen (Tanford, 1968). Es zeigte sich jedoch in neueren Ergebnissen, dass der denaturierte Zustand eines Proteins meist aus einer heterogenen Ansammlung von verschiedenen entfalteten Zuständen zusammengesetzt ist (Fersht, 1998). Es wird daher in Faltungsexperimenten normalerweise immer ein Ensemble von energetisch nahezu gleichen Konformationen betrachtet, die sich untereinander in einem schnellen Gleichgewicht befinden (Kataoka & Goto, 1996; Shortle, 1996; Smith *et al.*, 1996). In den letzten Jahren wurde eine Anzahl von Methoden entwickelt und verfeinert, die es erlauben, einzelne Moleküle bei Faltungs- und Entfaltungsreaktionen zu beobachten (Kelley *et al.*, 2001; Schuler *et al.*, 2002; Lipman *et al.*, 2003).

Innerhalb von Millisekunden bis Sekunden finden Proteine von der großen Anzahl an Konformationen des entfalteten Zustandes in die definierte und einzige Konformation des gefalteten Zustandes. Dies kann initiiert werden, durch die Überführung des denaturierten Proteins in Bedingungen unter denen eine Faltung möglich ist. Es bilden sich lokale, nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen benachbarten Aminosäureresten aus, die die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur vorantreiben (Jaenicke, 1987; Baldwin & Rose, 1999a,b). Während dieses hierarchischen Prozesses können Interaktionen zwischen teilweise ausgebildeten nativen oder nativähnlichen Bereichen entstehen, die den Faltungsablauf positiv beeinflussen. Diese sogenannten nativ-ähnlichen Faltungsintermediate dienen als „Zwischenstationen“ für die vielen verschiedenen Konformationen des denaturierten Zustandes, welche dann in einem Schritt zur nativen Struktur finden (*on-pathway*) (Tsong *et al.*, 1971). Es können aber auch Intermediate mit nicht-nativen Wechselwirkungen auftreten, die nicht zur Ausbildung von nativen Strukturen führen und als unproduktive Sackgassen dienen (*off-pathway*) (Ikai & Tanford, 1971; Bieri & Kiefhaber, 2000). Bei kleinen Proteinen bis etwa 100 Aminosäuren Länge konnte beobachtet werden, dass die Faltung oft einem Zweizustandsmodell folgt. Hier sind ausschließlich der entfaltete und der native Zustand populiert.

1.7.2 Modelle für die Proteinfaltung

In den letzten Jahren haben sich sowohl die theoretischen Modelle, als auch die experimentellen Methoden zur Aufklärung des Faltungsmechanismus enorm weiterentwickelt. Geschwindigkeitsbestimmende Schritte können identifiziert und die Struktur von Faltungsintermediaten aufgeklärt werden (Bieri & Kiefhaber, 1999; Kiefhaber *et al.*, 1992). Der Weg, den die Polypeptidkette zur nativen Struktur durchläuft, kann mit Hilfe einer Vielzahl der verschiedensten Methoden untersucht werden. Neben den wichtigsten spektroskopischen Methoden, wie der Fluoreszenz-, NMR-, und Circular dichroismus-Spektroskopie, werden aber auch Verfahren wie die Massenspektrometrie, die Chromatographie, der H/D-Austausch und der Aktivitätstest angewandt (Brockwell *et al.*, 2000; Radford, 2000). Die oben genannten Methoden können dabei in unterschiedlicher Kombination angewandt werden. Des Weiteren kann man mit der *stopped-flow*, *quench-flow* oder *continuous-flow* Messtechnik kinetische Intermediate detektieren und charakterisieren (Roder *et al.*, 2004).

Um die Proteinfaltung und ihre Geschwindigkeit beschreiben und erklären zu können, wurden diverse Theorien entwickelt, von denen die wichtigsten im folgenden nun kurz erläutert werden sollen.

Im sogenannten *framework* Modell (auch als *diffusion-collision mechanism* bezeichnet) liegt die Grundidee darin, dass Proteinfaltung einen hierarchischen Prozess darstellt (Tsong *et al.*, 1972; Ptitsyn & Rashin, 1975; Bierzynski *et al.*, 1982; Shoemaker *et al.*, 1985; Karplus & Weaver, 1994). Zu Beginn der Faltung erfolgt die Ausbildung von lokalen Sekundärstrukturelementen, welche das Grundgerüst für die folgende Formierung der Tertiärstruktur bildet (Udgaonkar & Baldwin, 1988; Kim & Baldwin, 1990). Wichtig hierbei ist, dass diese Bereiche nicht endgültig fixiert sind, sondern in ihrer Position und Größe fluktuieren. Eine Stabilisierung dieser Sekundärstrukturelemente erfolgt durch die Ausbildung von unspezifischen hydrophoben Wechselwirkungen (Ptitsyn & Rashin, 1975; Kim & Baldwin, 1982). Die gebildeten Sekundärstrukturen legen den Faltungsweg fest und sind die Voraussetzung für die Assemblierung der komplexeren Tertiärstruktur. Diese Änderungen gehen mit der Entstehung des hydrophoben Kerns (sog. *hydrophobic core*) und der Verdrängung des Wassers aus dem Inneren des Proteins einher. Eine Folgerung dieses Modells wäre jedoch, dass lokale Konformationen von lokalen Sequenzen abhängen. Dies scheint für globuläre Proteine aber nicht zu zutreffen, da die gleiche Sequenz oft verschiedene Strukturen ausbilden kann (Kabsch & Sander, 1984).

Im *hydrophobic collapse* Modell hingegen wird als erster Faltungsschritt ein unspezifischer Kollaps der Polypeptidkette angenommen, bei dem es zur Zusammenlagerung von hydrophoben Aminosäureseitenketten kommt (Matheson & Scheraga, 1978; Dill, 1985; 1990). Durch diese Zusammenlagerung wird der Kontakt mit dem wässrigen Lösungsmittel minimiert und es bilden sich Sekundärstrukturelemente aus. Die entstandene Sekundärstruktur ist eine effiziente, wenn auch noch nicht-native Packung der hydrophoben Seitenketten, welche anschließend durch Neuordnung in die

native Struktur umgewandelt wird (Matheson & Scheraga, 1978; Dill, 1990). Der erste direkte Hinweis für dieses Modell wurde bei der Faltung des Proteins Barstar gefunden (Agashe *et al.*, 1995). Ein drittes Faltungsmodell stellt das sogenannte *jig-saw puzzle* Modell dar, in welchem, analog zum Zusammensetzen eines Puzzles, die Zusammensetzung von strukturellen Elementen auf verschiedene Art und Weise erfolgen kann (Harrison & Durbin, 1985). Mit anderen Worten gesagt, gibt es für ein Protein keinen einzigartigen Faltungsweg den nativen Zustand zu erreichen.

In den frühen 90-er Jahren wurden die Beobachtungen gemacht, dass Proteine ohne die Akkumulierung von Faltungsintermediaten nach einem einfachen Zweizustandsmodell falten, und dass Sekundär- und Tertiärstrukturen parallel gebildet werden können (Jackson & Fersht, 1991; Otzen *et al.*, 1994). Diese Beobachtungen hatten zur Folge, dass die drei zuvor erwähnten klassischen Faltungsmechanismen in einen großen Schmelztiegel geworfen wurden, und zum *nucleation-condensation-growth* Modell führten (Itzhaki *et al.*, 1995; Fersht, 1995; Neira *et al.*, 1996; Fersht, 1997). Diesem Modell zufolge, welches Eigenschaften des *framework*- und des *hydrophobic-collapse* Mechanismus vereinigt, dient eine Region (einige native Aminosäurereste) der Polypeptidkette als Nukleus für die Ausbreitung der Kette, um den nativen Zustand erreichen zu können. Neuere Erkenntnisse sprechen jedoch gegen spezifische Nukleationspunkte im Faltungsgeschehen und lassen erkennen, dass alle Aminosäurereste gleichermaßen wichtig für die Faltung sind (Sánchez & Kiefhaber, 2003a).

Für jedes dieser vier Modelle gibt es experimentelle Hinweise und keines von ihnen ist universal.

1.7.3 Bestimmung von Stabilitätsparametern

Die native Struktur eines Proteins wird durch das Zusammenwirken von hydrophoben (Tendenz unpolare Moleküle die Hydratation zu minimieren) und elektrostatischen (Wasserstoffbrücken, Ionenpaare und van der Waals Kräfte) Wechselwirkungen bestimmt (Burley & Petsko, 1988; Dill, 1990). Des Weiteren können auch Domänenwechselwirkungen, Assoziationen und co- und posttranslationale Modifikationen zur Stabilität beitragen (Mayr *et al.*, 1994; Kohlhoff *et al.*, 1996; Jaenicke & Buchner, 1993). Die resultierende Gesamtstabilität eines Proteins wird als freie Enthalpie der Stabilisierung angegeben und liegt für native Proteine bei physiologischen Bedingungen im Bereich von ungefähr 4 bis 16 kcal mol⁻¹ (Dill, 1990). Dieser Stabilitätsunterschied zwischen dem entfalteten (U) und dem nativen Zustand (N) eines Proteins ist nur marginal und entspricht einem Äquivalent von nur wenigen schwachen Wechselwirkungen (Pfeil, 1986; Pace, 1990). Er ergibt sich aus der Summe großer Unterschiede der Enthalpie (ΔH) und der Entropie (ΔS) im Protein und im umgebenden Wasser, welche sich gegenseitig nahezu aufheben. Da im denaturierten Zustand viel mehr konformationelle Flexibilität besteht, wird während der Faltung die Entropie der Polypeptidkette stark verringert. Auf der anderen Seite wird durch die Wechselwirkungen der Seitenketten im nativen Zustand Enthalpie gewonnen und die Entropie steigt während der Faltungsreaktion durch die Freisetzung von Wassermolekülen. Zusätzlich erhöht sich beim Entfalten die geordnete Struktur des

Wassers um die hydrophoben Seitenketten am Protein mit steigender Temperatur. Dies führt zu einer Erhöhung der Wärmekapazität (ΔC_p) um ca. $12 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ pro Aminosäure (Fersht, 2002).

Die Gesamtänderung der freien Enthalpie der Faltung ΔG_F ergibt sich somit aus der Änderung der Enthalpie und der Entropie:

$$\Delta G_F = \Delta H_F - T \cdot \Delta S_F$$

Soll der Faltungsweg eines Proteins aufgeklärt werden, so müssen sowohl kinetische als auch thermodynamische Parameter der intermediär vorkommenden Zustände des Proteins charakterisiert werden (Baker & Agard, 1994). Die Daten, die zur Bestimmung der Stabilität eines Proteins nötig sind (Schmelztemperatur T_m und die thermodynamischen Größen ΔG , ΔH , ΔS und ΔC_p), lassen sich mit Hilfe unterschiedlicher experimenteller Verfahren bestimmen, die meistens optischer bzw. kalorimetrischer Natur sind.

1.8 Vergleich der Faltung von globulären und solenoiden Proteinen

Kleine globuläre Proteine, meist bis maximal 100 Aminosäuren groß, falten sehr schnell und oft ohne die Ausbildung von Intermediaten. Bei globulären Proteinen die nicht strikt einem Zweizustandsmodell folgen und Intermediate populieren, wird angenommen, dass diese die Anzahl der möglichen ungefalteten Konformationen einschränken und sich beschleunigend auf die Faltung auswirken (Kim & Baldwin, 1990). Aufgrund dieser Tatsachen, stellten die globulären Proteine bisher fast ausschließlich die Untersuchungsobjekte dar, an welchen versucht wurde, die Grundlagen und Phänomene der Proteinfaltung zu untersuchen und zu verstehen. In den letzten Jahren wurde dann unter anderem verstärkt damit begonnen, die Faltungswege von nicht-globulären Proteinen zu charakterisieren. Zu diesen nicht-globulären Proteinen gehören auch die *repeat*-reichen oder solenoiden Proteine, deren repetitiven Motive aus 20 bis 40 Aminosäuren gebildet werden und die in einer Art und Weise zusammengesetzt sind, dass sie eine ausgestreckte und auffallend superhelikale Struktur ausbilden (Groves & Barford, 1999; Kobe & Kajava, 2000). Diese repetitive und gestreckte Natur der *repeat*-reichen Proteine ist dafür verantwortlich, dass sie sich sehr drastisch von den globulären Proteinen bezüglich ihrer Struktur unterscheiden: Proteine mit repetitiven Sequenzwiederholungen werden von kurzreichenden und regularisierten Interaktionen dominiert, wohingegen globuläre Proteine komplexe Topologien mit weitreichenden Interaktionen aufweisen (Main *et al.*, 2003a,b).

In der jüngsten Vergangenheit konnten einige wenige sehr produktive Studien bezüglich der Stabilität und Faltung der nicht-globulären Natur dieser linearen *repeat*-Proteine hervorgebracht werden. In diesen Arbeiten wurden hauptsächlich Proteindomänen mit Ankyrin *repeats* und mit dem Faltungsmotiv der parallelen β -Helix untersucht. In Tabelle 1.4 sind einige der bisher untersuchten Proteine mit der jeweiligen Anzahl ihrer Wiederholungseinheiten angegeben.

Tab. 1.4: Biophysikalisch charakterisierte solenoide Proteine

Protein	Anzahl der <i>repeats</i>	Referenz
p16 ^{INK4}	4 Ankyrin <i>repeats</i>	Tang <i>et al.</i> , 1999; Zhang & Peng, 2000; Tang <i>et al.</i> , 2003; Cammett <i>et al.</i> , 2003
p19 ^{INK4d}	5 Ankyrin <i>repeats</i>	Zeeb <i>et al.</i> , 2002
Ankyrin repeats des Notch Rezeptors	7 Ankyrin <i>repeats</i>	Zweifel & Barrick, 2001a,b; Bradley & Barrick, 2002; Mello & Barrick, 2004
Pektat Lyase C	8 3- β -Strang <i>repeats</i>	Kamen <i>et al.</i> , 2000; Kamen & Woody, 2001; Kamen & Woody, 2002a,b
BsPel	8 3- β -Strang <i>repeats</i>	Walter, 2002
P22 TSP	13 3- β -Strang <i>repeats</i>	Fuchs <i>et al.</i> , 1991; Danner & Seckler, 1993; Danner <i>et al.</i> , 1993; Miller <i>et al.</i> , 1998
RI	15 LRR <i>repeats</i>	Klink <i>et al.</i> , 2001
entworfene LRR's	4 bis 14 LRR <i>repeats</i>	Stumpp <i>et al.</i> , 2003
entworfene Ankyrine	4 bis 6 Ankyrin <i>repeats</i>	Mosavi <i>et al.</i> , 2002b; Kohl <i>et al.</i> , 2003; Binz <i>et al.</i> , 2003; Devi <i>et al.</i> , 2004
entworfene TPR's	1 bis 3 Ankyrin <i>repeats</i>	Main <i>et al.</i> , 2003a,b

Ein Großteil der charakterisierten *repeat*-Proteine zeigte im Gleichgewicht ein Verhalten analog den meisten globulären Einzeldomänenproteinen: Sie falteten in einem kooperativen Übergang nach einem Zweizustandsmodell (Tang *et al.*, 1999; Mosavi *et al.*, 2002a; Zeeb *et al.*, 2002; Zweifel & Barrick, 2001a; Kamen *et al.*, 2000). Dieses Faltungsverhalten, bei dem nur native bzw. entfaltete Proteinspezies populiert sind, spiegelt dabei die doch sehr einfache Faltungstopologie der *repeat*-reichen Proteine wieder, die durch kurzreichende Wechselwirkungen definiert wird. Globuläre Proteine hingegen gelangen zu ihrer Gesamtstabilität durch die Summe einer Vielzahl von weitreichenden Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Aminosäureseitenketten, was in einem komplizierteren System resultiert. Aufgrund der Tatsache, dass *repeat*-Proteine aus einzelnen modularen Einheiten aufgebaut sind, kann man sich vorstellen, dass jeder *repeat* eine eigenständige Faltungseinheit (Foldon) darstellt, welcher kinetisch detektierbar sein sollte. Eine aktuelle Studie am *Drosophila* Notch Rezeptor (sieben Ankyrin-*repeats*) zeigte, dass sich die Gesamtstabilität der vollständigen Ankyrin-Domäne aus den Summen der einzelnen *repeats* zusammensetzt (Mello & Barrick, 2004). Bei einer Vielzahl der untersuchten solenoiden Proteine konnten auch mehrere Faltungsphasen registriert werden, die durch kinetische Intermediate zu erklären sind. Auch diese Beobachtung konnte bei globulären Proteinen des öfteren gemacht werden (Jackson, 1998; Brockwell *et al.*, 2000; Fersht & Daggett, 2002).

Es scheint auf den ersten Blick so zu sein, dass die Faltung von globulären und *repeat*-reichen Proteinen trotz ihrer deutlichen strukturellen Unterschiede, nach bisherigem Kenntnisstand, gar nicht so verschieden sind. Um die feinen und detaillierten Differenzen, die bestimmt existieren, beschreiben zu können, bedarf es ausführlicher biochemischer und biophysikalischer Untersuchungen, sowohl der thermodynamischen Stabilität, als auch der Faltung.

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

LRR-Proteine gehören zu einer Klasse von Proteinen, welche aus sich wiederholenden Sequenzeinheiten aufgebaut sind (Groves & Barford, 1999; Kobe & Kajava, 2000; Andrade *et al.*, 2001). Die Topologie solcher *repeat*-reichen Proteine ist zwar hochgeordnet, aber im Vergleich zu globulären Proteinen sehr einfach. Die lokalen Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren, die sich in der Primärsequenz nahe sind, macht diese Proteine zu interessanten Modellproteinen für das Studium zur Proteinfaltung. Bisher beschränkte sich die Untersuchung der Stabilität und Faltung von *repeat*-reichen Proteinen jedoch hauptsächlich auf die Ankyrin- und β -Helix-Motive (siehe Tabelle 1.4).

In dieser Arbeit sollte die thermodynamische Stabilität und die Faltungseigenschaft einer LRR-Domäne mittels biophysikalischer Methoden untersucht werden. Als Untersuchungsobjekt diente dazu die LRR-Domäne des Internalin B (InIB) aus dem Bakterium *Listeria monocytogenes*. Des weiteren sollte die sogenannte Internalin-Superdomäne bezüglich der Stabilität charakterisiert werden. In der Kristallstruktur des InIB₃₂₁ konnte die direkte Fusion einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne an das C-terminale Ende der LRR-Domäne beobachtet werden (Schubert *et al.*, 2001). Da diese Immunglobulin-ähnliche Domäne für die Bindung des InIB an seinen Rezeptor nicht benötigt wird, wurde vermutet, dass sie einen Beitrag zur Stabilisierung der Internalin-Superdomäne hat.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose (ultra pure)	Biozym, Hameln
Ammoniumperoxydisulfat	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bacto Yeast extract	Difco, Detroit (USA)
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis (USA)
1,4-Dithioerythrit	Roth, Karlsruhe
1,4-Dithiothreit	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glutathion, reduziert	Boehringer Mannheim
Guanidiniumchlorid (ultra pure)	ICN Biomedicals, Ohio (USA)
Harnstoff (ultra pure)	ICN Biomedicals, Ohio (USA)
HEPES	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Pefabloc SC	Roche, Mannheim
Rotiphorese Gel30	Roth, Karlsruhe
Serva Blau R250	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Tris	USB Corporation, Ohio (USA)

Alle nicht eigens aufgeführten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt oder von Sigma, St. Louis (USA) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p. a.. Zur Herstellung von Puffern und sonstigen Lösungen wurde entweder quarzbidestilliertes Wasser oder Reinstwasser (millipore-gereinigtes Wasser) verwendet.

2.1.2 Standards und Kits

DNA-Längenstandard	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Protein-Molekulargewichts-Marker (Low Range und High Range)	Sigma, St. Louis (USA)
QIAprep spin (Miniprep Kit 50)	Qiagen, Hildesheim

2.1.3 Enzyme und Proteine

Benzonase (10000 U/ml)	Merck, Darmstadt
PreScission-Protease	Amersham Biosciences, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
	New England Biolabs, Schwalbach

Die Mutante des InlB₃₂₁ in welcher fünf aromatische Aminosäuren gegen Serine ausgetauscht sind, wurde freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Heinz (GBF, Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Medien, Antibiotika und Puffer

<u>LB-Medium:</u>	10 g l ⁻¹	Bacto Trypton
	5 g l ⁻¹	Bacto Yeast Extract
	5 g l ⁻¹	NaCl
	1.5 % (w/v)	Bacto Agar (nur für Kulturplatten)
		mit 1 N NaOH auf pH 7.5 eingestellt und autoklaviert

Antibiotika-Stammlösungen:

Ampicillin (Amp) 100 mg ml⁻¹ in *aqua bidest*
Die Stammlösung wurde dem Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

Chloramphenicol (Cm) 34 mg ml⁻¹ in 70 % (v/v) Ethanol
Die Stammlösung wurde dem Medium im Verhältnis 1:685 zugesetzt.

IPTG-Stammlösung: 238.3 g l⁻¹ in *aqua bidest*
Die Stammlösung wurde dem Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

Alle Stammlösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

<u>PBS-Puffer:</u>	140.0 mM	Natriumchlorid
	2.7 mM	Kaliumchlorid
	10.0 mM	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
	1.8 mM	Kaliumdihydrogenphosphat

Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7.4 eingestellt.

<u>PreScission-Protease Puffer:</u>	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT

Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7.0 eingestellt.

<u>TAE-Puffer:</u>	40 mM	Tris
	1 mM	EDTA

Die Lösung wurde mit Acetat auf pH 8.0 eingestellt.

2.1.5 Sonstiges Material

Dialyseschläuche Spectra/Por	Spectrum, Houston (USA)
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Kunststoff-Fluoreszenz-Küvetten	Semadeni, Ostermundigen (Schweiz)
PD10 Gelfiltrationssäule	Amersham Biosciences, Freiburg
Quarzglas-Suprasil-Küvetten	Hellma, Müllheim
Q-Sepharose fast flow	Amersham Biosciences, Freiburg
Sterilfilter (0.2 µm)	Renner, Darmstadt
Superdex 75 <i>prep grade</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
Ultrafiltrationsmembran YM10, YM30	Amicon, Witten

2.1.6 Geräte

Absorptionsspektrometer	Varian Cary 50 Probe Jasco V-560 Uvikon 923 (Bio-Tek Kontron Instruments)
Fluoreszenzspektrometer	Spex FluoroMax™ (Instruments S.A.) Spex FluoroMax-2® (Instruments S.A.) JOBIN YVON HORIBA Fluoromax-3® Fluorolog (Jobin Yvon Horiba)
Spektropolarimeter	J-715 (Jasco)

<i>stopped-flow</i> -Geräte	SX.18MV <i>stopped-flow</i> Spektrofluorimeter (Applied Photophysics)
<i>Differential Scanning Calorimeter</i>	π^* -180 <i>stopped-flow</i> CD-Spektropolarimeter Microcal™ Inc. VP-DSC MicroCalorimeter
Chromatographieeinheiten	Uvicord SII, Pumpen P-1 und P-500, GradiFrac und RediFrac, HighLoad System
Elektrophoreseeinheiten	Mighty Small SE250 (Hoefler) Agargel Mini (Biometra)
Blotting System	Fast Blot B33 (Biometra)
Spannungsquellen	Bio 105, PP4000 (Biometra)
Zentrifugen	MR22i (Jouan), RC-28S (Sorvall), Discovery M150 (Sorvall), RC-26Plus (Sorvall), Centrifuge 5415C (Eppendorf), Biofuge pico (Heraeus)
pH-Meter	pH 597 (WTW)
Kryostaten	F1 und F3 digital (Haake)
Thermocycler	Biometra TGradient (Biometra)
Waagen	Feinwaage 434 (Kern) Analysenwaage BP 121 (Sartorius)
French Press	French Pressure Cell Press (SLM Aminco Instr. INC)
Videodokumentationsanlage	Mitsubishi video copy processor P90, Biorad GelDoc 2000
Refraktometer	Zeiss Optron
Bakterienkulturschüttler	Innova 2300 Platform Shaker (New Brunswick Scientific)
Brutschränke	WB 540K (Mytron)
Heizblock	BT 100 (Kleinfeld Labortechnik)
Ultrafiltrationszelle	Amicon® 8050

2.1.7 Organismen

E. coli DH5 α

Invitrogen (Hanahan, 1983)

F⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1* *endA1* *hsdR17*(r_k⁻,m_k⁺) *phoA* *supE44* λ *thi-1* *gyrA96* *relA1*

<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novogene (Studier & Moffatt, 1986) F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcm (DE3)
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL	Stratagene (Weiner <i>et al.</i> , 1994) F ⁻ ompT hsdS (r _B ⁻ , m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r galλ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]

2.1.8 Plasmide

Die Expression der *inlB*-Gene erfolgte mit Plasmiden des Glutathion-S-transferase (GST) Gene Fusion Systems (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Plasmide wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Heinz zur Verfügung gestellt.

Bei dem Ausgangsplasmid pGEX-6P-1 handelt es sich um einen Expressionsvektor, welcher in *E. coli* ein GST-Fusionsprotein produziert. Das Gen, welches für das 26 kDa-Protein GST aus *Schistosoma japonicum* kodiert, besitzt eine C-terminale *multicloning-site* (MCS). Das resultierende Fusionsprotein liegt somit am N-Terminus mit der GST fusioniert vor. Das Gen der GST steht unter der Kontrolle des vom Bakteriophagen T7 abgeleiteten *lac*-UV5/*tac*-Promotor-Systems. Die Induktion erfolgte durch das Laktoseanalogon Isopropyl- α -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) (Dubendorff & Studier, 1991a,b). Eine Selektion der transformierten Bakterienstämme wurde durch eine Ampicillinresistenz, vermittelt durch das β -Lactamase-Gen, erreicht. In Tabelle 2.1 ist eine Übersicht über die verwendeten rekombinanten Plasmide gegeben. Die Zahlen unmittelbar nach der Bezeichnung InlB stehen für die letzte C-terminale Aminosäure im Protein.

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten rekombinanten Plasmide

Plasmid	Größe	Beschreibung	Referenz
pGEX-inlB248	5.9 kb	pGEX-inlB321 mit Stop-Codon anstelle des Codons für das Histidin 249 von <i>inlB</i>	Prof. Heinz (GBF)
pGEX-inlB241	5.9 kb	pGEX-inlB321 mit Stop-Codon anstelle des Codons für das Cystein 242 von <i>inlB</i>	Prof. Heinz (GBF)
pGEX-inlB321	6.1 kb	550-1230 bp <i>NcoI/BamHI</i> - <i>inlB</i> -Fragment aus <i>L. monocytogenes</i> in pGEX-6P-1	Schubert <i>et al.</i> , 2001
pGEX-inlB321C242S	6.1 kb	pGEX-inlB321 mit Serincodon anstelle des Codons für das Cystein 242 von <i>inlB</i>	Prof. Heinz (GBF)
pGEX-inlB321W124S/C242S	6.1 kb	pGEX-inlB321 mit Serincodon anstelle des Codons für das Tryptophan 124 und des Codons für das Cystein 242 von <i>inlB</i>	diese Arbeit

2.1.9 Oligodesoxynukleotide

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bzw. MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen und in lyophilisierter Form geliefert. Die DNA wurde in sterilem H₂O resuspendiert, auf 120 pmol μ l⁻¹ verdünnt und bei -20 °C gelagert. In Tabelle 2.2 sind die in

dieser Arbeit für die ortsgerichtete Mutagenese und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Tab. 2.2: Mutagenese- und Sequenzierprimer

Mutageneseprimer		T _m [°C]
5' W124SMutF	5' -GCAA <u>ACTTG</u> AAAAATTTAGGA <u>AGC</u> TTTTTTTTTAGACG-3'	72.9
3' W124SMutF	3' -CGTTTGA <u>ACTTTTT</u> TAAATCCT <u>TCG</u> GAAAAAAATCTGC-5'	
Sequenzierprimer		
pGEX6P-1F	5' -GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'	67.8
pGEX6P-1R	5' -CCTCTGACACATGCAGCTCCCGG-3'	67.8
W124S Seq F	5' -GGACCTAAGTTCGCTCAAG-3'	59.0
W124S Seq R	5' -GTGGTTGGGTTACTCTCC-3'	56.7

Die für die ortsgerichtete Mutagenese ausgetauschten Nukleotide sind fettgedruckt und unterstrichen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Experimente wurden bei Raumtemperatur mit sterilisierten Lösungen und Gefäßen durchgeführt.

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der *E. coli* Kulturen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in LB-Medium bei 37 °C, welchem bei Bedarf das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde. Zur längerfristigen Lagerung der *E. coli*-Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 0.8 ml einer stationären Übernachtskultur (üN) mit 0.2 ml 87 % (v/v) Glycerol versetzt, 2 bis 4 h auf Eis inkubiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Reinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Miniprep)

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse, unter Verwendung des QIAprep Kits (Birnboim & Doly, 1979). Die Plasmid-Präparation wurde mit Hilfe des QIAprep-MiniSpin Kits nach genauer Anleitung des Herstellers gewonnen. Die Präparation erfolgte aus 3 ml *E. coli* üN-Kulturen, die bei 37 °C kultiviert wurden. Die Plasmid-DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Mutation wurden unter Verwendung des QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach genauer Anleitung des Herstellers eingeführt. Die für die Mutagenese konstruierten Primer (Tabelle 2.2) wurden auf 12 pmol µl⁻¹ verdünnt und die Polymerase Ketten Reaktion (PCR)-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

10 x <i>Pfu</i> Reaktionspuffer	5 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0.5 µl
Matrizen-DNA	5 – 50 ng
5'-Primer (12 pmol µl ⁻¹)	1 µl
3'-Primer (12 pmol µl ⁻¹)	1 µl
<i>Pfu</i> Turbo DNA-Polymerase (2.5 U µl ⁻¹)	1 µl
H ₂ O (steril)	ad 50 µl

Amplifikationsbedingungen:

initiale Denaturierung		30 s	95 °C
Zyklus (16 x):	Denaturierung	30 s	95 °C
	Anlagerung	1 min	55 °C
	Elongation	7 min	68 °C
Endtemperatur		∞	4 °C

Nach Beendigung der PCR wurden die jeweiligen Ansätze mit der Endonuklease DpnI für 1 h bei 37 °C verdaut.

2.2.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der ortsgerichteten Mutagenese, wurde die Plasmid-DNA sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte als Auftragsarbeit an der Universität Potsdam (Institut für Biochemie und Biologie) bei Prof. Tiedemann. Die Sequenzierung wurde an einem 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt.

2.2.5 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation von kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen erfolgte gemäß der Vorschrift nach Hanahan (1983; 1985), die von *E. coli* BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL-Zellen nach der Vorschrift des Herstellers (Stratagene).

Die kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl der *E. coli* BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL-Zellen wurde 2 µl XL10-Gold β-Mercaptoethanol Mix gegeben und diese dann 10 min lang alle 2 min vorsichtig auf Eis gemischt. Anschließend wurden die Zellen mit der Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein 20 sekündiger Hitzeschritt bei 42 °C. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor 1 ml vortemperiertes LB- oder SOC-Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert wurde. Es wurden dann 100 – 200 µl der Kulturen auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook, 1989)

Zur analytischen sowie zur präparativen Auftrennung von DNA wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Den Gelen wurde 1/10000 Volumen einer Ethidiumbromidlösung (10 mg ml⁻¹) zugesetzt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x

DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei Gelen in der Größe von 6.5 x 9 cm bei 80 V, bei Gelen von 10 x 10 cm bei 100 V konstanter Spannung.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Produktion rekombinanter Fusionsproteine

Die Reinigung der verschiedenen Internalin B Konstrukte erfolgte ausschließlich mit Hilfe des GST-Fusionssystems (Amersham Biosciences). Durch die spezifische Wechselwirkung der GST mit Glutathion (GS), das kovalent an Sepharose 4B gebunden vorliegt (Amersham Biosciences), können diese Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie in einem einzigen Schritt aus einem Zellextrakt gereinigt werden. Im Fusionsprotein befindet sich zwischen dem C-Terminus der GST und dem N-Terminus des Zielproteins ein *linker*. Dieser *linker* besteht aus einer bestimmten Aminosäure-Sequenz (Leu-Glu-Val-Leu-Phe-**Gln***-**Gly**-Pro), welche spezifisch von einer Protease, der sogenannten PreScission-Protease (Amersham Biosciences), erkannt wird. Da die Spaltung zwischen den Aminosäuren Glutamin und Glycin erfolgt, besitzt jedes InlB-Konstrukt am N-Terminus zusätzlich das Dipeptid Glycin-Prolin. Bei der PreScission-Protease handelt es sich ebenfalls um ein GST-Fusionsprotein, welches nach der Spaltung des Zielproteins gemeinsam mit dem abgespaltenen GST affinitätschromatographisch aus der Lösung entfernt werden kann.

Alle im folgenden beschriebenen Chromatographieschritte erfolgten bei 4 °C mit filtrierten und entgasten Puffern. Bei der Reinigung der beiden Cystein-haltigen InlB-Konstrukte, InlB₂₄₈ und InlB₃₂₁, enthielten die bei der Reinigung verwendeten Puffer zusätzlich 1 mM DTE. Der Verlauf und Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte wurde stets mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft.

2.3.1.1 Anzucht und Induktion von Bakterien

Die Anzucht der Bakterien, welche das Fusionsprotein für die Reinigung überexprimierten, erfolgte bei 37 °C. Mit einer Übernachtkultur des entsprechenden plasmidtragenden *E. coli*-Stammes BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL wurde die Hauptkultur (1 bis 2 l LB_{Amp,Cm}-Medium) im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer Zelldichte von OD_{550nm} = 0.8 bis 1.0 im Schüttelinkubator (200 rpm) kultiviert. Die Synthese des GST-Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach Inkubation über Nacht, wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 4500 rpm geerntet (Sorvall RC 26 Plus – SLA3000 Rotor). Das Zellpellet wurde entweder bei –20 °C gelagert oder mehr als 45 min lang eingefroren und anschließend in ca. 30 ml

kalttem PBS-Puffer auf Eis resuspendiert. Dem PBS-Puffer wurden zuvor 300 µl 40 mM Pefabloc, 100 µl 0.5 M EDTA und 5 µl Benzonase (50 U) zugesetzt.

2.3.1.2 Zellaufschluss

Die Lyse der Zellen erfolgte durch zweimaligen French-Press-Aufschluß in einer 45 ml French-Press-Zelle bei maximal 18000 psi. Das Lysat wurde 1.5 h bei 4 °C und 18000 rpm (Sorvall RC26 Plus – SS-34 Rotor) zentrifugiert. Der klare Überstand enthielt die löslichen Zellproteine. Das Pellet wurde verworfen.

2.3.1.3 Proteinreinigung

Der Zellextrakt mit dem löslichen Anteil an *E. coli*-Gesamtzellproteinen wurde in ein 50 ml-Reagenzröhrchen mit 12 bis 20 ml in PBS-Puffer äquilibrierter Glutathion-Sepharose (GS; Äquilibration nach Angabe des Herstellers) gegeben und für 1 bis 3 h auf einem Überkopffrotator bei 4 °C inkubiert. Nach Immobilisierung der GST-Fusionsproteine, wurde die GS in eine Chromatographie-Säule (1 x 20 cm bzw. 1 x 10 cm) gegossen und unspezifisch gebundene Proteine mit einem 20-fachen des Säulenvolumens an PBS-Puffer durch Waschen entfernt. Nach Erreichen der Extinktion des Pufferwertes (OD_{280nm}), erfolgte die Elution des GST-Fusionsproteins mit 100 ml 10 mM reduziertem Glutathion (GSH) in 50 mM Tris/HCl pH 8.0. Die das GST-Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen PreScission-Protease-Puffer dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung in ein Becherglas überführt und mit 1/1000 des Gesamtvolumen der Proteinlösung mit PreScission-Protease versetzt. In der Regel wurde der Verdauungsansatz übers Wochenende (> 30 h) bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Proteolyse wurde die Proteinlösung mit regenerierter und frisch äquilibrierter GS inkubiert. Dies erfolgte entweder unter Rotation (wie oben beschrieben) bzw. durch Auftragen auf die GS-Säule mit Hilfe einer Peristaltik-Schlauchpumpe bei langsamem Fluss (ungefähr 0.2 bis 0.5 ml min⁻¹). Die Säule wurde bis zum Erreichen der Extinktion des Pufferwertes (OD_{280nm}) mit PBS gespült und der Durchlauf enthielt das Zielprotein. Auf der GS-Säule befanden sich das abgetrennte GST, die PreScission-Protease, sowie nicht vollständig verdautes Fusionsprotein.

Um noch teilweise vorhandene Verunreinigungen vom Zielprotein abzutrennen, wurde als letzter Reinigungsschritt eine Gelfiltration durchgeführt. Verwendet wurde eine HiLoad Superdex 75 *prep grade* Säule, auf welche jeweils 1 ml einer mittels Amicon (Ausschlussgröße der Membran betrug 10000 Da) aufkonzentrierten Proteinlösung aufgetragen wurde. Als Laufpuffer wurde 20 mM HEPES/NaOH, 300 mM NaCl pH 7.5 verwendet. Die Sauberkeit der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

In Tabelle 2.3 sind die Molekularmassen der Fusionsproteine und der nach dem Verdau resultierenden InlB-Fragmente, sowie deren Aminosäureanzahl und Anzahl der Cystein- und Tryptophanreste angegeben. Im Anhang ist die Aminosäuresequenz der Internalin-Superdomäne angegeben.

Tab. 2.3: Rekombinant exprimierte InlB-Konstrukte

Protein	Fusionsprotein [kDa]	InlB-Konstrukt [kDa]	Anzahl der Aminosäuren	Anzahl der Cysteine	Anzahl der Tryptophane
InlB ₂₄₈	50	24.1	218	1	1
InlB ₂₄₁	49.3	23.3	211	0	1
InlB ₃₂₁	58.3	32.3	291	1	2
InlB ₃₂₁ *	58.3	32.3	291	0	2
InlB ₃₂₁ *W124S	58.3	32.3	291	0	1

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse erfolgte im elektrischen Feld durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach King & Laemmli (1971) unter denaturierenden Bedingungen. Die verwendeten Gele hatten eine Acrylamidkonzentration von 12.5 % (w/v) und eine Größe von 20 x 20 x 0.15 cm für Reinigungsgele und 10 x 8 x 0.075 cm für analytische Gele. Für die SDS-PAGE wurden die Proteinproben mit je einem fünftel Volumen Auftragspuffer (325 mM Tris/HCl pH 6.8, 500 mg ml⁻¹ Glycerin, 0.5 mg ml⁻¹ Bromphenolblau, 10 mM DTE) und 10 %iger (w/v) SDS-Lösung versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für große Gele bei 250 V bzw. für kleine Gele bei 120 V konstanter Spannung. Als Laufpuffer wurde das Puffersystem nach Fling & Gregerson (1986) verwendet.

2.3.3 Proteinfärbung

2.3.3.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde nach einer modifizierten Methode nach Fairbanks *et al.* (1971) durchgeführt. Die Gele wurden dabei zunächst 10 min in einer Mischung aus 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig und 0.1 % (w/v) Serva Blau R250 vorinkubiert. Anschließend erfolgte die weitere Färbung der Gele entsprechend den Angaben in Fairbanks *et al.* (1971). Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0.2 – 0.5 µg Protein mm⁻² Gel.

2.3.3.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode, wie sie in Heukeshoven und Dernik (1985) beschrieben ist. Bei dieser Methode liegt die Sensitivität bei etwa 0.05 – 0.1 ng Protein mm⁻² Gel.

2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration und der Extinktionskoeffizienten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte ausschließlich auf spektroskopische Weise durch Absorptionsmessung mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes.

Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten bei 280 nm für das native Protein erfolgte nach der Methode nach Pace *et al.* (1995). In Tabelle 2.4 sind die für die denaturierten Proteine berechneten molaren und die experimentell bestimmten molaren bzw. spezifischen Extinktionskoeffizienten für die in dieser Arbeit verwendeten nativen Proteine angegeben.

Tab. 2.4: Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine ($\epsilon_{280\text{nm}}$)

Protein	berechneter molarer Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]	molarer Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]	spezifischer Extinktionskoeffizient [ml mg ⁻¹ cm ⁻¹]
InlB ₂₄₈	9560	9798	0.41
InlB ₂₄₁	9530	10258	0.44
InlB ₃₂₁	17810	18069	0.55
InlB ₃₂₁ *	17780	18576	0.57
InlB ₃₂₁ *W124S	12090	12908	0.40
Fünffachmutante des InlB ₃₂₁	9530	9530	0.29

Bei der fünffachen Aromatenmutante des InlB₃₂₁ handelt es sich um den für das denaturierte Protein theoretisch berechnete Extinktionskoeffizient. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des gcg-Programmes.

2.3.5 Proteintransfer auf Membranen (Westernblot)

Der Proteintransfer aus SDS-PAGE auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen erfolgte durch *Semidry-Elektroblotting* (Khyse-Andersen, 1984). Nach der SDS-PAGE (Durchführung wie unter 2.3.2) wurde das Trenngel für 15 min im Transferpuffer (100 mM CAPS/NaOH pH 11, 10 % Methanol) äquilibriert. Eine Transfermembran von der Größe des Trenngels wurde für 2 min in Methanol aktiviert und anschließend für 4 min im Transferpuffer inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden drei Schichten Whatman-Papier von der Größe des Gels kurz in Transferpuffer getränkt und auf die Anodenplatte der Transferkammer platziert. Darüber wurde luftblasenfrei die Transfermembran und anschließend das Gel geschichtet. Zwischen das Gel und die Kathodenplatte wurden erneut drei Schichten Whatman-Papier gelegt. Bei einer konstanten Stromstärke von 1.8 mA cm⁻² Membranfläche erfolgte schließlich der Transfer. Nach Beendigung des Transfervorganges wurde die Membran für die N-terminale Sequenzanalyse weiterbehandelt.

2.3.6 N-terminale Proteinsequenzierung

Der N-Terminus von Proteinen kann durch wiederholten Edman-Abbau und die darauffolgende Identifizierung der abgespaltenen Aminosäuren ansequenziert werden.

Die Sequenzierung erfolgte als Auftragsarbeit in der Gruppe von Prof. Heinz an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig. Verwendet wurde ein Gasphasensequenzator des Typs ABI 494A Procise HT (Applied Biosystems).

2.3.7 Titration von freien Thiolgruppen mit DTNB (Ellman's Assay)

Mit Hilfe des Ellman's Assay kann die Zahl an freien und/oder zugänglichen Thiolgruppen in Proteinen ermittelt werden. Der Vergleich der Zahl der Cysteine im nativen und im denaturierten Zustand erlaubt es, eine Aussage über das Vorhandensein von Cysteinen an der Oberfläche und über deren Zugänglichkeit zu machen (Ellman, 1958; Darby & Creighton, 1995). Im Ellman's Assay reagiert das Reagenz 5,5'-Dithio-bis-Nitrobenzoesäure (DTNB) mit der SH-Gruppe zu einem gemischten Disulfid, das mit einer weiteren SH-Gruppe reagiert. Dabei wird das gelbe Nitrothiobenzoat in stöchiometrischen Mengen gebildet. Misst man die Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm, so kann man mit dem Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{412\text{nm}} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei bekannter Proteinkonzentration die Zahl der SH-Gruppen berechnen.

Von einer 0.85 mg ml^{-1} konzentrierten Proteinlösung, wurde 1 ml auf eine PD10 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences) aufgetragen und mit 3 x 5 ml 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, 2 mM EDTA pH 6.5 eluiert. Es wurden Fraktionen von je 1 ml aufgefangen und mittels Absorption der Gehalt an Protein bestimmt. In einem Gesamtvolumen von 620 μl , wurden 550 μl Protein mit 50 μl 200 mM Tris/HCl pH 9 und 20 μl DTNB-Lösung (1.35 mg ml^{-1}) versetzt. Das Protein lag in einer Endkonzentration von 0.5 mg ml^{-1} vor. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion gemessen. Zur Messung der Pufferkontrolle wurde an Stelle des Proteins die gleiche Menge Elutionspuffer hinzugegeben.

2.4 Biophysikalische Methoden

Für alle im folgenden beschriebenen Messungen zur Stabilität und Faltung wurden die verschiedenen Proteinlösungen gegen den jeweiligen Puffer dialysiert und anschließend für 30 min bei 4 °C und 40000 rpm zentrifugiert, um Aggregate und andere Schwebeteilchen zu entfernen.

2.4.1 Absorptionsspektroskopie

Die UV-Spektren wurden im Bereich von 240 bis 350 nm bei Raumtemperatur aufgenommen und gegen den jeweiligen Puffer korrigiert. Neben der Konzentrationsbestimmung (siehe 2.3.4), wurde die UV/VIS-Spektroskopie auch zur Abschätzung der Verunreinigung der Proteinprobe durch Nukleinsäuren (Absorption bei 260 nm), sowie zum Nachweis von Aggregaten eingesetzt, welche aufgrund ihrer Größe das Licht oberhalb von 300 nm streuen und so eine Verschiebung der Grundlinie hervorrufen.

2.4.2 Fluoreszenzspektroskopie

Alle Fluoreszenzmessungen wurden an einem Spex-FluoroMax-Spektrofluorometer mit thermostatisierten Küvettenhalter durchgeführt. Die Aufnahme von Spektren und die Messung von

Kinetiken erfolgte in Quarzglasküvetten (Firma Hellma). Alle Messungen wurden gegen den jeweiligen Puffer korrigiert. Die verwendeten Pufferlösungen waren filtriert (0.2 µm Porenfilter) und entgast.

2.4.2.1 Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenzspektren wurden bei 20 °C bei einer Anregungswellenlänge von 280 bzw. 295 nm und einem Emissionswellenlängenbereich von 290 bis 450 nm bzw. 300 bis 450 nm aufgezeichnet. Der Messpunktabstand betrug 0.5 nm mit einer Integrationszeit von 1 s. Die spektralen Bandbreiten für die Anregung und die Emission lagen bei 3 und 6 nm.

2.4.2.2 Fluoreszenzkinetiken

Zur Messung von De- und Renaturierungskinetiken, wurde die Proteinlösung unter Rühren direkt 1:50 in eine Fluoreszenzküvette verdünnt. Beim manuellen Mischen erfolgte der Beginn der Registrierung der Messdaten erst nach dem Zusammenmischen des Proteins mit dem Renaturierungspuffer. Das Zeitfenster zwischen Mischung und Startpunkt der Kinetik lag bei ungefähr 3 bis 5 s. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 328 nm für die Konstrukte InlB₃₂₁ und InlB₃₂₁*, 314 nm für InlB₃₂₁*W124S und 343 nm für InlB₂₄₈ bzw. InlB₂₄₁. Bei diesen Wellenlängen ist die Differenz zwischen dem Fluoreszenzspektrum des nativen Proteins und dem des denaturierten Proteins maximal. Die spektralen Spaltbreiten lagen bei 2.5 nm für die Anregung und 5 nm für die Emission. Die genauen Messbedingungen, wie Temperatur, Puffer und Proteinkonzentration, sind bei den jeweiligen Abbildungen angegeben.

2.4.2.3 stopped-flow-Experimente

Die *stopped-flow*-Experimente wurden an einem Applied Photophysics SX18.MV System durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm und die Emission wurde mit Hilfe eines *cut-off* Filters bei 305 nm detektiert. Die spektrale Spaltbreite der Anregung lag bei 4.65 nm. De- bzw. Renaturierungskinetiken wurden durch eine 1:11 Verdünnung im jeweiligen Puffer eingeleitet und in einem typischen Experiment wurden 8 bis 10 Einzelmessungen gemittelt. Alle Messungen erfolgten, wenn nicht anders angegeben bei 10 °C.

2.4.2.4 ANS-Fluoreszenzspektroskopie

8-Anilino-1-Naphthalensulfonsäure (ANS) ist ein Reagenz, welches an exponierte, hydrophobe Bereiche von Proteinen binden kann. Aufgrund dieser Bindung verstärkt sich die Fluoreszenz des ANS (Stryer, 1965; Ptitsyn *et al.*, 1990).

Es wurde eine Stammlösung von 30 mM ANS in Wasser angesetzt. Zu der Proteinlösung wurde ANS im Verhältnis vom 1- bis 100-fachen molaren Überschuss zugegeben und ungefähr 60 min bei 4 °C

inkubiert. Anschließend wurde die ANS-Fluoreszenz bei 350 nm angeregt und Spektren zwischen 400 und 600 nm bei 10 °C aufgenommen.

2.4.2.5 Fluoreszenzlöschung mittels Acrylamid

Die Charakterisierung der Lösungsmittelzugänglichkeit von Tryptophanresten in Proteinen kann über die Fluoreszenzlöschung (Fluoreszenz*quench*) erfolgen. Hierunter wird ein molekularer Prozess verstanden, der zu einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität eines Systems führt. Solch eine Löschung der Tryptophanfluoreszenz kann durch einen externen *Quencher* verursacht und das Ausmaß der Löschung bestimmt werden. Als *Quencher* wurde Acrylamid verwendet.

Zu 2.5 ml einer 10 µg ml⁻¹ konzentrierten Proteinlösung wurde zehnmal 25 µl einer 1 M Acrylamidlösung pipettiert. Es wurde 3 min inkubiert und anschließend ein Fluoreszenzspektrum im Wellenlängenbereich von 300 bis 450 nm aufgezeichnet. Die Anregungswellenlänge lag bei 295 nm, der Messpunkt Abstand betrug 0.5 nm und die Integrationszeit 0.1 s. Die spektralen Bandbreiten für die Anregung und die Emission lagen bei 2.5 und 5 nm. Alle Messungen wurden bei 10 °C durchgeführt.

Die Auswertung der Fluoreszenzlöschung erfolgte nach der Stern-Volmer-Gleichung:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (GL. 2.1)$$

wobei F für die Ausgangsfluoreszenz bei 355 nm, F₀ für die volumenkorrigierte Ausgangsfluoreszenz, K_{SV} für die *Quench*-Konstante und [Q] für die Konzentration des *Quenchers*, in dem Falle Acrylamid, steht. Die *Quench*-Konstante wird in M⁻¹ angegeben.

2.4.3 CD-Spektroskopie

Alle CD-Messungen wurden an einem Jasco J-715 Spektropolarimeter durchgeführt. Die Aufnahme von Spektren und die Messung von Kinetiken erfolgte in Quarzglas-Küvetten (Firma Hellma). Jede Messung wurde gegen den jeweiligen Puffer korrigiert. Die verwendeten Pufferlösungen waren filtriert (0.2 µm Porenfilter) und entgast.

2.4.3.1 Nah- und Fern-UV-CD-Spektren

Es wurden Nah-UV-CD-Spektren im Bereich von 350 bis 250 nm und Fern-UV-CD-Spektren im Bereich von 250 bis 180 nm aufgenommen. Messpunkte wurden alle 0.5 nm bei einer Messgeschwindigkeit von 20 nm min⁻¹ detektiert. Die Bandbreite lag bei 1 bzw. 2 nm und es wurde immer über 15 Spektren gemittelt. Alle Spektren wurden gegen den entsprechenden Puffer korrigiert. Die genauen Messbedingungen, wie Proteinkonzentration, Temperatur und verwendeter Puffer sind den Abbildungen zu entnehmen.

Als quantitatives Maß für die Ausprägung einer Struktur wird die Elliptizität Θ (in Grad) herangezogen. Für den Vergleich von Nah- und Fern-UV-CD-Spektren muss die Elliptizität noch auf

die Konzentration der Proteinlösung und die Schichtdicke der verwendeten Küvette normiert werden. Für einen Vergleich von Fern-UV-CD-Spektren unterschiedlicher Proteine, wurden diese anschließend noch in die mittlere molare Elliptizität $[\Theta]_{MRW}$, bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure, umgerechnet. Folgende Formel fand dabei Anwendung (Schmid, 1997):

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A} \quad (Gl. 2.2)$$

mit:

$[\Theta]_{MRW}$:	Molare Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure [$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$]
Θ	:	gemessene Elliptizität [mdeg]
M_r	:	Molekulargewicht des jeweiligen Proteins [g dmol^{-1}]
c	:	Proteinkonzentration [mg ml^{-1}]
d	:	Schichtdicke der Küvette [cm]
N_A	:	Anzahl der Aminosäuren im Protein

Für die quantitative Vorhersage von Sekundärstrukturen aus den CD-Spektren der Proteine, wurde das Software Paket CDPro mit den darin implementierten Programme CONTINLL, SELCON3 und CDSSTR verwendet (Sreerama & Woody, 2000). Die Analyse eines CD-Spektrums und dessen Sekundärstrukturvorhersage erfolgt dabei nach dem Prinzip, dass ein CD-Spektrum (C_λ) als eine lineare Kombination von Spektren individueller Sekundärstrukturelemente (k), $B_{k\lambda}$, angesehen werden kann. Mit f_k als Anteil der Sekundärstruktur k gilt dann:

$$C_\lambda = \sum f_k B_{k\lambda} \quad (Gl. 2.3)$$

Mit dem Wissen über $B_{k\lambda}$, kann mit Hilfe von Gleichung 2.3 der korrespondierende Anteil der Sekundärstruktur f_k an einem CD-Spektrum C_λ bestimmt werden. $B_{k\lambda}$ kann dabei von Polypeptiden, welche in spezifischen Konformationen vorliegen, erhalten werden. In einem Protein weicht die Sekundärstruktur jedoch von den idealen Konformationen ab, so dass $B_{k\lambda}$ in derzeitigen Vorhersageprogrammen aus einer Zusammenstellung von Protein-CD-Spektren mit bekannter Sekundärstruktur abgeleitet wird. Solch eine Zusammenstellung von Proteinen wird als Referenzsatz bezeichnet und stellt eine exaktere Repräsentation der einzelnen Komponentenspektren in einem Protein dar.

2.4.3.2 Thermische Denaturierung

Die thermische Stabilität der unterschiedlichen Internalin B-Konstrukte wurde im Fern-UV-CD-Bereich bei 220 bzw. 222 nm untersucht. Die Aufheizung der Probe erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1 K min^{-1} . Das CD-Signal wurde alle $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einer Integrationszeit von 1 s

bei einer Bandbreite von 2 nm registriert. Während der thermischen Aufheizung wurden alle 10 °C Spektren mit einer Messgeschwindigkeit von 100 nm min⁻¹ aufgenommen, um den Verlust der Sekundärstruktur verfolgen zu können. Die Proteinkonzentration und die Pufferbedingungen sind bei den Abbildungen angegeben.

2.4.3.3 Fern-UV-CD-Kinetiken

Zur Messung von De- und Renaturierungskinetiken wurde die Proteinlösung direkt unter Rühren 1:50 in eine Quarzglasküvette mit dem entsprechenden Puffer verdünnt. Die Proteinendkonzentration betrug 30 µg ml⁻¹. Die Kinetiken wurden bei 220 nm mit einer Bandbreite von 2 nm aufgezeichnet. Die Abstände der Messpunkte wurden an die jeweilige Kinetik angepasst und lagen zwischen 0.5 und 5 s.

2.4.3.4 stopped-flow-Experimente

Die *stopped-flow*-Experimente wurden an einem Applied Photophysics π*-180 System durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 220 nm mit einer Bandbreite von 4 nm. De- bzw. Renaturierungskinetiken wurden durch eine 1:11 Verdünnung im jeweiligen Puffer eingeleitet und in einem typischen Experiment wurden 4 bis 8 Einzelmessungen gemittelt. Alle Messungen erfolgten, wenn nicht anders angegeben bei 10 °C.

2.4.4 Gleichgewichtsentfaltung und -rückfaltung

Die Reversibilität der Entfaltung und Faltung von Internalin B wurde anhand von Gleichgewichtsübergängen untersucht. Dazu wurden Stammlösungen von nativem bzw. vollständig denaturiertem (5 M Harnstoff bzw. 3 M Guanidiniumchlorid (GdmCl) für InlB_{248/241} und 5 M GdmCl für alle InlB₃₂₁-Konstrukte) Protein in verschiedene De- bzw. Renaturierungspuffer verdünnt, so dass die Endkonzentration an Denaturierungsmittel zwischen 0 und 3 M GdmCl bzw. 0 und 5 M Harnstoff lag. Die Verdünnung der Stammlösungen erfolgte im Verhältnis 1:50. Dazu wurde das entsprechende Volumen an Proteinlösung in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und der 50-fache Überschuss an Puffer schnell hinzu pipettiert. Anschließend wurde das Eppendorf Reaktionsgefäß verschlossen und invertiert. Nach Inkubation von mindestens 24 h bei der jeweiligen Temperatur wurde jede Probe spektroskopisch analysiert. Für einen Fluoreszenzübergang wurde die Fluoreszenzemission bei 328 nm (für InlB₃₂₁ und InlB₃₂₁*), 314 nm (InlB₃₂₁*W124S) bzw. bei 343 nm (für InlB₂₄₈ bzw. InlB₂₄₁) für maximal 20 s gemittelt. Die Anregungswellenlänge lag bei 280 nm und die spektralen Bandbreiten für Anregung bzw. Emission waren 2.5 bzw. 5 nm. Neben 1 cm-Halbmikroküvetten (Firma Hellma) aus Quarz wurden auch fluoreszenzgeeignete 1 cm-Vollküvetten aus Kunststoff (Semadeni AG, Schweiz) verwendet, die eine direkte Langzeitinkubation der Probe in der Küvette ermöglichten. Für einen CD-Übergang wurde das CD-Signal bei 220 nm über insgesamt 30 s integriert. Die spektrale Bandbreite betrug 1 nm. Die genauen Pufferbedingungen und die Proteinkonzentrationen sind bei den jeweiligen Abbildungen zu finden.

2.4.5 pH-Gleichgewichtsübergang

Zur Charakterisierung der pH-Stabilität wurden Stammlösungen von nativem bzw. vollständig denaturiertem Protein (entweder durch GdmCl oder durch Ansäuerung) direkt 1:50 in Eppendorf Reaktionsgefäße mit dem jeweiligen Puffer der pH-Werte 2 bis 10 verdünnt und bei 10 bzw. 20 °C inkubiert. Die Proteinkonzentration in den Ansätzen betrug jeweils 10 µg ml⁻¹. Der verwendete Puffer hatte die folgende Zusammensetzung:

150 mM	KCl
10 mM	KH ₂ PO ₄
10 mM	Citrat
10 mM	Borat
pH 2 - 10	

2.4.6 Sprungexperimente zur Charakterisierung des langsamen Faltungsschrittes

Das Faltungsexperiment zur Charakterisierung von langsamen Faltungsreaktionen setzt sich aus 2 Sprüngen (Doppelsprungexperiment) zwischen verschiedenen GdmCl-Konzentrationen zusammen. Die Doppelsprungexperimente wurden ausschließlich als manuelle Handmischungsexperimente durchgeführt und mittels Fluoreszenz-Spektroskopie bei 10 °C verfolgt.

Bei diesem Assay wird das Protein zuerst vollständig entfaltet, um anschließend die Rückfaltung initiieren zu können. Die Rückfaltung wurde nach verschiedenen langen Denaturierungszeiten eingeleitet und der Verlauf der Entstehung von langsam faltenden Spezies beobachtet. Die InlB-Konstrukte wurden in Puffer-Bedingungen überführt (5 M GdmCl, 20 mM MOPS/NaOH, pH 7.5), unter denen sie in der Totzeit des Mischens denaturieren. Die Denaturierung fand bei einer Proteinkonzentration von 250 µg ml⁻¹ in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß im Wasserbad bei 10 °C statt. Nach verschiedenen Entfaltungszeiten wurde die Renaturierung durch 50-fache Verdünnung in eine Fluoreszenzküvette mit Nativpuffer (20 mM MOPS/NaOH, pH 7.5) bei 10 °C initiiert. Die Restkonzentration an GdmCl bei der Renaturierung betrug 0.3 M. Die Endkonzentration an Protein betrug 5 µg ml⁻¹. Die Renaturierungskinetiken wurden wie unter 2.4.2.2 beschrieben durchgeführt.

2.4.7 Refraktometrie

Die genaue Konzentration des jeweiligen Denaturierungsmittels (GdmCl bzw. Harnstoff) in den De- und Renaturierungsansätzen wurde über Messung des Brechungsindex der Lösung bestimmt. Die im Refraktometer ermittelten Werte wurden in die folgenden Gleichungen (Pace, 1986) eingesetzt:

$$[GdmCl] = 57.147 \cdot (\Delta n) + 38.68 \cdot (\Delta n)^2 - 91.6 \cdot (\Delta n)^3 \quad (Gl. 2.4)$$

$$[Harnstoff] = 117.66 \cdot (\Delta n) + 29.753 \cdot (\Delta n)^2 + 185.56 \cdot (\Delta n)^3 \quad (Gl. 2.5)$$

Der Term (Δn) steht dabei für die Differenz der Brechungsindizes der Lösungen mit und ohne Denaturierungsmittel und die Einheit für die Denaturierungsmittel ist M.

2.4.8 Massenspektrometrie

Die Molekularmassen der verschiedenen InIB-Konstrukte wurden mittels *Matrix Assisted Laser Desorption Induced-Time Of Flight*- (MALDI-TOF-) Massenspektrometrie bestimmt.

Dies erfolgte als Auftragsarbeit bei Dr. Sophie Haebel (Interdisziplinäres Zentrum für Massenspektrometrie von Biopolymeren, Universität Potsdam). Die Messungen wurden an einem Reflex II Bruker Massenspektrometer im linearen Modus durchgeführt. Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet.

2.4.9 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Im Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment wurden die Molekularmassen und der Oligomerisierungsgrad der Proteine bestimmt.

Alle AUZ-Experimente wurden als Auftragsarbeit bei Dr. Helmut Cölfen am Max-Planck Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung am Standort Golm von Antje Völkel durchgeführt. Die Messungen wurden bei 60000 rpm und einer Temperatur von 25 °C in einer Optima XLI Ultrazentrifuge von Beckman Coulter (Palo Alto) mit Absorptionsoptik durchgeführt. Als Auswerteprogramm wurde Sedfit (Schuck, <http://www.analyticalultracentrifugation.com>) verwendet.

2.4.10 Lichtstremessungen

Aus den Lichtstremessungen können Informationen bezüglich der Molekularmasse (statische Lichtstreuung) und Größe (dynamische Lichtstreuung) gelöster Proteinmoleküle erhalten werden.

Alle Lichtstremessungen wurden von Dr. Klaus Gast am Max Delbrück Zentrum für molekulare Medizin in Berlin-Buch durchgeführt. Sowohl die dynamischen als auch die statischen Streulichtmessungen wurden simultan mit dem gleichen Instrument und einem Streuwinkel von 90° gemessen. Das selbstgebaute Gerät besteht aus einem Argonlaser (Spectraphysics Millennia IIS), einem thermostatisierbaren Küvettenhalter und einem Photonendetektor (nähere Beschreibung in Gast *et al.*, 1997). Die Proteinlösung und der Puffer wurden durch einen Anotop-Filter mit einer Porengröße von 100 nm (Whatman, Maidstone, UK) direkt in eine kleine Durchflusszelle mit einer Zellenlänge von 0.8 und 1.5 mm (Hellma, Müllheim) filtriert. Die Molekülmasse wurde aus den relativen Streuintensitäten berechnet. Als Referenz wurde Toluol verwendet.

2.4.11 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die DSC-Messungen wurden mit einem Microcal™ Inc. VP-DSC MicroCalorimeter durchgeführt. Das Gerät besteht aus einer Proben- und Referenzzelle, welche mit einem System von Temperaturfühlern und Heizelementen ausgestattet sind. Die Zellen haben exakt das gleiche Volumen von etwa 0.5 ml und bestehen aus einer inerten Tantallegerung. Beide Zellen werden mit konstanter Heizrate aufgeheizt und befinden sich während der Messung unter einem Druck von ungefähr 193 bis 207 kPa, um bei hohen Temperaturen Blasenbildung zu vermeiden und das Sieden der Lösung zu

unterdrücken. Um die Zellen auf die gleiche Temperatur zu bringen, benötigt man unterschiedlich viel elektrische Leistung. Vollzieht sich in einer der Kammern eine temperaturinduzierte Reaktion, führt die auftretende Reaktionswärme zu einer minimalen Temperaturdifferenz ΔT . Wird ein solches Temperaturungleichgewicht zwischen Proben- und Referenzzelle durch die Steuerelektronik des Gerätes erkannt, wird in der einen Zelle der Heizstrom um ΔI erhöht und in der anderen erniedrigt. Der aufgetretene Wärmeeffekt wird kompensiert und die Bedingung $\Delta T = 0$ aufrecht erhalten. Diese Leistungsdifferenz wird als Funktion der Temperatur aufgezeichnet und ist direkt proportional zur Differenz der Wärmekapazitäten der gefüllten Zellen. Ergebnis eines solchen temperaturinduzierten Strukturüberganges ist die Aufzeichnung eines meist endothermen Peaks.

Alle Proteinproben wurden gegen den jeweiligen Puffer dialysiert und vor der Messung zentrifugiert. Der Dialysepuffer und die Proteinlösung wurden entgast und anschließend in die jeweilige Messzelle gefüllt. Für eine Messung wurden jeweils 1.2 ml Proteinlösung vorbereitet. Mit der Protein- und der Pufferlösung wurden zunächst die Proben- und Referenzzelle befüllt, die beiden Lösungen dann wieder vorsichtig entnommen und zur spektroskopischen Bestimmung der Konzentration verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit je 500 μl der entsprechenden Lösung gefüllt.

Um die Basislinienstabilität des DSC zu erhöhen, wurden vor den eigentlichen Messungen immer mehrere Pufferbasislinien aufgenommen. Waren die aufeinanderfolgenden Basislinien identisch, wurde noch eine Basislinie mit dem Dialysepuffer aufgenommen. Sofern nicht anders angegeben, wurde mit einer Heizrate von 1 K min^{-1} gearbeitet. Die genauen Pufferbedingungen und Proteinkonzentrationen sind bei den jeweiligen Abbildungen angegeben.

2.4.12 Mathematische Auswertung

2.4.12.1 Auswertung konformationeller Gleichgewichtsübergänge

Durch Zugabe von Denaturierungsmitteln oder die Änderung der Temperatur oder des pH-Wertes, kann eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen dem nativen (N) und dem entfalteten (U) Zustand eines Proteins hervorgerufen werden (Pace, 1986). Folgt diese Verschiebung dem einfachen Faltungsmechanismus



kann von einem Zweizustandsmodell ausgegangen werden (Tanford, 1968). Dies gilt jedoch nur für monomere Proteine, wie z. B. InlB. Unterscheidet sich der native vom entfalteten Zustand in einer physikalischen Größe y , wie z. B. einem spektroskopischen Signal, so kann die Gleichgewichtskonstante K_U berechnet werden:

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{(y_N - y_{obs})}{(y_{obs} - y_U)} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Der wichtigste thermodynamische Parameter, der ein reversibles konformationelles Gleichgewicht zwischen den Zuständen N und U beschreibt, ist die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_U . Diese ist über die Gleichgewichtskonstante K_U definiert:

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln K_U \quad (\text{Gl. 2.7})$$

Nimmt man an, dass die Proteinstabilität ΔG_U linear von der Denaturierungsmittelkonzentration ($[D]$) abhängt, so kann das sogenannte lineare Extrapolationsmodell angewendet werden (Santoro & Bolen, 1988):

$$\Delta G_U = \Delta G_U(H_2O) - m \cdot [D] \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Dabei steht m für die Kooperativität des konformationellen Überganges und $\Delta G(H_2O)$ für die Proteinstabilität in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (Tanford, 1970).

Für die spektroskopischen Eigenschaften des nativen bzw. entfalteten Proteins (y_N bzw. y_U) wurde ebenfalls eine lineare Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration angenommen:

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_{N,U} \cdot [D] \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Dabei stehen $y_{N,U}^0$ für die spektroskopischen Eigenschaften des nativen bzw. entfalteten Proteins in Abwesenheit des Denaturierungsmittels und $m_{N,U}$ für die Steigungen der Basislinien des nativen und entfalteten Proteins.

Die Auswertung der experimentellen spektroskopischen Datenpunkte der GdmCl- und Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergänge erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot 2000 durch nicht-lineare Regression mit der Messgröße y_{obs} in Gl. 2.10, die aus der Verknüpfung von Gl. 2.6 bis Gl. 2.9 hervorging (Santoro & Bolen, 1988; Pace & Shaw, 2000; Yadav & Ahmad, 2000):

$$y_{obs}([D]) = \frac{(y_N^0 + m_N \cdot [D]) + (y_U^0 + m_U \cdot [D]) \cdot e^{-\frac{\Delta G_0 - m \cdot [D]}{R \cdot T}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G_0 - m \cdot [D]}{R \cdot T}}} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

Zur Beschreibung der Energie wurde in dieser Arbeit anstelle von Joule (J) stets Kalorie (cal) verwendet (1 cal = 4.184 J).

Die Berechnung des Übergangsmittelpunktes C_m erfolgte nach Gl. 2.11 und wird in M Denaturierungsmittel angegeben:

$$C_m = \frac{\Delta G_U}{m} \quad (\text{Einheit: M}) \quad (\text{Gl. 2.11})$$

Die Auswertung thermisch-induzierten Übergänge, die mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie verfolgt wurden, erfolgte analog zu Gl. 2.10 mit der angepassten Form Gl. 2.12, bei welcher y_N und y_U linear von der Temperatur abhängen:

$$y_{obs}(T) = \frac{(y_N^0 + m_N \cdot T) + (y_U^0 + m_U \cdot T) \cdot e^{\frac{\Delta H_m^{v.H.} \cdot (T - T_m)}{R \cdot T}}}{1 + e^{\frac{\Delta H_m^{v.H.} \cdot (T - T_m)}{R \cdot T}}} \quad (Gl. 2.12)$$

Hierbei stehen T bzw. T_m für die Temperatur bzw. Schmelztemperatur und $\Delta H_m^{v.H.}$ für die Änderung der van't Hoff-Enthalpie während der Entfaltung bei T_m . $y_{N,U}^0$ steht wieder für die spektroskopischen Signale des nativen bzw. entfalteten Proteins bei $T = 0$ K.

2.4.12.2 Vorhersage thermodynamischer Parameter

Bei kleinen globulären Proteinen, zeigte sich eine lineare Korrelation der Kooperativität m während der Entfaltung zwischen der Lösungsmittelzugänglichkeit der Proteinoberfläche mit der Größe des Proteins (Myers *et al.*, 1995). Basierend auf dieser Korrelation kann eine Vorhersage der Parameter m für die GdmCl- und Harnstoff-induzierte Entfaltung und ΔC_p (Änderung der partiellen molaren Wärmekapazität) vorgenommen werden. Dies erfolgt mit den empirischen Gleichungen:

$$\Delta ASA = -907 + 93 \cdot (\# AS) \quad (\text{Einheit: } \text{Å}^2) \quad (Gl. 2.13)$$

$$m_{GdmCl} = 859 + 0.22 \cdot (\Delta ASA) \quad (\text{Einheit: } \text{cal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}) \quad (Gl. 2.14)$$

$$m_{Harnstoff} = 374 + 0.11 \cdot (\Delta ASA) \quad (\text{Einheit: } \text{cal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}) \quad (Gl. 2.15)$$

$$\Delta C_p = -251 + 0.19 \cdot (\Delta ASA) \quad (\text{Einheit: } \text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}) \quad (Gl. 2.16)$$

mit ΔASA als Änderung in der Oberflächenzugänglichkeit und $\#AS$ als Anzahl der Aminosäuren.

2.4.12.3 Auswertung der Entfaltungs- und Faltungskinetiken

Entfaltungs- und Faltungskinetiken wurden je nach Anzahl der Phasen mit Hilfe von Exponentialfunktionen angepasst. Aus den verwendeten Funktionen konnten die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen kinetischen Phasen gewonnen werden. Mit den Gleichungen 2.17 und 2.18 wurden exponentiell verlaufende Kinetiken ausgewertet. Je nach Verlauf der Kinetiken, ob abfallend bzw. ansteigend, mussten die Vorzeichen der Phasen, positiv bzw. negativ, verändert werden.

$$\text{Monoexponentielle Regression:} \quad y(t) = b + a \cdot e^{(-k \cdot t)} \quad (Gl. 2.17)$$

$$\text{Biexponentielle Regression:} \quad y(t) = b + a_1 \cdot e^{(-k_1 \cdot t)} + a_2 \cdot e^{(-k_2 \cdot t)} \quad (Gl. 2.18)$$

Dabei steht b für den Endwert der Kinetik, a , a_1 und a_2 für die Amplituden der jeweiligen Phase und k , k_1 und k_2 für die Geschwindigkeitskonstante der jeweiligen Phase in $[s^{-1}]$.

2.4.12.4 Auswertung der DSC-Messungen

Die Auswertung der DSC-Messungen wurde mit der in Origin implementierten Software von der MicroCal™ Software Inc. durchgeführt (Origin DSC). Dabei wurde zunächst nach der Pufferkorrektur die resultierende Leistungsdifferenz, welche direkt proportional zur partiellen Wärmekapazität des Proteins in der Probenzelle ist, in die partielle molare Wärmekapazität umgerechnet. Diese Umrechnung erfolgte mit Hilfe der molaren Proteinkonzentration, dem partiellen spezifischen Volumen des Proteins (für alle Proteine näherungsweise $0.73 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) und dem Zellvolumen (0.5069 ml). Aus der erhaltenen Wärmekapazitätsfunktion konnten folgende Größen erhalten werden:

- die Temperatur des Maximums des DSC-Profiles (im folgenden als DSC-Peak bezeichnet), die in erster Näherung der Schmelztemperatur T_m (bei der $\Delta G = 0$ ist) entspricht
- die molare Reaktionsenthalpie ΔH_{cal} , die wegen $\int C_{p,\text{ex.}} \cdot dT$ ($C_{p,\text{ex.}}$ ist die sogenannte „*excess heat capacity*“ in $\text{kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) der Fläche des kalorimetrischen Peaks entspricht
- die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p , die sich als Stufe ergibt, wenn man die linearen Abschnitte der Wärmekapazitätsfunktion vor und nach dem Peak extrapoliert.

Da die thermische Entfaltung unter den meisten Bedingungen keine Reversibilität aufwies (zumindest nicht im Sinne eines Zweizustandsmodells), beschränkte sich die Auswertung der DSC-Messungen auf die Ermittlung von T_m , als Maß für die Stabilität, und die Bestimmung der Peakflächen. Dies erfolgte meist auf drei verschiedene Weisen:

- (a) Integration der gesamten Peakfläche,
- (b) Integration der aufsteigenden halben Peakfläche, um eine durch Aggregation verursachte Abweichung von der Peaksymmetrie zu kompensieren und
- (c) wenn möglich, Anwendung eines Zweizustandsmodells.

2.4.12.5 Bestimmung der freien Enthalpie der Stabilisierung

Die Differenz der freien Enthalpie ΔG_U zwischen dem nativen und dem denaturierten Zustand gilt als Maß für die Konformationsstabilität eines Proteins. Diese Differenz entspricht der Arbeit die aufgebracht werden muss, um die native in die denaturierte Struktur zu überführen. Dabei hängt ΔG_U , obwohl es von einer Reihe variabler Faktoren (z.B. Temperatur, Ionenstärke und pH-Wert) bestimmt wird, nur vom nativen und denaturierten Zustand ab (Pfeil & Privalov, 1976a,b,c; Makhatadze & Privalov, 1995). Die Art der Denaturierung spielt keine Rolle.

Die Temperaturfunktion für die Änderung der freien Enthalpie ΔG_U der Entfaltung wird als Stabilitätskurve oder –profil eines Proteins bezeichnet. Die freie Enthalpie der Stabilisierung lässt sich mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung beschreiben:

$$\Delta G_U(T) = \Delta H_U(T_m) \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \cdot \left(T_m - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right) \quad (\text{Gl. 2.19})$$

mit:

$\Delta G_U(T)$:	Stabilität des Proteins bei einer Temperatur T [kcal mol ⁻¹]
$\Delta H_U(T_m)$:	Enthalpieänderung bei T_m [kcal mol ⁻¹]
ΔC_p	:	Änderung der partiellen molaren Wärmekapazität [kcal mol ⁻¹ K ⁻¹]
T	:	Temperatur [K]
T_m	:	Schmelztemperatur des Proteins

Die Konstruktion eines Stabilitätsprofils kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen:

1. thermisch-induzierte Entfaltung: $\Delta H_U(T_m)$ wird aus den thermischen Entfaltungskurven bestimmt und ΔC_p erhält man aus der Steigung der Auftragung $\Delta H_U(T_m)$ gegen T_m . Dazu müssen die $\Delta H_U(T_m)$ -Werte variieren, was z. B. durch die Veränderung des pH-Wertes erreicht werden kann. Diese Prozedur ist aber nicht sehr akkurat, da der T_m -Bereich, für welchen die $\Delta H_U(T_m)$ -Werte gemessen werden, normalerweise recht klein ist (Pace & Tanford, 1968; Chen & Schellman, 1989; Agashe & Udgaonkar, 1995; Nicholson & Scholtz, 1996).
2. chemisch-induzierte Entfaltung: Die ΔG_U -Werte werden aus Gleichgewichtsübergängen, gemessen bei verschiedenen Temperaturen, bestimmt. Diese experimentell erhaltenen ΔG_U -Werte werden gegen T aufgetragen und $\Delta H_U(T_m)$ und ΔC_p mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gl. 2.12) aus dem graphischen Verlauf der Datenpunkte berechnet. Auch diese Prozedur ist nicht sehr akkurat, da wiederum der Temperaturbereich in welchem die ΔG_U -Werte bestimmt werden, klein ist.
3. Differential scanning Calorimetry: $\Delta H_U(T_m)$ und ΔC_p werden aus DSC-Messungen bestimmt und das Stabilitätsprofil berechnet (Privalov & Khechinashvili, 1974).

Keine dieser drei Methoden ist für sich selbst genommen befriedigend. Da sie sich aber gegenseitig ergänzen, sollte es zu einer Kombination von mindestens zwei Methoden kommen, um gute Resultate erhalten zu können.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Reinigung des rekombinanten Internalin B aus *Listeria monocytogenes*

Die Expression der rekombinanten InIB-Konstrukte erfolgte durch Transformation von Bakterien des Stammes BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL mit den jeweiligen Plasmiden (siehe Tabelle 2.1). Dabei handelte es sich um pGEX-6P-1 Plasmide, welche für ein Fusionsprotein aus N-terminaler GST und dem InIB kodierten. Zellen des Stammes BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL wurden verwendet, weil sie zusätzliche Kopien von tRNA besitzen, deren geringe Konzentration ansonsten die Translation von heterologen Proteinen in *E. coli* limitiert (Weiner *et al.*, 1994). Die *argU*, *ileY* und *leuW* Gene kodieren für tRNA's, die die Arginincodons AGA und AGG, das Isoleucincodon AUA und das Leucincodon CUA erkennen. Bei einer Expressionstemperatur von 37 °C wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Präparation der fünf InIB-Varianten erfolgte jeweils nach dem für das InIB₃₂₁ etablierten Reinigungsprotokoll (Schubert *et al.*, 2001). Alle InIB-Konstrukte wurden aus dem löslichen Anteil des Zellextraktes über einen Affinitätschromatographieschritt (Glutathion-Sepharose) angereichert. Anschließend wurde die N-terminal lokalisierte GST unter Verwendung der PreScission-Protease abgespalten und das Zielprotein über einen erneuten Affinitätschromatographieschritt mit anschließender Gelfiltration aufgereinigt. Das Fusionsprotein sollte nach dem ersten Affinitätschromatographieschritt zu mehr als 90 % in einem einzigen Schritt gereinigt werden können, praktisch war dieser Reinigungserfolg jedoch nicht immer zufriedenstellend. Diverse Verunreinigungen werden oft durch nicht ausreichendes Waschen nach dem Auftragen des Zellaufschlusses auf die Säule beim Elutionsschritt mit dem Fusionsprotein eluiert. Aber selbst nach ausgiebigstem Waschen mit Puffer waren in den jeweiligen proteinenthaltenen Fraktionen des öfteren zusätzliche Banden im Größenbereich von 20 bis 36 kDa zu erkennen, welche von der Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT, 25.5 kDa) und der β -Lactamase (31.2 kDa) stammen könnten. Dies könnte bedeuten, dass eine unspezifische Bindung anderer Proteine an das Fusionsprotein bzw. die Säulenmatrix erfolgen würde. Verunreinigungen, die in den Lösungen des jeweils gewünschten Zielproteins noch enthalten waren, konnten jedoch im letzten Reinigungsschritt, der Größenausschlusschromatographie, abgetrennt werden, und dadurch wurde eine Proteinlösung mit einem Reinheitsgehalt von mindestens 98 % erzielt. Der Erfolg der Reinigung und die Homogenität der Proteinlösung wurde immer mittels Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung überprüft. Aus einem Ausgangsvolumen von 1.5 bis 2 l Kulturmedium konnten je nach Verlauf der Reinigung und nach Proteindomäne Ausbeuten von ungefähr 10 bis 50 mg an sauberem Protein erzielt werden. Zwischen den einzelnen InIB Konstrukten konnten, was die Ausbeuten anbelangt, nur minimale Unterschiede festgestellt werden. So wurden für die LRR-Domäne Proteinmengen bis maximal 40 mg, und für die Internalin-Domäne bis maximal 55 mg erhalten. Erwähnt werden muss an dieser Stelle jedoch noch, dass ein relativ beträchtlicher Anteil des sauberen Zielproteins teilweise mit GST,

teilweise mit anderen Proteinbanden verunreinigt war, die im Laufe der Größenausschlusschromatographie nicht abgetrennt werden konnten. Diese Proteinfractionen wurden stets separat aufkonzentriert und ggf. über erneute Affinitäts- bzw. Größenausschlusschromatographie nachgereinigt. Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch am Beispiel des InlB₂₄₁ den Reinigungserfolg im Verlauf der einzelnen erwähnten Reinigungsschritte.

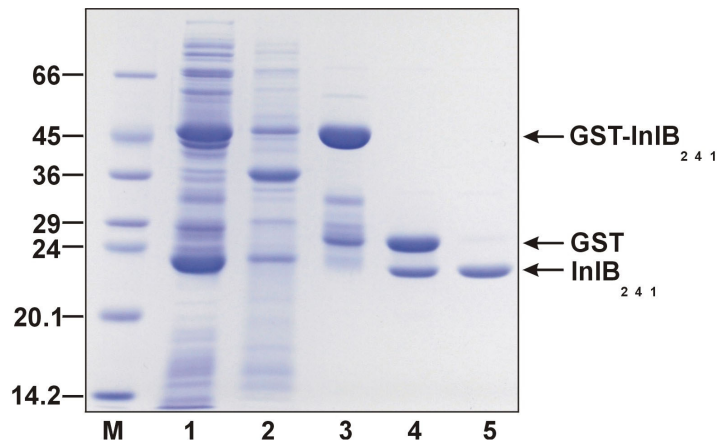


Abb. 3.1: Reinigungsgel des InlB₂₄₁ aus *E. coli*

M: Molekulargewichtsmarker in kDa; Spur (1): French-Press-Überstand; Spur (2): French-Press-Pellet; Spur (3): Eluat Glutathion-Sepharose; Spur (4): nach proteolytischer Spaltung mit PreScission-Protease (46 h); Spur (5): gereinigtes Protein nach Superdex 75. Coomassiegefärbtes 12.5 %iges SDS-Polyacrylamidgel

Bei der Reinigung des InlB₂₄₁ wurde öfters eine charakteristische Bande bei ungefähr 35 kDa beobachtet, die mittels Größenausschlusschromatographie nicht vom eigentlichen Zielprotein abgetrennt werden konnte. Eine N-terminale Sequenzierung ergab, dass es sich hierbei um InlB handelte. Ein vermutetes Überlesen des Stopcodons im *inlB241* könnte theoretisch zu drei verschiedenen Konstrukten mit den Molekularmassen 34.7, 36.2 und 37.8 kDa führen. Da diese 35 kDa-Bande weniger als 5 % von der Gesamtausbeute an gereinigtem Protein ausmachte, konnte es auch in der Massenspektrometrie (MALDI-TOF) nicht neben InlB₂₄₁ detektiert werden. Zur biophysikalischen Charakterisierung des InlB₂₄₁ wurden nur homogene Proteinlösungen verwendet.

3.2 Biophysikalische Charakterisierung der LRR- und Internalin-Domäne von Internalin B

Zur Charakterisierung der LRR- bzw. Internalin-Domäne wurden die Konstrukte InlB₂₄₈ bzw. InlB₃₂₁ verwendet (Marino *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2001). Diese beiden Fragmente des vollständigen InlB besitzen an der Position 242 ein Cystein. Freie SH-Gruppen stellen sehr reaktive Reagenzien dar, die, je nach ihrer Zugänglichkeit im Molekül, oxidieren und Disulfidbrücken ausbilden können. Die Entstehung von unerwünschten Dimeren lässt sich zwar durch den Zusatz von Reduktionsmitteln, wie

z. B. DTE oder DTT, minimieren, hat jedoch den Nachteil, dass diese Substanzen unter anderem eine starke Absorption im Bereich um 280 nm aufweisen. Mit fortschreitender Oxidation können sich die spektroskopischen Eigenschaften dieser Substanzen ändern, was sich wiederum negativ auf die spektroskopische Charakterisierung der Proteine auswirken kann. Mit Hilfe des Ellman-Testes konnte gezeigt werden, dass das Cystein beim InlB₂₄₈ eine Zugänglichkeit von ungefähr 66 % aufweist. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Cystein-freien Konstrukte InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁C242S generiert. Im Falle des InlB₂₄₁ wurde nach dem Glutamat 241 des InlB₂₄₈ ein Stopcodon eingeführt, was folglich zu einer Entfernung der letzten sieben Aminosäuren führte. Beim InlB₃₂₁ erfolgte ein Austausch des Cysteins 242 gegen Serin. Diese Cystein-freie Mutante wird als pseudo-Wildtyp verwendet und im weiteren als InlB₃₂₁* bezeichnet. In den folgenden Kapiteln werden, mit Ausnahme von Kapitel 3.3.1.5, nur noch die Ergebnisse der biophysikalischen Charakterisierungen der Cystein-freien Varianten abgebildet und beschrieben. Unterschiede, die sich bei den Charakterisierungen der Proteine mit und ohne Cystein ergaben, werden als Zahlenwerte an den entsprechenden Stellen genannt und erläutert. Neben dem InlB₂₄₁ und dem InlB₃₂₁* wurde noch eine dritte InlB-Mutante im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Bei ihr wurde, neben dem Cystein 242, noch das Tryptophan 124 in der LRR-Domäne gegen Serin ausgetauscht (im weiteren als InlB₃₂₁*W124S bezeichnet). Die Internalin-Domäne des InlB besitzt nur zwei Tryptophane, eines in der LRR- und eines in der Ig-ähnlichen Domäne (Abb. 3.2). Anlass für die Generierung dieser Mutante war die Vermutung, dass diese zwei Aminosäuren als spezifische Sonden in der Tryptophanfluoreszenz-Spektroskopie für die Charakterisierung der Faltung der zwei Domänen genutzt werden könnten.

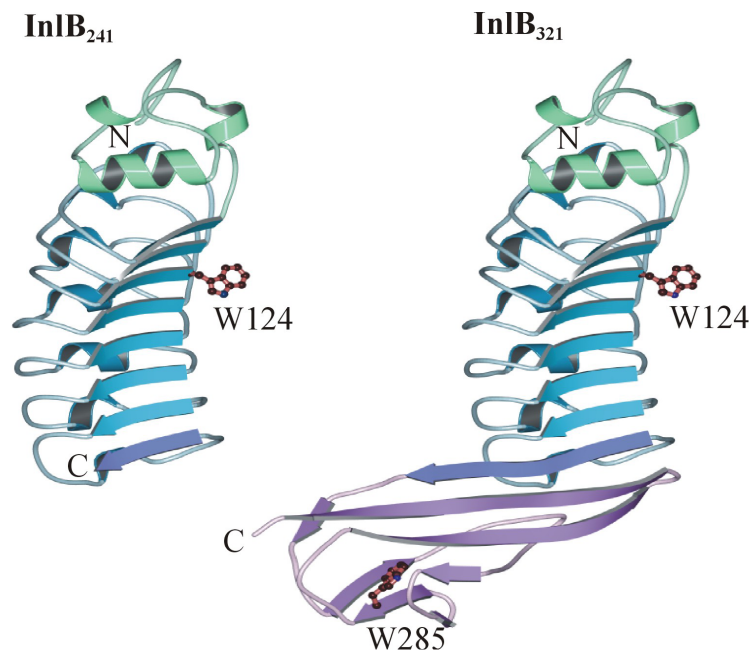


Abb. 3.2: Struktur des InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁

Dargestellt sind die Strukturen des InlB₂₄₁ (links) und des InlB₃₂₁ (rechts). Die N-terminale Cap-Domäne ist in grün, die LRR-Domäne in blau und die Ig-ähnliche Domäne in magenta gezeigt. Die Seitenketten der Tryptophanreste 124 und 285 sind hervorgehoben und gekennzeichnet. Die Abbildung wurde aus Freiberg *et al.* (2004) entnommen.

Die Analyse der gereinigten InlB-Konstrukte mittels SDS-PAGE zeigte das Vorhandensein einer einzelnen homogenen Proteinbande mit einer apparenten Molekularmasse, die, soweit dies aus dem Gel abgeschätzt werden konnte, dem jeweiligen aus der Sequenz berechneten Wert entsprach. Die exakten Molekularmassen M_w und der Oligomerisierungsgrad der Proteine wurden mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) und analytischer Ultrazentrifugation bestimmt. Die bestimmten Molekularmassen sind in Tabelle 3.1 angegeben.

Tab. 3.1: Molekularmassen der InlB-Konstrukte

Methode	InlB ₂₄₁	InlB ₃₂₁ *	InlB ₃₂₁ *W124S
M_w (theoret.) [g mol ⁻¹]	23313,5	32341,66	32242,52
M_w (MALDI) [g mol ⁻¹]	23315	32345	32242
M_w (AUZ) [g mol ⁻¹]	25174 (+ 7.9 %)	31949 (- 1.2 %)	36175 (+ 12.2 %)

Die theoretische Molekularmasse wurde aus der jeweiligen Sequenz berechnet (gcg-Programm). Molekularmassen aus den AUZ-Messungen stammen aus Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen. Die prozentualen Abweichungen zum theoretisch berechneten Wert sind in Klammern angegeben.

Die experimentell bestimmten Massen aus den MALDI-TOF-MS Messungen stimmen im Rahmen des Fehlers mit den aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten theoretischen Molekularmassen überein. Es wurde davon ausgegangen, dass alle InlB-Konstrukte ohne Modifizierung exprimiert wurden, wie auch schon in den Kristallstrukturen gezeigt werden konnte. Die erhaltenen Molekularmassen aus den vorläufigen Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen der analytischen Ultrazentrifugation weichen hingegen stärker von den massenspektrometrisch bestimmten Molekularmassen ab. Die Abweichungen liegen im Bereich von 1.2 bis 12.2 %. Eine Begründung dafür könnte in der geringen Anzahl der Messungen liegen. Trotz dieser Abweichungen sprechen die Daten der Ultrazentrifugation für das Vorliegen eines monomeren Zustandes der jeweiligen Proteine.

Zur Charakterisierung der Stabilität und Faltung eines Proteins bedient man sich in der Regel der Konformationsunterschiede bzw. -änderungen zwischen dem nativen und dem denaturierten Zustand, die oft in unterschiedlichen spektroskopischen Signalen resultieren (Schmid, 1997). Im folgenden werden die spektroskopischen Charakteristika der Internalin- und LRR-Domäne näher vorgestellt und die Beobachtungen erläutert.

3.2.1 UV-Absorptionsspektroskopie

Das Absorptionsspektrum des InlB₂₄₁ wird von einem Tryptophan und drei Tyrosinen bestimmt (Abb. 3.3 A). Es hat ein Maximum bei 276 nm und bei 282 nm ein Nebenmaximum. Bei 292 nm findet sich eine schwach ausgeprägte Schulter, die von dem Tryptophan an der Position 124 herrührt. Im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 260 nm ist eine Feinstrukturierung im Spektrum zu erkennen, welche durch die fünf Phenylalaninreste verursacht wird. Nach Denaturierung des Proteins in 6 M GdmCl kam es zu einer schwachen Intensitätsabnahme und zu einem Verlust der Separation der zwei Maxima um 280 nm.

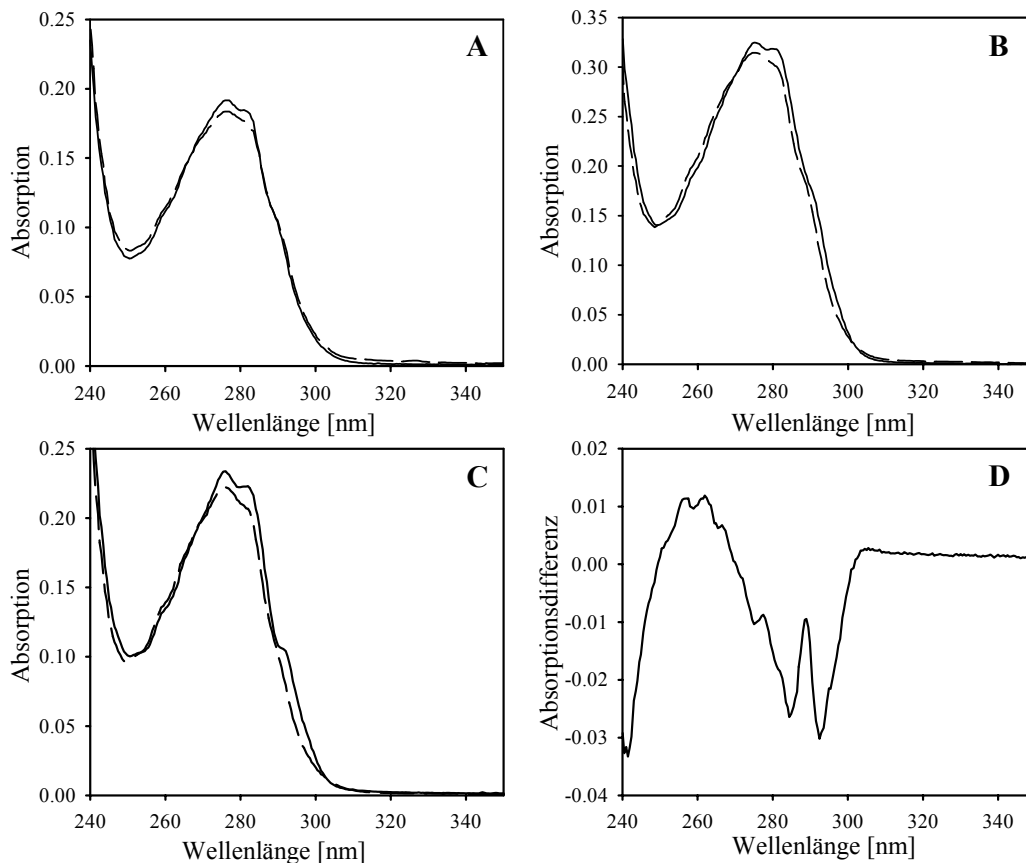


Abb. 3.3: Absorptionsspektren der InlB-Konstrukte

Absorptionsspektren von InlB₂₄₁ (A), InlB₃₂₁* (B) und InlB₃₂₁*W124S (C) bei 20 °C. Spektren des nativen Proteins (—) wurden in 20 mM MOPS/NaOH, pH 7.5 und die des denaturierten Proteins (---) in 6 M GdmCl gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 18.5 µM (InlB₂₄₁), 17.2 µM (InlB₃₂₁*) und 17.4 µM (InlB₃₂₁*W124S). D zeigt das Differenzspektrum des InlB₃₂₁*.

Das Absorptionsspektrum des InlB₃₂₁* wird von zwei Tryptophanen, bzw. einem Tryptophan beim InlB₃₂₁*W124S, und fünf Tyrosinen bestimmt (Abb. 3.3 B bzw. C). Das Spektrum des InlB₃₂₁* ähnelt trotz eines zusätzlichen Tryptophans sehr stark dem des InlB₂₄₁. Es besitzt ebenfalls die zwei Maxima um 280 nm, wobei hier das Maximum bei 282 nm eine nahezu identische Absorption zeigte wie das bei 276 nm. Nach der Denaturierung in 6 M GdmCl kam es zu einer Verschiebung des Spektrums zu kleineren Wellenlängen und zu einer Intensitätsabnahme. Im Falle des InlB₃₂₁*W124S ist die Schulter bei 292 nm im Gegensatz zu den anderen beiden Spektren deutlich stärker ausgebildet. Im denaturierten Zustand kam es zu einem vollständigen Verlust dieser Schulter, da das Tryptophan sich jetzt in polarer Umgebung des wässrigen Mediums befindet.

Ein Vergleich der Spektren mit denen der Konstrukte mit Cystein, InlB₂₄₈ und InlB₃₂₁, zeigte identische Spektren (Daten nicht gezeigt). Die molaren Extinktionskoeffizienten für alle InlB-Konstrukte wurde nach der Methode von Gill und von Hippel (1989) und nach Pace *et al.* (1995) bestimmt und sind unter 2.3.4 angegeben.

Die Änderung in der Absorption zwischen dem nativen und dem denaturierten Zustand ist so gering, dass die Absorptionsspektroskopie zur Charakterisierung der Faltung und Stabilität nicht herangezogen wurde (siehe exemplarisch am Differenzspektrum des InlB₃₂₁*, Abb. 3.3 D).

3.2.2 CD-Spektroskopie

Die Charakterisierung eines Proteins mittels CD-Spektroskopie erfolgt durch Messung der Spektren in zwei verschiedenen spektralen Regionen. Dabei dient das Nah-UV-CD-Spektrum (250 bis 350 nm) als sensitives Kriterium für den nativ gefalteten Zustand, also die Tertiärstruktur, eines Proteins. Das Fern-UV-CD-Spektrum (170 bis 250 nm) hingegen liefert wertvolle Informationen über die Sekundärstrukturtypen eines Proteins (Johnson, 1990; Schmid, 1997).

Die CD-Spektren von Proteinen im fernen ultravioletten Wellenlängenbereich sind besonders sensitiv für α -helikale Sekundärstrukturelemente. Internalin B besitzt in der N-terminalen *Cap*-Domäne drei kurze α -Helices, welche aus 4, 5 und 10 Resten bestehen und einem α -Helix-Anteil von nur ungefähr 9 bzw. 7 % im InlB₂₄₁ bzw. InlB₃₂₁* entsprechen (Abb. 3.2). Die Fern-UV-CD-Spektren der beiden InlB Fragmente sind sich in der Form sehr ähnlich und weisen im Wellenlängenbereich von 217 bis 220 nm schwach ausgebildete Minima von $[\Theta]_{MRW} \approx -8000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ auf (Abb. 3.4). Die Elliptizität im Minimum des InlB₂₄₁ ist im Vergleich zum InlB₃₂₁* dabei leicht negativer und minimal zu kleineren Wellenlängen verschoben. Das Maximum bei 190 nm für InlB₃₂₁* bzw. bei 185 nm für InlB₂₄₁ zeigt in beiden Fällen die gleiche Amplitude ($[\Theta]_{MRW} \approx 7500 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). Spektren mit solch schwachen Amplituden sind typisch für Proteine, die einen geringen α -Helix und einen hohen β -Faltblatt Gehalt besitzen (Greenfield, 1996). Die Struktur des InlB₃₂₁* wird in der Tat von β -Faltblättern dominiert, die 28 % von der Gesamtsekundärstruktur ausmachen (bestimmt mit DSSP, Kabsch & Sander, 1983). Trotz der Ähnlichkeit des Spektrums mit dem vom InlB₃₂₁* hat InlB₂₄₁ einen viel geringeren Gehalt an β -Faltblättern (16 %), und ein ebenso signifikanter Anteil der Sekundärstruktur besteht aus kurzen 3_{10} -Helices in der LRR-Domäne (13 %).

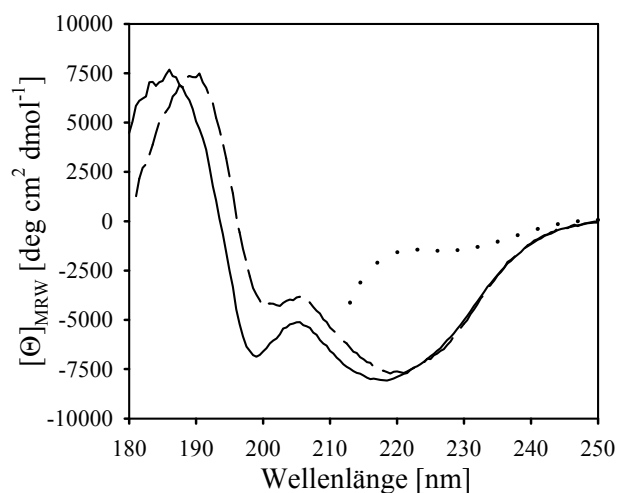


Abb. 3.4: Fern-UV-CD-Spektren des InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁*

Fern-UV-CD-Spektren von InlB₂₄₁ (—) und InlB₃₂₁* (---) in 20 mM NaP, pH 7 bzw. von InlB₂₄₁ in 3 M GdmCl (···) bei 20 °C. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg ml^{-1} .

Es sollte überprüft werden, ob die CD-Daten dieses doch relativ einfachen Strukturmotivs, mit Hilfe von Programmen analysiert werden können, welche eine quantitative Vorhersage über die Sekundärstruktur eines Proteins machen. Für die zwei InlB-Fragmente erhält man, wie aus der Ähnlichkeit der Spektren zu erwarten gewesen wäre, auch nahezu identische Ergebnisse (Tab. 3.2 und 3.3). Für die Auswertung der Spektren wurden die in dem Software Paket CDPro implementierten Programme CONTINLL, SELCON3 und CDSSTR verwendet (Sreerama *et al.*, 2000). Diese Programme nutzen unterschiedliche Sätze an Referenzproteinen (maximal 48), welche aus Proteinen mit α -reichen, β -reichen und gemischten α/β Sekundärstrukturelementen, sowie aus denaturierten Proteinen bestehen.

Tab. 3.2: Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage für InlB₂₄₁

Sekundärstruktur	SELCON3 [%]	CONTINLL [%]	CDSSTR [%]	DSSP [%]	XTLsstr [%]
α -Helix/Helix	15.9	17.9	16.8	9	6.1
3_{10} -Helix	3.20	3.70	3.10	13	16.3
β -sheet/sheet	17.4	17.0	18.3	16	4.9
turn	13.0	13.0	12.8	--	10.2
PP2	9.70	10.5	9.40	--	4.4
ungeordnet/andere	39.8	37.9	39.7	--	58.3

Tab. 3.3: Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage für InlB₃₂₁*^{*}

Sekundärstruktur	SELCON3 [%]	CONTINLL [%]	CDSSTR [%]	DSSP [%]	XTLsstr [%]
α -Helix/Helix	13.0	13.5	6.80	7	4.3
3_{10} -Helix	4.20	4.60	3.00	11	11.4
β -sheet/sheet	23.1	21.4	27.6	28	14
turn	12.7	13.2	13.7	--	13.8
PP2	8.30	9.10	7.90	--	8.3
ungeordnet/andere	39.0	38.1	41.5	--	48.3

Unabhängig von der verwendeten Methode und dem Satz an Referenzproteinen waren die Resultate der Vorhersage der Anteile am β -Faltblatt durch die Programme beim InlB₃₂₁* leicht und beim InlB₂₄₁ fast um das vierfache erhöht, und auch die α -Helix-Anteile bei beiden Proteinen überbewertet (Daten nicht gezeigt). Verwendet man einen Referenzsatz, welcher Daten zu 3_{10} -Helices enthält, so wurde ein 3_{10} -Helix Gehalt von 3 bis 4 % für InlB₂₄₁ bzw. von 3 bis 5 % für InlB₃₂₁* vorausgesagt (Tab. 3.2 und 3.3) (Johnson, 1999). Andererseits hat das Vorhersageprogramm XTLsstr, 3_{10} -Helix Anteile von 16 bzw. 11 % in der Kristallstruktur des InlB₂₄₁ bzw. InlB₃₂₁* gefunden (King & Johnson, 1999). Das XTLsstr-Programm wandelt die dreidimensionalen Koordinaten, die eine Proteinstruktur beschreiben (PDB-Eintrag), in eine Sekundärstrukturzuordnung um. Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, dass es derzeit keine Auswerteprogramme gibt, deren verwendete Referenzsätze dazu genutzt werden können, um den hohen 3_{10} -Helix Gehalt der LRR-Domäne im Internalin B aus den CD-Spektren verlässlich vorhersagen zu können.

Zusätzlich zu dem Minimum um 219 nm besitzen die Spektren beider Proteine ein zweites deutlich ausgeprägtes Minimum im Bereich von 199 bis 201 nm (Abb. 3.4). Diese spektroskopische Besonderheit könnte mit dem 3_{10} -Helix-Anteil der zwei InIB Varianten korrelieren, da es beim InIB₂₄₁ ($[\Theta]_{MRW} \approx -7000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) stärker ausgeprägt ist, als beim InIB₃₂₁* ($[\Theta]_{MRW} \approx -4100 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). In der Literatur wurde darauf hingewiesen, dass eine Unterscheidung zwischen α - und 3_{10} -Helices im CD-Spektrum nicht beobachtet werden kann (Sudha *et al.*, 1983). Es muss dabei aber auch betont werden, dass es von Proteinen mit solch einem hohen Anteil an 3_{10} -Helices, wie dies beim InIB der Fall ist, bisher noch relativ wenig CD-spektroskopische Charakterisierungen gibt und dass über den Beitrag von 3_{10} -Helices zu einem Fern-UV-CD-Spektrum nur wenig bekannt ist. Ein vergleichbares Minimum bei 198 nm konnte im Fern-UV-CD-Spektrum des Polygalakturonase-Inhibitors (PGIP) aus *Phaseolus vulgaris* beobachtet werden (Di Matteo *et al.*, 2003). Es handelt sich bei diesem Proteins ebenfalls um ein LRR-Protein, allerdings mit neun 3_{10} -Helices, was darauf hindeuten könnte, dass die Ursache dieses Signals von den 3_{10} -Helices kommen könnte. In den letzten Jahren wurden diverse synthetische Peptide, bestehend aus C ^{α} -substituierten α -Aminosäuren mit terminalen Blockierungen, charakterisiert (Toniolo *et al.*, 1996; Formaggio *et al.*, 2000; Pengo *et al.*, 2003; Toniolo *et al.*, 2004). All diese Peptide mit einem 3_{10} -helikalen Faltungstyp besitzen Minima im Bereich von 201 bis 206 nm. Das einzige natürliche Peptid, welches eine 3_{10} -Helix bildet, ist ein 13-Aminosäurereste großes Fragment (Reste 659 – 671) des gp41 des HIV-1 (Biron *et al.*, 2002). Sein CD-Spektrum zeigt ein sehr prominentes Minimum bei 205 nm.

Eine weitere Ursache für diese Schulter bei 200 nm könnte jedoch auch durch einen Effekt der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin zu erklären sein. Normalerweise ist der Beitrag von Aromaten im Vergleich zu denen des Peptidrückgrats minimal (Woody & Dunker, 1996). Bei einigen Proteinen mit geringem α -Helixanteil, wie z. B. Lectinen und Immunglobulinen, können jedoch die aromatischen Aminosäuren einen signifikanten Beitrag haben (Sreerama & Woody, 2004). Die stärkeren CD-Signale werden durch einen engen Kontakt aromatischer Ringsysteme und deren relativer Orientierung zueinander erklärt (Grishina & Woody, 1994; Thomas *et al.*, 2002). Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde eine Mutante des InIB₃₂₁ untersucht, bei welcher fünf Aromaten (F104, W124, F126, Y170 und Y214) in der LRR-Domäne gegen Serine ausgetauscht wurden (Abb. 3.5 B). Diese Reihe von Aromaten ist für die Bindung an den Rezeptor Met essentiell (Machner *et al.*, 2003). Die fünf Aminosäuren sind alle auf der konkaven Seite der LRR-Domäne lokalisiert und der Austausch hatte keine strukturellen Veränderungen des Proteins zur Folge (Machner *et al.*, 2003). Das Fern-UV-CD-Spektrum dieser Mutante zeigte bei 219 nm im Vergleich zum InIB₃₂₁* ein stärker ausgebildetes Minimum (Faktor 1.2) (Abb. 3.5 A). Die Schulter bei 200 nm und das Maximum bei 190 nm waren hingegen schwächer ausgeprägt. Diese Beobachtung würde dafür sprechen, dass die aromatischen Aminosäuren einen beträchtlichen Beitrag an der Ausbildung des Minimums bei 200 nm haben könnten. Auf der anderen Seite zeigte die Tryptophan-Mutante InIB₃₂₁*W124S ein etwas

stärker ausgebildetes Minimum bei 200 nm im Vergleich zu den anderen Konstrukten. Folglich ist die Interpretation der beobachteten CD-Spektren bezüglich des Beitrages der 3_{10} -Helices nicht trivial und bedarf noch weiterer vertiefender Untersuchungen. CD-spektroskopische Charakterisierungen z. B. der übrigen Internaline, bei welchen ein hoher 3_{10} -Helix-Anteil vorhergesagt wird, sollten bei der Entscheidung helfen, ob das Minimum um 200 nm wirklich charakteristisch für dieses Sekundärstrukturmotiv ist.

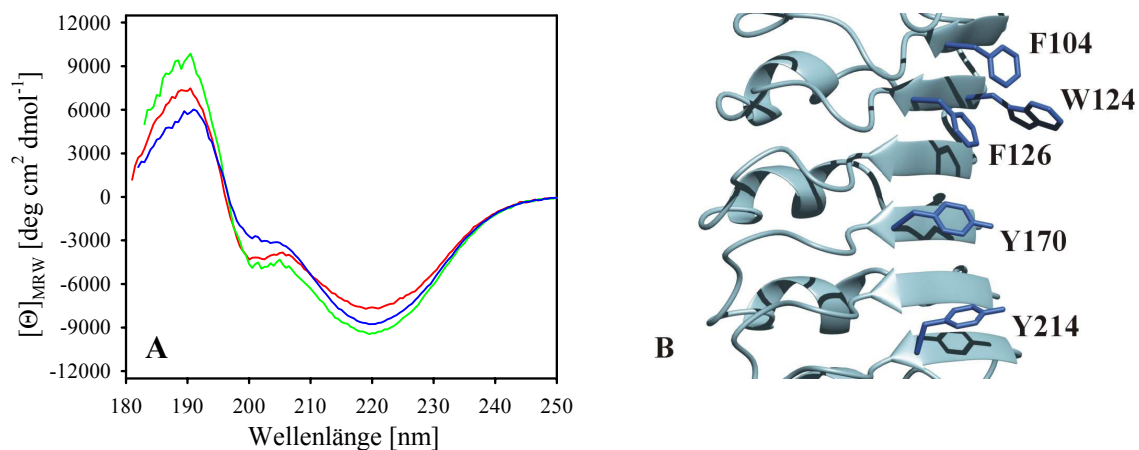


Abb. 3.5: Fern-UV-CD-Spektren verschiedener Mutanten des InlB₃₂₁

A zeigt die Fern-UV-CD-Spektren von InlB₃₂₁* (—), InlB₃₂₁*W124S (—) und der Fünffachmutante des InlB₃₂₁ (—). Gemessen wurde in 20 mM MOPS/NaOH, pH 7 bei 10 °C. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg ml⁻¹ beim InlB₃₂₁*, 1.4 mg ml⁻¹ beim InlB₃₂₁*W124S und 2 mg ml⁻¹ bei der Fünffachmutante. **B** zeigt einen Ausschnitt aus der LRR-Domäne des InlB, mit den Positionen, an welchen die Substitutionen der aromatischen Aminosäuren erfolgte. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Nach Zugabe von 5 M GdmCl war das Minimum bei 219 nm nicht mehr zu beobachten, was die Entfaltung beider InlB-Fragmente widerspiegelte und das typische Spektrum eines Zufallknäuls darstellt (Abb. 3.4).

Ein Vergleich der Fern-UV-CD-Signale der Cystein-freien mit den Cystein-haltigen Proteinen zeigte zwar einen übereinstimmenden Verlauf der Spektren, aber Unterschiede in der molaren Elliptizität sowohl in den Minima als auch im Maximum. Diese Unterschiede sind bei der Internalin-Domäne nur minimal, bei der LRR-Domäne hingegen im Minimum bei 199 nm am signifikantesten. InlB₂₄₁ weist hier eine molare Elliptizität auf, die ungefähr 30 % größer ist als die bei InlB₂₄₈. Ursache für diesen Unterschied könnten mögliche Aggregate in der InlB₂₄₈-Lösung sein, die einen verfälschenden Einfluss auf die Amplitude haben würden. Ein Aggregationsverhalten konnte beobachtet werden, wenn die Lösung der Cystein-haltigen Proteine über einige Wochen bei 4 °C gelagert wurde. Eine durch Aggregate verursachte Lichtstreuung führt bei kleineren Wellenlängen zu einer größeren Streuung der Daten und somit zu einem kleineren Fern-UV-CD-Signal.

CD-Spektren im nahen ultravioletten Wellenlängenbereich hängen von einer asymmetrischen elektronischen Umgebung von aromatischen Aminosäureseitenketten und Disulfidbrücken ab. Die Nah-UV-CD-Spektren der beiden Proteine unterscheiden sich signifikant voneinander (Abb. 3.6). Das Spektrum des InlB₃₂₁* hat im Bereich von 250 bis 350 nm durchgehend einen positiven Verlauf, mit Maxima bei 279 und 287 nm und einer Schulter bei 292 nm. InlB₂₄₁ hingegen besitzt ein Spektrum ohne Feinstruktur und weist eine Elliptizität auf, die im Vergleich zum InlB₃₂₁* bezogen auf die molare Konzentration um einen Faktor 1.5 geringer ist. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich größtenteils auf die zwei Tryptophane zurückzuführen, die beim InlB₃₂₁* in den zwei unterschiedlichen Regionen der LRR- und der Ig-ähnlichen Domäne zu finden sind. Das einzelne Tryptophan in der LRR-Domäne an der Position 124 ist Teil eines Clusters von stark lösungsmittlexponierten aromatischen Aminosäuren an der putativen Rezeptorbindungsstelle (Abb. 3.5 B) (Machner *et al.*, 2003). Die übrigen aromatischen Aminosäuren, fünf Tyrosine und neun Phenylalanine, sind nahezu gleichmäßig zwischen den zwei Domänen verteilt und weisen eine ähnliche Exposition dem Lösungsmittel gegenüber auf. Sie scheinen daher an der Feinstrukturierung der Nah-UV-CD Spektren nicht maßgeblich beteiligt zu sein.

Vergleicht man die Nah-UV-CD-Spektren der verschiedenen InlB₃₂₁-Konstrukte, also die des InlB₃₂₁*, des InlB₃₂₁*W124S und der fünffachen Aromatenmutante, miteinander, so zeigen alle einen ähnlichen Verlauf (Abb. 3.6). Bei den Proteinen, denen jeweils das Tryptophan 124 fehlt, ist die Elliptizität drastisch verringert und entspricht in etwa der des InlB₂₄₁. Das spricht dafür, dass der Hauptanteil des Spektrums im nahen UV von den Tryptophanen herrührt. Die Fünffachmutante des InlB₃₂₁, welcher noch zusätzlich zwei Tyrosine und drei Phenylalanine fehlen, unterscheidet sich vom InlB₃₂₁*W124S nur minimal in der Elliptizität. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die übrigen aromatischen Aminosäuren keinen signifikanten Beitrag zum Nah-UV-CD-Spektrum haben. In Gegenwart von 5 M GdmCl ist kein Nah-UV-CD-Signal zu registrieren, was auf den Verlust an Tertiärstruktur zurückzuführen ist (Abb. 3.6).

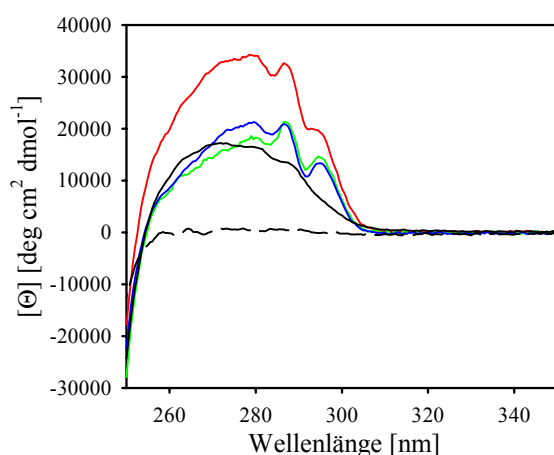


Abb. 3.6: Nah-UV-CD-Spektren der InlB-Konstrukte

Nah-UV-CD-Spektren von InlB₂₄₁ (---), InlB₃₂₁* (—), InlB₃₂₁*W124S (—) und der Fünffachmutante des InlB₃₂₁ (—). Die Spektren wurden in 20 mM MOPS/NaOH, pH 7 bzw. 20 mM NaP pH 7 gemessen. Denaturiertes InlB₂₄₁ (---) wurde in 6 M GdmCl gemessen. Die Proteinkonzentrationen sind bei Abb. 3.4 und 3.5A angegeben.

Die Spektren der Cystein-haltigen Proteine zeigen einen identischen Verlauf mit einem etwas geringeren Nah-UV-CD-Signal. Die geringere Amplitude ist möglicherweise durch einen Fehler in der

Proteinkonzentration oder durch Lichtstreuung aufgrund von Aggregaten in der Proteinlösung zu erklären, da im Bereich von 250 bis 290 nm nur Disulfidbrücken absorbieren sollten (Kelly & Price, 2000).

3.2.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie wird im allgemeinen zur Charakterisierung der Lösungsmittelzugänglichkeit bzw. -umgebung der Fluorophore und der Tertiärstruktur in einem Protein verwendet (Schmid, 1997).

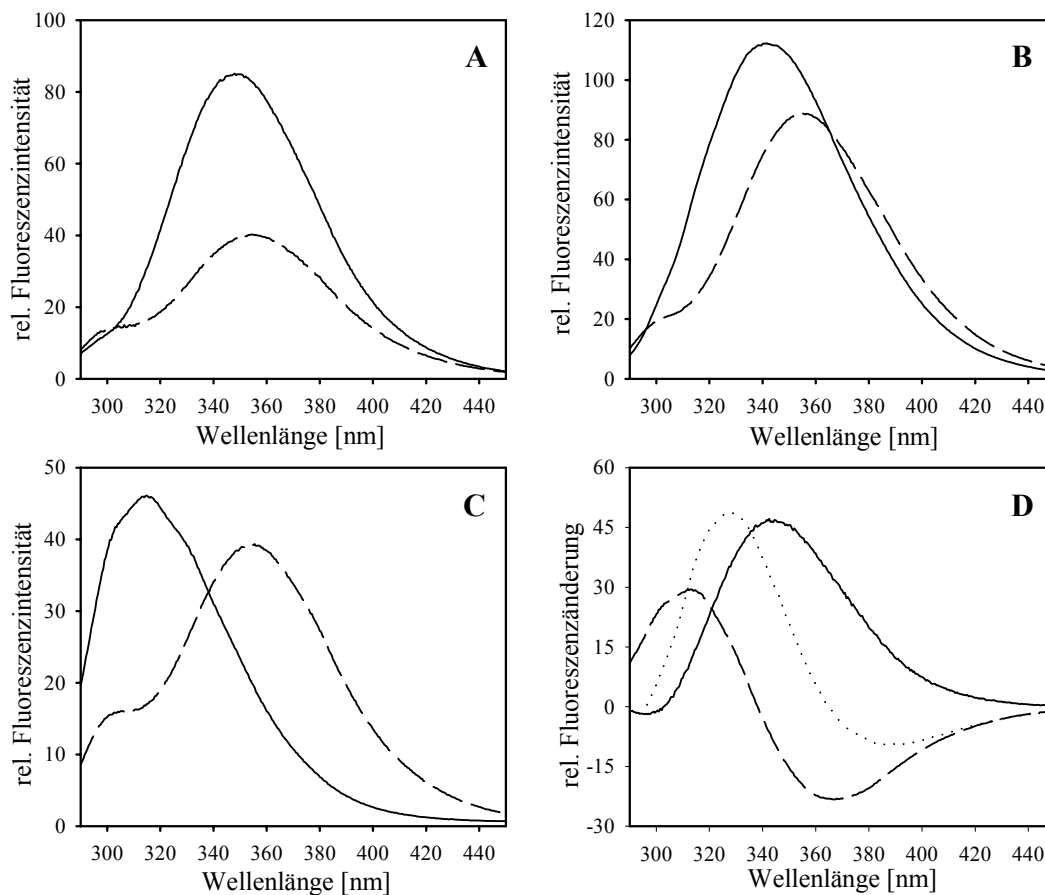


Abb. 3.7: Fluoreszenzemissionsspektren der InlB-Konstrukte

Fluoreszenzemissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm von InlB₂₄₁ (A), InlB₃₂₁* (B) und InlB₃₂₁*W124S (C) bei 20 °C. Spektren des nativen Proteins (—) wurden in 40 mM Tris/HCl, pH 7 bzw. 20 mM MOPS/NaOH, pH 7.5 und die des denaturierten Proteins (---) in 6 M GdmCl gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 0.86 μM (InlB₂₄₁), 0.62 μM (InlB₃₂₁*) und 0.62 μM (InlB₃₂₁*W124S). D zeigt die Differenzspektren des InlB₂₄₁ (—), des InlB₃₂₁* (···) und des InlB₃₂₁*W124S (---).

In Abb. 3.7 (A bis C) sind typische Fluoreszenzspektren des InlB₂₄₁, InlB₃₂₁* und InlB₃₂₁*W124S im nativen sowie im denaturierten Zustand in 5 M GdmCl gezeigt. Das Emissionsspektrum des InlB₂₄₁ zeigt nach Anregung bei 280 nm eine maximale Fluoreszenz bei 348 nm, was auf eine hohe Lösungsmittelzugänglichkeit des Tryptophans 124 in der LRR-Domäne hindeutet (Abb. 3.7 A). Beim InlB₃₂₁* hingegen liegt das Emissionsmaximum bei 341 nm (Abb. 3.7 B). Die Verschiebung zu

kürzeren Wellenlängen hin resultiert aus dem zusätzlichen zweiten Tryptophan in der Ig-ähnlichen Domäne an der Position 285. Dieses ist im Inneren der Domäne verborgen und dort vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt. Erwartungsgemäß resultiert aus der Entfernung des Tryptophans 124 im InlB₃₂₁*W124S ein Emissionsspektrum mit einem Maximum bei noch kürzeren Wellenlängen (Abb. 3.7 C). Das Fluoreszenzspektrum hat einen strukturierten Verlauf mit Maxima bei 305 und 318 nm. Die Form des Spektrums ähnelt dem von Indol in apolaren Lösungsmitteln und lässt darauf schließen, dass die Seitenkette des Tryptophan 285 in dieser InlB Variante vollständig im hydrophoben Inneren der Ig-ähnlichen Domäne verborgen ist und keinen Kontakt zu polaren Gruppen ausbildet (Teale, 1960). Die Schulter bei 305 nm resultiert aus der Tyrosinfluoreszenz. Diese Beobachtungen, die Lösungsmittelzugänglichkeit des Tryptophan 124 zum einen und die Abschirmung des Tryptophan 285 gegen die polare Umgebung andererseits, lassen sich durch die hochaufgelöste Kristallstruktur bestätigen (Marino *et al.*, 1999 ; Schubert *et al.*, 2001).

Nach Anregung der verschiedenen Proteinkonstrukte bei 295 nm wurde jeweils ein Spektrum mit einem vergleichbaren Emissionsmaximum zu denen die bei 280 nm angeregt wurden, erhalten, was darauf hindeutete, dass im gefalteten Zustand ein effizienter Energietransfer von den Tyrosinen zu den Tryptophanen erfolgt (Daten nicht gezeigt). Nach Zugabe von 5 M GdmCl kam es bei allen drei Proteinen zu einer Rotverschiebung des Emissionsmaximums nach ungefähr 355 nm und zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität (Abb. 3.7 A bis C). Dies bedeutet, dass die Fluorophore dem wässrigen Lösungsmittel zugänglich gemacht werden, und das Fluoreszenzmaximum entspricht dem von Tryptophan in Wasser. Bei den beiden Internalin-Domänen-Konstrukten betrug die Fluoreszenzänderung zwischen dem nativen und denaturierten Zustand nur ungefähr 20 %, was darauf hindeutet, dass das Tryptophan in der Ig-ähnlichen Domäne im nativen Zustand schon eine gewisse Löschung (*Quenching*) der Fluoreszenz erfährt. Die Spektren der denaturierten Proteine, welche bei 280 nm angeregt wurden, weisen alle bei 305 nm eine ausgeprägte Schulter auf, welche durch die Fluoreszenz der Tyrosinseitenketten verursacht wird und in dem fehlenden Energietransfer zum Tryptophan begründet ist (Schmid, 1997). Die Fluoreszenzspektren der Cystein-haltigen Proteine waren identisch mit denen der Cystein-freien (Daten nicht gezeigt). Aus den Differenzspektren zwischen dem nativen und dem denaturierten Protein ergibt sich die Wellenlänge, bei welcher die Signaländerung am größten ist. Für die Konstrukte InlB₂₄₈ und InlB₂₄₁ lag diese bei 343 nm, für die Konstrukte InlB₃₂₁ und InlB₃₂₁* bei 328 nm und für das InlB₃₂₁*W124S bei 314 nm (Abb. 3.7 D). Die hier beobachteten Änderungen in der Tryptophanfluoreszenz zwischen dem nativen und denaturierten Zustand können somit als sensitive Messsonde für die Charakterisierung des Faltungszustands der Domänen verwendet werden.

3.3 *In vitro* Faltung und thermodynamische Stabilität

In der Literatur findet man zu dem Thema Proteinstabilität und –faltung für die Klasse der LRR-Proteine nur wenig Daten. In der hier vorliegenden Arbeit wurde als Modell das Invasionsprotein Internalin B des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* ausgewählt, um die Faltungseigenschaften und die Stabilität eines solchen LRR-Proteins näher zu charakterisieren. Am Beispiel zweier Fragmente des InlB wurde zum einen die Integrität der Internalin-Superdomäne (InlB₃₂₁*) und zum anderen die Faltung der LRR-Domäne (InlB₂₄₁) untersucht. InlB ist ein monomeres Protein, welches keine Disulfidbrücken aufweist, und sollte daher geeignet sein, um die erwähnten Fragestellungen bearbeiten zu können. In den folgenden zwei Kapiteln sollen zum einen die Stabilität und zum anderen der Faltungsmechanismus dieser zwei Domänen separat voneinander untersucht und dann miteinander verglichen werden. Im dritten Kapitel erfolgt eine biophysikalische Charakterisierung der LRR-Domäne unter sauren Bedingungen.

3.3.1 Stabilität der LRR- und Internalin-Domäne

3.3.1.1 De- und Renaturierungsgleichgewichtsübergänge

Vom InlB konnten sowohl die zur Invasion ausreichende LRR-Domäne sowie die sogenannte Internalin-Domäne separat kristallisiert und röntgenkristallographisch untersucht werden (siehe 1.4 und Abb. 3.2) (Marino *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2001). Die Stabilität der LRR- und der Internalin-Domäne wurde durch chemisch-induzierte De- und Renaturierungsgleichgewichtsübergänge charakterisiert. Als chemische Denaturantien wurden GdmCl und Harnstoff eingesetzt. Der Einfluss der Denaturierungsmittel auf die Tertiär- und die Sekundärstruktur konnte sowohl als Änderung in der Fluoreszenzemission als auch im Fern-UV-CD-Signal verfolgt werden.

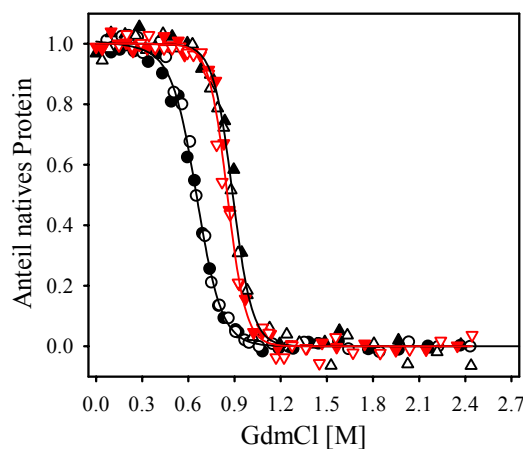


Abb. 3.8: GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergänge von InlB₂₄₁, InlB₃₂₁* und InlB₃₂₁*W124S

Denaturierungsübergänge von InlB₂₄₁ (●), InlB₃₂₁* (▲) und InlB₃₂₁*W124S (▼) und Renaturierungsübergänge (entsprechende Symbole nur offen) bei 20 °C nach einer Inkubation von 24 h. Dargestellt sind die gemessenen Fluoreszenzemissionen (Anregung: 280 nm) normiert auf den Anteil nativen Proteins. Der verwendete Puffer war 20 mM MOPS/NaOH, 1 mM EDTA, pH 7.5 und die Proteinkonzentration betrug 5 µg ml⁻¹. Die Linien (—) repräsentieren die Regression der jeweiligen Datenpaare nach Anwendung eines Zweizustandsmodell.

Die De- bzw. Renaturierung aller InlB-Konstrukte war nach Verdünnung in bzw. aus dem Denaturierungspuffer nach einer Inkubation von 24 h vollständig beendet. Beim InlB₂₄₁ zeigte sich die

Einstellung des Gleichgewichts bei 20 °C bereits nach 2 h (Daten nicht gezeigt). Prinzipiell wurden jedoch alle Übergänge für mindestens 24 h bei der jeweiligen Temperatur inkubiert.

Sowohl bei der LRR- als auch bei der Internalin-Domäne zeigte sich unabhängig vom verwendeten Denaturierungsmittel in der Tryptophanfluoreszenz ein kooperativer und vollständig reversibler Verlauf des Entfaltungs- und Rückfaltungsübergangs (Abb. 3.8). Eine Konzentrationsabhängigkeit im Bereich von 5 bis 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konnte weder für InlB₂₄₁, noch für InlB₃₂₁* festgestellt werden. Messungen des Fern-UV-CD-Signals bei 220 nm lieferten eine Signaländerung, die ebenfalls bei allen Konstrukten einen kooperativ verlaufenden Übergang zeigten und nach der Normierung mit den Änderungen in der Fluoreszenz deckungsgleich waren (exemplarisch am InlB₃₂₁* gezeigt, Abb. 3.9 A und B).

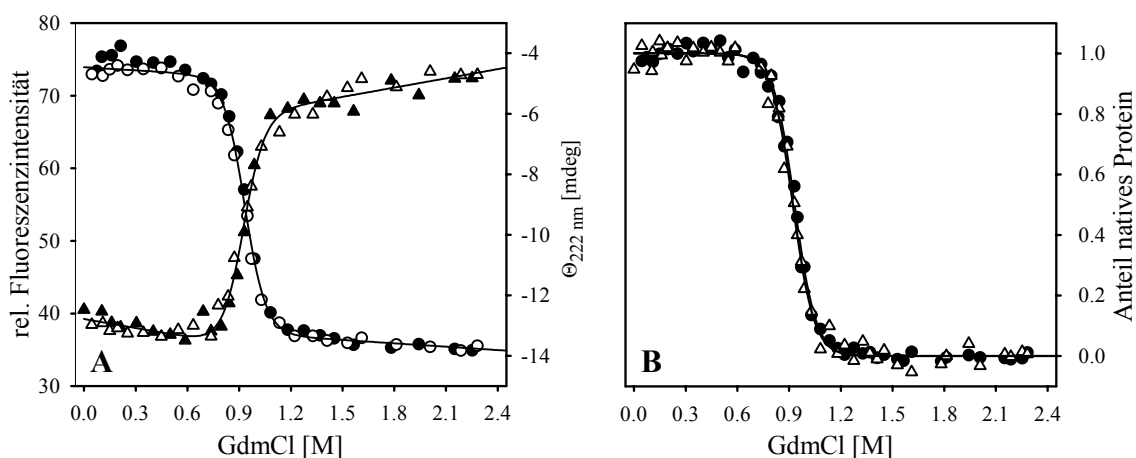


Abb. 3.9: GdmCl-induzierter Gleichgewichtsübergang von InlB₃₂₁*

A zeigt den De- (●,▲) und Renaturierungsübergang (○,△) gemessen in der Fluoreszenzemission (●,○) bei 328 nm (Anregung: 280 nm) und dem Fern-UV-CD (▲,△) bei 222 nm. **B** zeigt die auf den Anteil nativen Proteins normierten Daten. Die durchgezogenen Linien (—) in **A** und **B** repräsentieren ein Zweizustandsmodell zur Beschreibung der Daten. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in 20 mM MOPS/NaOH, 1 mM EDTA, pH 7.5 mit einer Proteinkonzentration von 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Diese Übereinstimmung bedeutet, dass die Tertiär- und Sekundärstruktur nicht unabhängig voneinander falten bzw. entfalten. Dass sich die Daten sehr gut mit einem Zweizustandsmodell beschreiben lassen, weist daraufhin, dass zum einen die Auffaltung der individuellen Wiederholungseinheiten in der LRR-Region einen kooperativen Prozess darstellt, und dass zum anderen die Internalin-Domäne als ganze Einheit faltet und entfaltet und nicht in separaten Faltungseinheiten.

InlB₃₂₁* besitzt zwei Tryptophane, welche in verschiedenen Subdomänen des Proteins lokalisiert sind und unterschiedliche Emissionswellenlängen aufweisen (siehe Abb. 3.7 B und C). Für InlB₃₂₁* musste folglich zunächst die Gültigkeit des thermodynamischen Zweizustandsmodells bestätigt werden, was durch Messung des Gleichgewichtsübergangs bei zwei verschiedenen Wellenlängen erfolgte. Neben der Emission bei 328 nm wurde auch die bei 345 nm detektiert und es ergab sich ein Gleichgewichtsübergang, dessen Ergebnis mit dem bei 328 nm übereinstimmte (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren konnte die Tryptophan-Mutante InlB₃₂₁*W124S zum Vergleich herangezogen werden. Diese Mutante besitzt nur das im Inneren der Ig-ähnlichen Domäne verborgene Tryptophan 285, weswegen hier die maximale Fluoreszenzemission in den blauwelligen Bereich verschoben ist (siehe 3.2.3). Harnstoff- bzw. GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergänge gemessen bei 312 nm, lieferten analog zu den bei 328 und 345 nm durchgeführten Messungen beim InlB₃₂₁* einen kooperativen und einphasigen Übergang.

Die Kooperativität der Übergänge in der Fluoreszenz und im Fern-UV-CD spricht gegen das Vorhandensein von Gleichgewichtsintermediaten. Eine weitere Möglichkeit, die Legitimität der Anwendung des Zweizustandsmodells zu überprüfen, ist mit dem Vergleich der Fluoreszenzspektren gegeben.

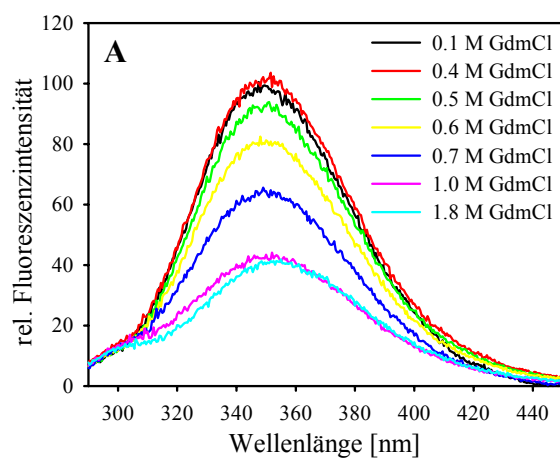
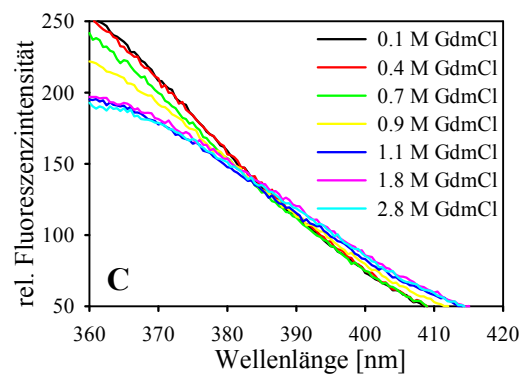
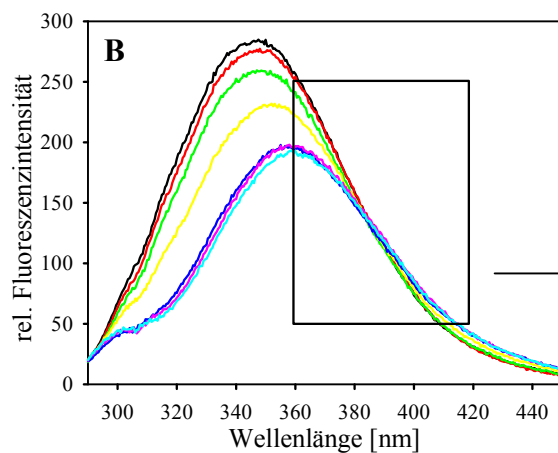


Abb. 3.10: Fluoreszenzmissionsspektren von InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁* bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen

A zeigt Emissionsspektren (Anregung: 280 nm) des InlB₂₄₁ bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen. B zeigt Emissionsspektren (Anregung: 280 nm) des InlB₃₂₁* bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen. Eine Vergrößerung des Wellenlängenbereichs von 360 bis 420 nm ist in C abgebildet.

Die Messungen wurden bei 20 °C in 20 mM MOPS/NaOH, 1 mM EDTA, pH 7.5 durchgeführt. Die Konzentration des Proteins lag jeweils bei 5 µg ml⁻¹.



Legt man Spektren, die bei verschiedenen Konzentrationen an Denaturierungsmittel im Gleichgewichtsübergang aufgenommen wurden, übereinander, so sollte ein isoemissiver Punkt zu erkennen sein. Im Falle des InlB₂₄₁ konnte ein solcher Punkt nicht beobachtet werden, was jedoch dadurch zu erklären war, dass sich die Änderung in der Fluoreszenzemission vom nativen zum denaturierten Zustand nur in einer minimalen Verschiebung des Emissionsmaximums in den rotwelligen Bereich und hauptsächlich durch eine Abnahme in der Intensität vollzog (Abb. 3.10 A). Diese minimale Verschiebung des Maximums ist, wie schon unter 3.2.3 diskutiert, durch die starke Exposition des Tryptophans 124 zu erklären. Ein Vergleich der Fluoreszenzmissionsspektren der De-

und Renaturierung bei gleicher GdmCl-Konzentration zeigte identische Spektren, was ein vollständiges Rückfalten des Proteins widerspiegelt (Daten nicht gezeigt). Beim InlB₃₂₁* hingegen war beim Übereinanderlegen der Emissionsspektren, die während der Denaturierung aufgenommen wurden, ein isoemissiver Punkt bei ungefähr 385 nm zu erkennen (Abb. 3.10 B und C). Die Spektren liefern keine Anhaltspunkte für einen möglicherweise existierenden intermediären Zustand. Allerdings sind beim InlB₂₄₁ als auch beim InlB₃₂₁* die Spektren im Mittelpunkt des Übergangs im Vergleich zum nativen Zustand hauptsächlich durch eine Intensitätsabnahme und nur durch eine leichte Rotverschiebung charakterisiert. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für ein Zweizustandsmodell zur Beschreibung der Messdaten aus der Gleichgewichtsentfaltung.

Unter der Annahme, dass ausschließlich native und denaturierte Zustände populiert sind, konnten die in Tabelle 3.4 aufgelisteten Werte für die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_U und die Kooperativität m mit Hilfe des Zweizustandsmodells nach dem linearen Extrapolationsmodell bestimmt werden (Greene & Pace, 1974; Santoro & Bolen, 1988). Der Kooperativitätsparameter m ist proportional zur Änderung der dem Lösungsmittel zugänglichen Proteinoberfläche zwischen dem entfalteten und dem nativen Zustand (Myers *et al.*, 1995).

Tab. 3.4: Thermodynamische Größen der Gleichgewichtsübergänge gemessen bei 20 °C

Method		InlB ₂₄₁	InlB ₃₂₁ *	InlB ₃₂₁ *W124S
Fluoreszenz	$\Delta G_{U, \text{Harnstoff}} [\text{kcal mol}^{-1}]$	5.5 ± 0.3	8.6 ± 0.2	9.3 ± 0.6
	$m_{\text{Harnstoff}} [\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}]$	3.4 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.6 ± 0.3
	$C_{m, \text{Harnstoff}} [\text{M}]$	1.6	2.1	2.0
	$\Delta G_{U, \text{GdmCl}} [\text{kcal mol}^{-1}]$	4.7 ± 0.3	8.8 ± 0.2	8.8 ± 0.6
	$m_{\text{GdmCl}} [\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}]$	7.1 ± 0.4	9.7 ± 0.2	10.3 ± 0.7
	$C_{m, \text{GdmCl}} [\text{M}]$	0.7	0.9	0.9
CD	$\Delta G_{U, \text{GdmCl}} [\text{kcal mol}^{-1}]$	5.0	8.7	n. b.
	$m_{\text{GdmCl}} [\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}]$	7.4	9.5	n. b.
	$C_{m, \text{GdmCl}} [\text{M}]$	0.7	0.9	n. b.
Theorie	$m_{\text{Harnstoff}} [\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}]$	2.5	3.2	3.2
	$m_{\text{GdmCl}} [\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}]$	5.1	6.6	6.6

Die Fehlerangaben resultieren aus Mehrfachmessungen. Die Gleichgewichtsübergänge gemessen im Fern-UV-CD erfolgten nur einmal, weswegen keine Fehler angegeben werden können. Unter der Methode „Theorie“ sind die nach Gl. 2.14 und 2.15 berechneten m -Werte gemeint (Myers *et al.*, 1995).

Die Werte für die freie Enthalpie der Entfaltung $\Delta G_{U, \text{GdmCl}}$ liegen für die LRR-Domäne bei $4.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ und für die Internalin-Domäne bei $8.8 \text{ kcal mol}^{-1}$. Die Stabilität der LRR-Domäne ist relativ niedrig für ein Protein von dieser Größe (Pfeil, 2001). Allgemein findet man für Proteine Stabilitäten zwischen 6 und 14 kcal mol^{-1} . Die Stabilität der Internalin-Domäne liegt genau in diesem Bereich. Aus den thermodynamischen Stabilitätsdaten wird deutlich, dass die Gegenwart der zusätzlichen Ig-ähnlichen Domäne im InlB₃₂₁* die Stabilität der aminoterminalen Hälfte des Proteins stark erhöht. Die freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit der Denaturantien zeigte im Vergleich

zum InlB₂₄₁ nahezu eine Verdopplung der Stabilität. Diese Stabilitätszunahme äußerte sich sowohl in einer Verschiebung des Übergangsmittelpunktes (C_m) zu einer höheren Konzentration an Denaturierungsmittel als auch in einer Erhöhung des m -Wertes (Tab. 3.4). Der Austausch des Tryptophans 124 gegen ein Serin beim InlB₃₂₁*W124S hat auf die Gesamtstabilität der Internalin-Domäne nur minimalen Einfluss. Die ΔG_U - und m -Werte sind praktisch identisch, die C_m -Konzentration ist aber etwas geringer als beim InlB₃₂₁*.

Ein ähnliches Verhalten in der Gleichgewichtsentfaltung konnte auch bei Proteinen mit anderen repetitiven Faltungstypen beobachtet werden. So falten z. B. die Tumorsuppressor Proteine p16 und p19 (siehe Abb. 1.7), bestehend aus vier und fünf Ankyrin *repeats*, sowie die Pektat Lyase C, welche sieben β -Helix-*repeats* besitzt, ebenfalls nach einem Zweizustandsmodell (Tang *et al.*, 1999; Kamen *et al.*, 2000; Zeeb *et al.*, 2002).

In kooperativen Gleichgewichtsentfaltungen von kleinen globulären Proteinen (bis zu einer Größe von 100 Aminosäuren) zeigt der m -Wert während der Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit der Proteinoberfläche bei der Entfaltung eine lineare Korrelation mit der Größe des Proteins (Myers *et al.*, 1995). Je steiler die Kooperativität eines Gleichgewichtsüberganges ist, also je größer der m -Wert ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass der Prozess der Denaturierung in einem kooperativen Schritt erfolgt und das Protein vollständig entfaltet ist (Fersht, 2002). Mit Hilfe dieser Korrelation lassen sich für globuläre Proteine von der Größe des InlB₂₄₁ (23.3 kDa) und des InlB₃₂₁* (32.3 kDa) m -Werte für die Entfaltung vorhersagen (Tabelle 3.4). Für die GdmCl-induzierte Entfaltung von InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁* erhält man experimentell bestimmte m -Werte von 7.1 und 9.7 kcal mol⁻¹ M⁻¹ und berechnete von 5.1 und 6.6 kcal mol⁻¹ M⁻¹. Eine Harnstoff-induzierte Entfaltung resultiert für InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁* in einem experimentellen m -Wert von 3.4 und 4.0 kcal mol⁻¹ M⁻¹ und in einem berechneten von 2.5 und 3.2 kcal mol⁻¹ M⁻¹. Die praktisch bestimmten m -Werte sind bei beiden Konstrukten um 30 % größer als die theoretisch berechneten. Die erhöhten Kooperativitätswerte der LRR- und der Internalin-Domäne deuten folglich darauf hin, dass die zwei Proteine ohne signifikant populierte Gleichgewichtsintermediate entfalten. Entsprechend der länglichen Form dieser solenoid-ähnlichen Domänen mit ihrem relativ großen Oberflächen-Volumen-Verhältnis, ist die hohe Kooperativität sehr überraschend. Elongierte Proteine besitzen im nativen Zustand eine höhere Lösungsmittelzugänglichkeit und sollten deshalb kleinere m -Werte aufweisen als globuläre Proteine. Bisher konnte nämlich beobachtet werden, dass die m -Werte der Denaturierung mit der Änderung der Oberfläche während der Entfaltung korrelieren (Myers *et al.*, 1995).

Vergleicht man die Internalin B-Konstrukte mit und ohne Cystein, so sind die Stabilitäten im Rahmen des Fehlers nahezu identisch (vergleiche Tabelle 3.4 und 3.11). Ob der Unterschied von 2.3 kcal mol⁻¹ bei den ΔG_U -Werten der Harnstoff-induzierten Übergänge des InlB₃₂₁* und InlB₃₂₁ signifikant ist, ist nicht eindeutig zu sagen. Diese Differenz ist höchstwahrscheinlich durch die relativ hohen Fehler in den Messungen des InlB₃₂₁ begründet und sollte gegebenenfalls durch erneute Messungen abgesichert

werden. Die Kooperativitäten der Gleichgewichtsübergänge sind bei allen Messungen im Rahmen des Fehlers identisch.

3.3.1.2 Thermische Stabilität

Nachdem sich zeigte, dass die zwei Proteinkonstrukte nach einer chemisch-induzierten Entfaltung vollständig und ohne detektierbare Intermediate zurückfalten, stellte sich die Frage, ob die gleichen Beobachtungen auch nach einer temperaturinduzierten Entfaltung der Domänen zu beobachten wären. Sollte sich nach einer thermischen Denaturierung ein reversibles Faltungsverhalten bei einem Protein registrieren lassen, so kann die Stabilisierungsenthalpie direkt bestimmt werden. Ein Vorteil dabei ist es, über die Wirkungsweise von Denaturierungsmitteln keine Annahmen machen zu müssen.

Die wohl exakteste Methode zur Bestimmung thermodynamischer Parameter und der Wärmekapazität einer Proteinlösung in Abhängigkeit von der Temperatur, stellt die *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) dar (siehe 2.4.11). Abbildung 3.11 A zeigt die thermische Entfaltung des InLB₂₄₁ und InLB₃₂₁* anhand einer kalorimetrischen Messung im Temperaturbereich von 5 bis 70 °C. Bei den beiden Konstrukten war im Verlauf der Messung ein endothermer Peak zu beobachten, was bedeutet, dass eine Energieaufnahme während des Entfaltens erfolgte. Vergleichbar mit den Gleichgewichtsübergängen konnte auch hier beim InLB₃₂₁* keine separate Entfaltung der LRR- und Ig-ähnlichen Domäne beobachtet werden, was für die Superdomäne des InLB spricht. Die beobachteten temperaturinduzierten Übergänge resultierten bei beiden Protein-Konstrukten in Aggregation, was sich in dem relativ steilen Abfall des Kurvenverlaufes widerspiegelte. Ein wiederholtes Aufheizen der gleichen Proteinlösung (exemplarisch gezeigt am InLB₂₄₁) zeigte einen kleineren endothermen Peak, der nicht mehr als ~ 57 % von der ursprünglichen Änderung der Wärmekapazität entsprach (Abb. 3.11 B). Beim InLB₂₄₁ konnte zudem beobachtet werden, dass ein Abbrechen der thermischen Entfaltung des Proteins in der DSC unmittelbar nach Erreichen des T_m bei aufeinanderfolgenden Messungen in einer partiellen Reversibilität von ~ 80 % bei Messung 2 resultierte (Daten nicht gezeigt). Eine weitere dritte Aufheizung führte zu einem DSC-Peak von nur noch 5 % im Vergleich zur ersten Aufheizung. Eine Variation der Heizrate (von 60 K h⁻¹ auf 90 K h⁻¹) und der Proteinkonzentration resultierte in keiner Minderung der Aggregation. Die Messungen bei verschiedenen Heizraten waren im Rahmen der Messgenauigkeit identisch (Daten nicht gezeigt).

Mit dieser Messmethode war es möglich, eine Bestimmung der Schmelztemperatur T_m und der Enthalpie ΔH_{cal} durchzuführen. An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass die DSC-Peaks von aggregierten Proteinlösungen Werte für T_m und ΔH_{cal} liefern, die in der Regel zu klein sind. Diese Abweichung ist durch die Verformung des sonst normalerweise symmetrisch verlaufenden Peaks zu erklären. Aufgrund der einsetzenden Aggregation während der Aufheizung der Probe kommt es zu einem verfrühten Abfall (was einen Einfluss auf T_m hat) und somit zu einem schmalen Peak und kleinerem ΔH_{cal} (ΔH_{cal} ist als Fläche unter dem Peak definiert). Folglich konnte auch keine direkte

Bestimmung der Wärmekapazität erfolgen. Da die irreversible Aggregation die Bestimmung thermodynamischer Parameter erschwert, erfolgte die Analyse der Stabilitäten der LRR- und Internalin-Domäne zunächst nur in Bezug auf die Schmelztemperatur.

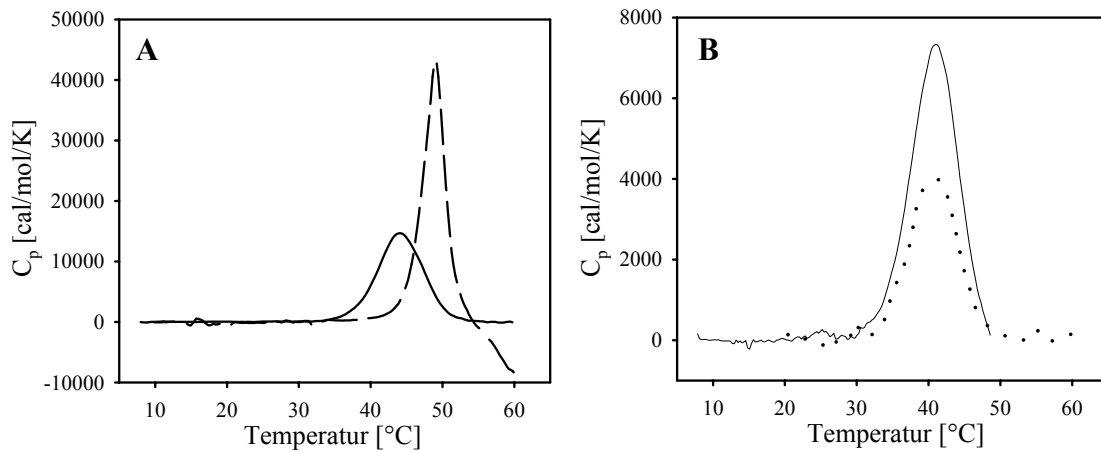


Abb. 3.11: Thermisch-induzierter Entfaltungsübergang von InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁*

A zeigt eine thermische Entfaltung von InlB₂₄₁ (—) und InlB₃₂₁* (---) gemessen mit der *Differential Scanning Calorimetry*. Die Messungen erfolgten in 10 mM MOPS/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 0.37 mg ml⁻¹ für InlB₂₄₁ und 0.2 mg ml⁻¹ für InlB₃₂₁*. **B** zeigt das wiederholte aufheizen (···) einer thermisch entfalteten (—) InlB₂₄₁-Lösung. Die Messungen erfolgten in 10 mM MOPS/NaOH, 1 mM EDTA, pH 7.5 bei einer Konzentration von 0.35 mg ml⁻¹. Die Heizrate betrug 1 K min⁻¹. Für einen besseren Vergleich der einzelnen DSC-Profile, wurde jeder Lauf auf Null normiert.

Die DSC-Messungen lieferten Werte für den T_m von 44.1 °C ± 0.2 (InlB₂₄₁), 48.9 °C ± 0.2 (InlB₃₂₁*) und 49.2 °C ± 0.2 (InlB₃₂₁*W124S). Auch hier zeigte sich, analog zu den chemisch-induzierten Gleichgewichtsentfaltungen, der stabilisierende Effekt der Ig-ähnlichen Domäne auf den aminoterminalen Abschnitt des InlB. Der Austausch des Tryptophans resultierte im Vergleich zum pseudo-Wildtyp in keinem Verlust der thermischen Stabilität.

Vergleicht man diese Daten mit denen zur thermisch-induzierten Entfaltung des aus vier Ankyrin *repeats* bestehenden p16, so verläuft diese ebenfalls irreversibel. Eine verkürzte Variante des Proteins hingegen zeigte ein vollständig reversibles Faltungsverhalten (Zhang & Peng, 2000). Die Ankyrindomäne des Notch Rezeptors, welche aus sieben *repeats* aufgebaut ist, konnte hingegen nur unter Zusatz von moderaten Harnstoff-Konzentrationen (1 M) zu einer reversiblen Faltung gebracht werden. Die Schmelztemperaturen lagen bei 45.1 °C (0 M Harnstoff) und bei 39.5 °C (1 M Harnstoff) (Zweifel & Barrick, 2001a). Die einzigen thermischen Entfaltungsdaten die es zu einem LRR-Protein gibt, stammen vom Ribonuklease-Inhibitor (15 LRR). Auch er zeigte Aggregation mit einem T_m von 53 °C (Klink *et al.*, 2001).

Die oben beschriebenen DSC Messungen wurden alle in Gegenwart von 100 mM NaCl durchgeführt. Bekannt ist, dass der Zusatz von geringen Salzkonzentrationen zu einer Proteinlösung oft einen

stabilisierenden Effekt bewirkt (Arakawa & Timasheff, 1982; 1984). Es sollte im weiteren untersucht werden, ob der Salzgehalt von 100 mM NaCl auch einen solchen Effekt bewirkte.

Beim InlB₂₄₁ wurde der Einfluss der Salzkonzentration auf die thermische Stabilität nur anhand von NaCl untersucht. Es konnte eine leichte Stabilisierung der LRR-Domäne unter Zugabe verschiedener NaCl-Konzentrationen erreicht werden und die Schmelztemperatur der Proteinlösung durch die Zugabe von bis zu 300 mM NaCl von 41 auf 45.3 °C erhöht werden (Abb. 3.12 A). Neben diesem stabilisierenden Effekt wurde zusätzlich auch die Aggregation geringfügig verringert. Das Abbrechen der thermischen Denaturierung in Gegenwart von 100 mM NaCl unmittelbar nach dem T_m führte bei einer zweiten Aufheizung zu einem Peak, der ~ 90 %, und bei einer dritten Aufheizung zu einem Peak, der ~ 23 % vom ersten entsprach (Abb. 3.12 B).

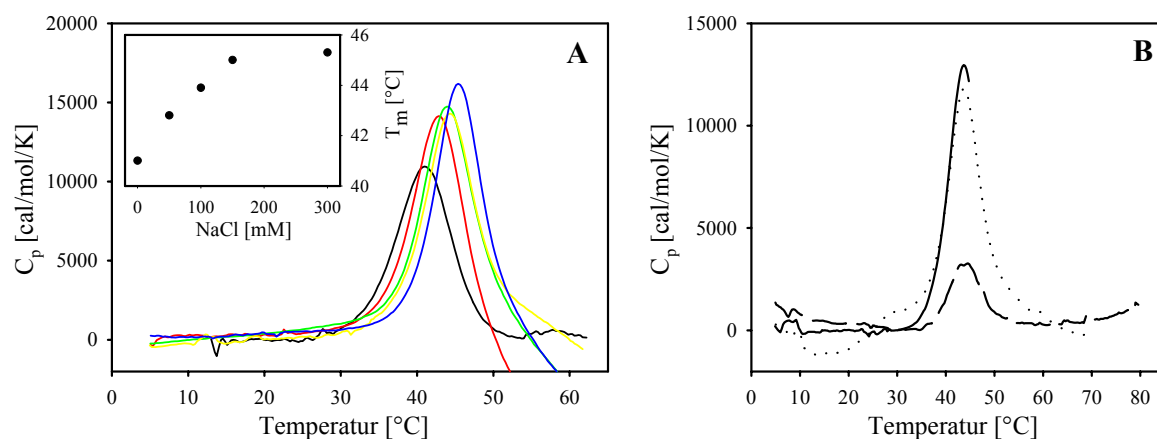


Abb. 3.12: Thermisch-induzierte Entfaltungen des InlB₂₄₁ in Gegenwart von NaCl

A zeigt die thermische Entfaltung des InlB₂₄₁ gemessen mit *Differential Scanning Calorimetry* in Gegenwart von verschiedenen NaCl-Konzentrationen (0 mM: —; 50 mM: —; 100 mM: —; 150 mM: — und 300 mM: —). Das Insert zeigt die Abhängigkeit des T_m von der NaCl-Konzentration. Die Proteinkonzentration lag zwischen 0.34 und 0.45 mg ml⁻¹. Für einen besseren Vergleich der einzelnen DSC-Profile, wurde immer auf Null normiert. **B** zeigt die wiederholte Aufheizung einer InlB₂₄₁-Lösung (1. Lauf: —; 2. Lauf: ···; 3. Lauf: ---). Die Proteinkonzentration lag bei 0.43 mg ml⁻¹. Die Messungen erfolgten in 10 mM MOPS/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5. Die Heizrate betrug 1 K min⁻¹.

Im Vergleich zu den Cystein-haltigen Varianten, InlB₃₂₁ und InlB₂₄₈, ergaben sich in Abwesenheit von NaCl unterschiedliche Schmelztemperaturen (Tabelle 3.11 für die Cystein-haltigen Proteine). InlB₂₄₁ weist einen um ungefähr 1.2 °C geringeren T_m auf als InlB₂₄₈ (40.9 °C anstelle von 42.1 °C). Bei InlB₃₂₁* ist die Schmelztemperatur sogar um etwa 3 °C geringer als die des InlB₃₂₁ (45.8 °C anstatt 48.9 °C). Dass Austauschen des Cysteins 242 gegen Serin bzw. das Entfernen der letzten sieben Aminosäuren beim InlB₂₄₁ scheint, entgegen den Ergebnissen der chemisch-induzierten Gleichgewichtsübergängen, doch zu einem gewissen thermischen Stabilitätsverlust in den Proteinen zu führen.

Zusätzlich zu den DSC-Versuchen wurde die thermische Entfaltung der LRR- und der Internalin-Domäne mittels Fern-UV-CD untersucht. Die temperatur-induzierte Entfaltung der zwei Domänen resultierte in einer Signaländerung bei 220 nm, die einem kooperativen Übergang entsprach (Abb. 3.13). Die Entfaltung verlief irreversibel, und in der Küvette war nach der Aufheizung aggregiertes Protein sichtbar. Anhand von Spektren, die im Abstand von 10 °C aufgenommen wurden, konnte die Entfaltung der Proteine verfolgt werden (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich jeweils eine Abnahme in der Elliptizität, was den Verlust der Sekundärstruktur und den Übergang zum *random-coil* Zustand charakterisierte. Bevor die Aggregation der Proteinlösung einsetzte, war der Verlust an Sekundärstruktur zu beobachten. Auf wiederholte Aufheizungen wurde verzichtet.

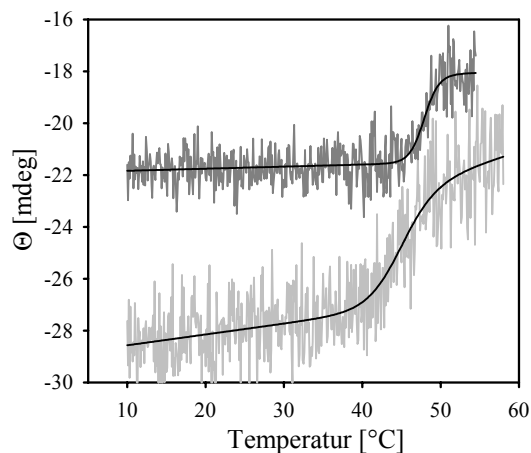


Abb. 3.13: Thermisch-induzierte Entfaltung von InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁*.

Thermisch-induzierte Entfaltung von InlB₂₄₁ (—) und InlB₃₂₁* (---) gemessen im Fern-UV-CD. Die Messungen erfolgten bei 220 nm (InlB₂₄₁) bzw. 222 nm (InlB₃₂₁*) in 10 mM MOPS/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5. Die Proteinkonzentration betrug ungefähr 100 µg ml⁻¹ und die Heizrate 1 K min⁻¹. Die durchgezogenen Linien (—) repräsentieren die Regression der jeweiligen Messdaten nach einem Zweizustandsmodell.

Auch wenn die Anwendung eines Zweizustandsmodells zur Beschreibung der CD-Daten hier genauso wenig zulässig war wie bei den DSC-Daten, wurde es dennoch angewandt, um die LRR- und Internalin-Domäne bezüglich der aus dem Fit erhaltenen T_m -Werte vergleichen zu können. Für InlB₂₄₁ ergab sich ein T_m von 44.9 °C und für InlB₃₂₁* von 48.5 °C, in Übereinstimmung mit den Resultaten aus der DSC.

3.3.1.3 Bestimmung der freien Enthalpie der Stabilisierung

Eine der wichtigsten Darstellungsarten der thermodynamischen Stabilität eines Proteins ist die sogenannte Stabilitätskurve bzw. das Stabilitätsprofil (Privalov & Khechinashvili, 1974; Privalov, 1979; Schellman *et al.*, 1981; Becktel & Schellman, 1987). In dieser Darstellung wird die Temperaturfunktion für die Änderung der freien Enthalpie der Entfaltung (ΔG_U) abgebildet. Die Temperaturabhängigkeit von ΔG_U ist stark gekrümmt, was zur Folge hat, dass die Stabilität eines Proteins sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Temperaturen abnimmt. Das Protein zeigt somit neben der Hitze- auch eine Kältedenaturierung. Die Denaturierung eines Proteins durch Hitze wird dabei durch die Zunahme der Entropie und die durch Kälte durch eine Abnahme der Enthalpie angetrieben (Brandts, 1964; Privalov, 1990; Hallerbach & Hinz, 1999). Beim Betrachten eines solchen Stabilitätsprofils ist die Funktion bei der Schmelztemperatur T_m wegen $K = 1$ definitionsgemäß gleich Null. Zudem hat die Funktion einen Maximalwert bei einer Temperatur, bei der wegen

$d(\Delta G)/dT = -\Delta S = 0$ beim Schnittpunkt der Entropiefunktion mit der Nullachse vorliegt. Zusätzlich zu den gelieferten Stabilitätswerten ist die Form des Stabilitätsprofils mit anderen thermodynamischen Parametern verbunden (Schellman *et al.*, 1981; Becktel & Schellman, 1987). Die Krümmung der Stabilitätskurve entsteht, weil die Wärmekapazität ΔC_p des entfaltenen Proteins bei konstantem Druck größer ist, als die des nativen. Die Änderung der Wärmekapazität der Entfaltung, mit N als Referenzzustand, ist definiert als:

$$\Delta C_p = C_{p,U} - C_{p,N} = \left(\frac{\partial(\Delta H)}{\partial T} \right)_p = \left(\frac{T\partial\Delta S}{\partial T} \right)_p \quad (Gl. 3.1)$$

Alle bisher bestimmten Stabilitätskurven der verschiedensten Proteine zeigten eine negative Krümmung im Kurvenverlauf, was auf ein positives $\Delta C_{p,U}$ der Entfaltung hindeutet. Dieses positive $\Delta C_{p,U}$ verleiht der Stabilitätskurve schließlich eine Form, die an eine umgekehrte Parabel erinnert. Stabilitätskurven geben somit einen sehr ausführlichen Einblick in die Thermodynamik von Proteininstabilitäten und wurden in letzter Zeit häufig dazu verwendet, die Ursprünge der erhöhten Thermostabilität von Proteinen aus thermophilen Organismen zu beschreiben (Hollien & Marqusee, 1999a,b; Deutschmann & Dahlquist, 2001; Kumar *et al.*, 2001). Es muss noch betont werden dass die thermodynamische Stabilität einer Proteinstruktur nur dann bestimmt werden kann, wenn die Struktur in einem kooperativen Übergang entfaltet. Für Proteine die aus mehreren Domänen bestehen, kann ΔG_U nicht für das gesamte Protein angegeben werden, da K_U und ΔG_U bei T_m nicht gleich Null sind. Die freie Enthalpie der Entfaltung kann in diesen Fällen nur für die einzelnen kooperativen Übergänge angegeben werden (Privalov, 1982; Privalov & Gill, 1988). Um ein Stabilitätsprofil eines Proteins erhalten zu können, gibt es drei Vorgehensweisen, die bereits unter 2.4.12.5 ausführlicher beschrieben wurden.

Wie sich zeigte, folgten sowohl die LRR- als auch die Internalin-Domäne nur in der chemischen Denaturierung einem Zweizustandsmodell (siehe 3.3.1.1). Die direkte Bestimmung der thermodynamischen Parameter ΔH_U , $\Delta C_{p,U}$ und ΔG_U für die Entfaltungsreaktion aus DSC-Messungen gilt strikt nur für Proteinsysteme, die einem reversiblen Zweizustandsmodell folgen, und kann daher nicht ohne weiteres durchgeführt werden. Der Denaturierungsübergang der LRR- und der Internalin-Domäne tritt nur als ein einziger Peak auf und die nach der Pufferlinienkorrektur resultierende Form erscheint als symmetrisch (Abb. 3.11 A). Obwohl die thermische Entfaltung nicht reversibel verläuft, könnten die DSC-Daten nach einer ersten Annäherung mit einem Zweizustandsmodell behandelt werden. Als diagnostisches Hilfsmittel zur Überprüfung, ob ein temperaturinduzierter Konformationsübergang einem Zweizustandsmodell folgt, kann die Bestimmung des Verhältnisses von der kalorimetrisch gemessenen Enthalpie (ΔH_{cal}) und der van't Hoff Enthalpie ($\Delta H_{v.H.}$) herangezogen werden. Liegt ein Zweizustandsmodell vor, so sollten beide Parameter gleich groß sein.

Über die Schmelztemperatur T_m und die Peakbreite in halber Peakhöhe $\Delta T_{1/2}$, kann mittels einer Näherungsformel (Gl. 3.2) eine Berechnung von $\Delta H_{v.H.}$ erfolgen (Privalov & Khechinashvili, 1974):

$$\Delta H_{v.H.} = \frac{4 \cdot R T_m^2}{\Delta T_{1/2}} \quad (\text{Einheit: J mol}^{-1}) \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.5 angegeben. Es zeigte sich bei beiden Konstrukten, dass die kalorimetrisch gemessene Enthalpie jeweils kleiner als die van't Hoff Enthalpie war. Bei einem erlaubten Fehler von 5 % bestätigte sich für die LRR-Domäne das Vorliegen eines Zweizustandsmodells (Privalov, 1979). Bei der Internalin-Domäne hingegen war die Abweichung doch signifikant und kann durch verschiedene Ursachen erklärt werden. Kleinere ΔH_{cal} werden erhalten, wenn beispielsweise die Proteinkonzentration überbestimmt ist, die Proteinkonzentration zwar genau bestimmt wurde, aber nicht alle Proteinmoleküle korrekt gefaltet sind, die Basislinienkorrektur falsch durchgeführt wurde oder der DSC-Peak durch Aggregationsereignisse verformt wurde. Der letzte Punkt scheint in diesem Fall zunächst den größten Einfluss zu haben.

Tab. 3.5: Thermodynamische Größen der Analysen bezüglich der Gültigkeit eines Zweizustandsmodells

	T_m [K]	$\Delta T_{1/2}$ [K]	ΔH_{cal} [kcal mol ⁻¹]	$\Delta H_{v.H.}$ [kcal mol ⁻¹]	$\Delta H_{cal} / \Delta H_{v.H.}$
InlB ₂₄₁	317.2	7.2	109.4	111.5	0.98
InlB ₃₂₁ *	322.1	3.5	171.6	238.4	0.72

Die Auswertung der DSC-Peaks erfolgte mit Microcal. Origin DSC. Die thermodynamischen Größen T_m , $\Delta T_{1/2}$ und ΔH_{cal} ergaben sich aus der Integration der gemessenen DSC-Peaks bei pH 7.5.

Es wurde daher zunächst versucht, Bedingungen zu finden, unter denen die InlB-Konstrukte, und im besonderen die Internalin-Domäne, einem Zweizustandsverhalten folgen. Dazu wurden DSC-Messungen über einen breiten pH-Bereich (3.25 bis 10.5) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten in Gegenwart von 100 mM NaCl, da dies, wie bereits unter 3.3.1.2 beschrieben, das Aggregationsverhalten bei der thermischen Denaturierung minimierte. In Abb. 3.14 A und B sind repräsentative DSC-Messungen der beiden Domänen bei verschiedenen pH-Werten gezeigt. Über den ganzen pH-Bereich konnten weder für das InlB₂₄₁, noch für das InlB₃₂₁*, Bedingungen gefunden werden, unter denen eine nahezu vollständige Reversibilität bei wiederholten Aufheizungen zu beobachten war. Beim InlB₂₄₁ deutete sich im Vergleich zu Messungen bei pH 7.5 eine Zunahme des reversibel faltenden Proteinanteils oberhalb von pH 8.0 an. Beim InlB₃₂₁* konnte diese Beobachtung im Säuren unterhalb von pH 4.0 beobachtet werden.

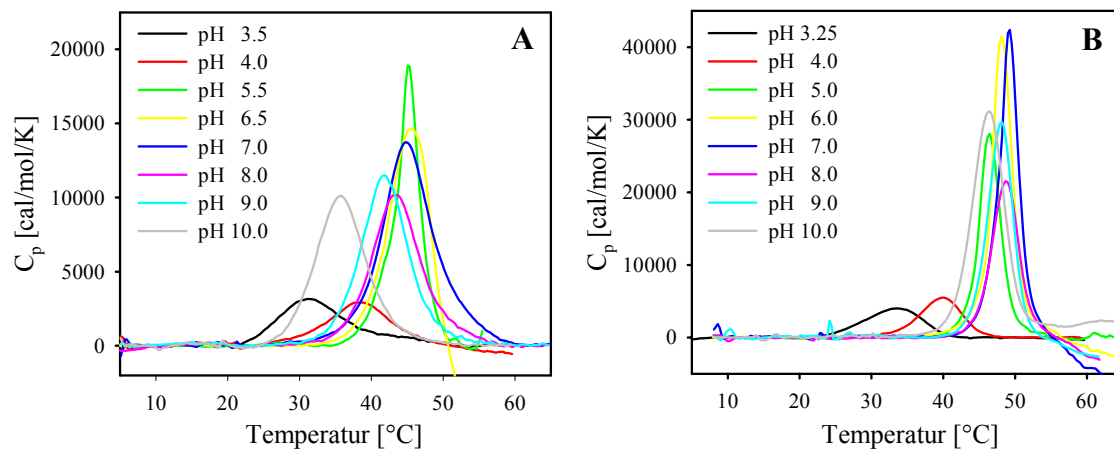


Abb. 3.14: DSC-Messungen von InIB₂₄₁ und InIB₃₂₁* bei verschiedenen pH-Werten

A zeigt die thermischen Entfaltungen des InIB₂₄₁ und **B** die des InIB₃₂₁* bei verschiedenen pH-Werten. Für die verschiedenen pH-Bereiche wurden folgende Puffersubstanzen verwendet: 3.25 bis 3.75: Glycin/HCl; 4.0 bis 4.5: Na-Acetat; 5.5 bis 6.0: MES/NaOH; 6.5 bis 7.5: MOPS/NaOH; 8.0 bis 8.5: Bicine/NaOH; 9.0 bis 9.75: CHES/NaOH und 10.0 bis 10.5: CAPS/NaOH. Jeder Puffer enthielt 10 mM der genannten Puffersubstanz, 100 mM NaCl und 1 mM EDTA. Die Proteinkonzentration lag zwischen 0.2 und 0.45 mg ml⁻¹. Für einen besseren Vergleich der einzelnen DSC-Profile, wurden alle Läufe auf Null normiert.

Die Auswertung der einzelnen DSC-Peaks bezüglich der Schmelztemperatur und ΔH_{cal} ist aufgrund der einsetzenden Aggregation nach überschreiten des T_m etwas erschwert (siehe 3.3.1.2) und erfolgte deswegen auf verschiedene Art und Weise. Wie auch schon unter 2.4.12.4 beschrieben, wurde ein Zweizustandsmodell und eine Integration der gesamten Peakflächen unter Verwendung einer linear bzw. einer kubisch angelegten Basislinie angewendet, um eine durch Aggregation verursachte Abweichung von der Peaksymmetrie ausgleichen zu können. In Tabelle 3.6 und 3.7 sind die erhaltenen Mittelpunkte der thermischen Entfaltungen (als T_m^{pH} bezeichnet) und die Enthalpieänderungen nach Anwendung der verschiedenen Auswerteverfahren in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgelistet. Wegen der Aggregationstendenz des Proteins, auf die die Auswertemethoden unterschiedlich reagieren, weichen die ΔH_{cal} -Werte unterschiedlich stark voneinander ab. Die Bestimmung des T_m^{pH} erfolgte nahezu unproblematisch.

Tab. 3.6: Thermodynamische Größen aus den DSC-Messungen des InIB₂₄₁ bei verschiedenen pH-Werten

pH	T _m ^{pH} [°C] linear	ΔH _{cal} [kcal mol ⁻¹]	T _m ^{pH} [°C] kubisch	ΔH _{cal} [kcal mol ⁻¹]	T _m ^{pH} [°C] Zweizustand	ΔH _{cal} [kcal mol ⁻¹]
3.50	31.2	39.9	31.2	38.8	32.0	45.8
4.00	37.8	26.5	37.8	29.5	38.3	41.5
4.50	43.6	73.4	43.6	68.5	42.8	91.9
5.50	45.1	92.5	45.1	94.7	44.9	110
6.50	45.6	95.1	45.6	107.3	45.5	110
7.00	44.8	116	44.8	110	45.0	104
7.50	43.8	109.8	44.1	109.4	44.1	107
8.00	43.6	116.4	43.3	101	43.5	91.4
8.50	43.0	106.2	43.0	101.9	43.2	94.5
9.00	41.8	126.3	41.8	98.2	41.8	97.8
9.50	--	--	39.8	85.7	39.7	88
9.75	38.8	67.9	38.8	66.8	38.9	71
10.00	--	--	35.6	93.2	35.5	88
10.25	--	--	33.1	69	31.5	68.5
10.50	--	--	28.9	39.7	24.1	37.3

Tab. 3.7: Thermodynamische Größen aus den DSC-Messungen des InIB₃₂₁* bei verschiedenen pH-Werten

pH	T _m ^{pH} [°C] linear	ΔH _{cal} [kcal mol ⁻¹]	T _m ^{pH} [°C] kubisch	ΔH _{cal} [kcal mol ⁻¹]	T _m ^{pH} [°C] Zweizustand	ΔH _{cal} [kcal mol ⁻¹]
3.25	--	--	33.8	45.9	30.9	50.8
3.50	--	--	34.9	53.7	33.4	61.8
3.75	--	--	38.0	83.9	37.1	86.3
4.00	--	--	40.1	41.5	40.2	67.1
4.25	--	--	43.0	108	42.5	107
4.50	45.1	196.6	45.1	171.9	45.0	152
5.00	46.5	121.4	46.5	127.7	46.5	143
5.50	47.0	151.3	47.0	148	47.2	164
6.00	48.1	170	48.1	160.2	48.2	175
7.00	49.3	163	49.3	166.8	49.2	177
7.50	48.9	174.4	48.9	171.6	48.9	179
8.00	48.8	159.5	48.8	153	48.7	160
9.00	48.2	138	48.2	133	47.9	152
9.50	47.3	175.7	47.3	174.4	47.1	168
10.00	46.3	170.3	46.3	174.5	46.2	159

Die für die weitere Auswertung verwendeten Werte, sowohl aus Tabelle 3.6 als auch aus 3.7, sind in fett dargestellt. Leere Kästchen kennzeichnen Messungen, die nicht durch Anwendung einer linearen Basislinie ausgewertet werden konnten.

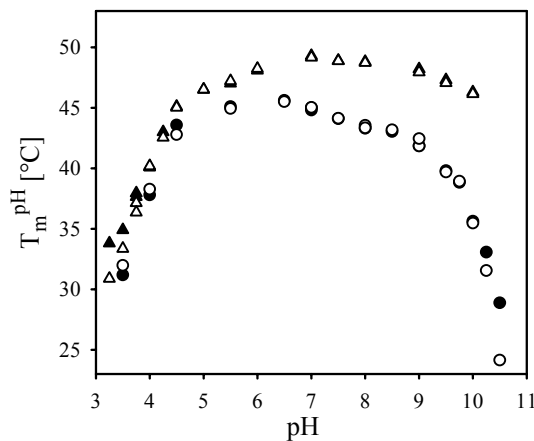


Abb. 3.15: Abhängigkeit der Schmelztemperatur des InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁* vom pH-Wert

Abhängigkeit der Schmelztemperatur T_m^{pH} des InlB₂₄₁ (●,○) und InlB₃₂₁* (▲,△) vom pH-Wert. Gezeigt sind die Ergebnisse der Auswertungen nach Anwendung einer kubischen Basislinie und Integration des resultierenden DSC-Profiles (●,▲) und Anwendung eines Zweizustandsmodells (○,△). Die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 3.6 und 3.7 aufgelistet.

Abbildung 3.15 verdeutlicht die Änderung des T_m^{pH} in Abhängigkeit vom pH-Wert. Sie zeigte beim InlB₂₄₁ im pH-Bereich von 3.5 bis 6.5 zunächst eine Zunahme um ungefähr 15 °C von 31 auf 46 °C und fiel dann im basischen Bereich bis pH 10.5 um abermals 15 °C ab. Im pH-Bereich von 4.5 bis 8.5 lag der T_m^{pH} nahezu stabil bei 44 bis 46 °C. Zwischen pH 6.5 und 8.5 war bei pH 7.5 ein geringerer T_m^{pH} zu registrieren. Dies könnte durch die Titration eines Histidinrestes verursacht sein, aufgrund seines isoelektrischen Punktes (pI) von 7.47. Beim InlB₃₂₁* war im sauren Bereich eine zum InlB₂₄₁ ähnliche Zunahme des T_m^{pH} zu verzeichnen, jedoch stieg diese um ca. 18 °C von 31 °C bei pH 3.25 auf 49 °C bei pH 7.0. Im basischen pH-Bereich war bei der Internalin-Domäne keine Temperatur-Abhängigkeit zu erkennen. Das Protein weist in einem relativ breiten pH-Bereich (5.5 bis 10.0) nur eine minimale Änderung des T_m^{pH} auf. Verwendet man diesen Temperaturbereich als Maß für die Stabilität des Proteins, so sind beide Proteine erstaunlicherweise recht tolerant gegenüber größeren pH-Änderungen. Sie weisen im Bereich ihrer berechneten isoelektrischen Punkte (InlB₂₄₁ bei 5.78 und InlB₃₂₁* bei 6.53), wo Proteine keine Nettoladung besitzen, die maximale Stabilität auf. Solch ein Zusammenhang mit dem isoelektrischen Punkt wird allgemein bei globulären Proteinen beobachtet (Pace *et al.*, 1991).

Die direkte Bestimmung von ΔC_p aus den DSC-Messungen ist wegen der Proteinaggregation nicht gegeben. Es ist aber möglich, ΔC_p mit Hilfe des Kirchoff-Gesetzes (Gl. 3.1) über die graphische Auftragung von ΔH_{cal} gegen T_m^{pH} zu ermitteln. Für beide Domänen ist dieser Plot in Abb. 3.16 A und B dargestellt. Bei der Erstellung der Graphiken wurden hauptsächlich die T_m^{pH} - und ΔH_{cal} -Werte verwendet, die das Resultat der Integration der DSC-Peaks unter Verwendung einer kubischen Basislinie und Anwendung des Zweizustandsmodells waren. Die Bestimmung von ΔC_p erfolgte aus der Steigung der Regressionsgeraden. Sie lieferte für InlB₂₄₁ ein ΔC_p von 3.21 kcal mol⁻¹ K⁻¹ (Korrelationskoeffizient der linearen Regressionsgeraden $r^2 = 0.82$) und für InlB₃₂₁* ein ΔC_p von 7.37 kcal mol⁻¹ K⁻¹ ($r^2 = 0.91$). Die Regressionsgeraden deuteten darauf hin, dass das ΔC_p über den gegebenen Temperaturbereich konstant ist. In den meisten Fällen ist der experimentelle

Temperaturbereich jedoch nicht ausreichend, um Abweichungen von der Linearität beobachten zu können (Pfeil, 1998a). Eine nicht-lineare Temperaturabhängigkeit wurde für Ubiquitin und die Ribonuklease T1 beschrieben (Wintrode *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994).

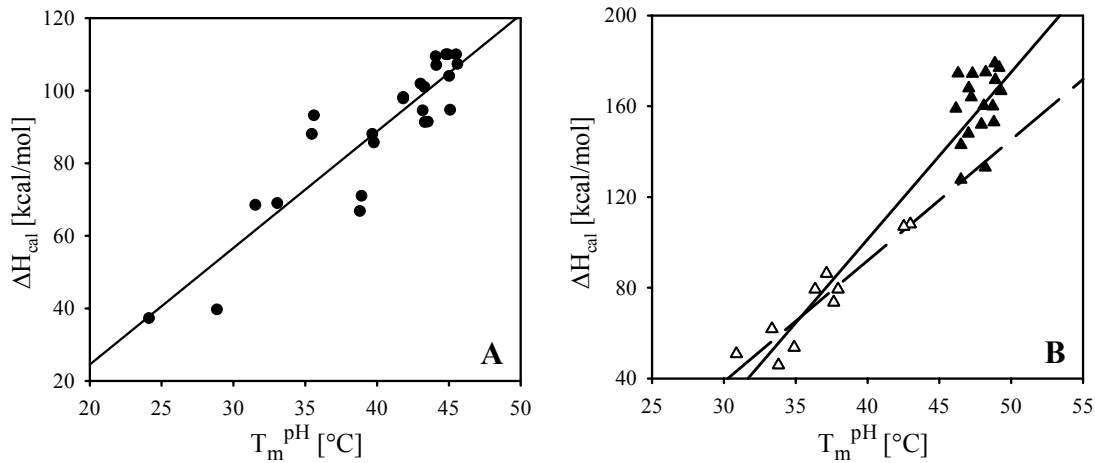


Abb. 3.16: Graphische Auftragung von ΔH_{cal} gegen T_m^{pH} für InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁*.

A zeigt die graphische Auftragung von ΔH_{cal} gegen T_m^{pH} für InlB₂₄₁ (Daten aus Tab. 3.6 verwendet) und **B** für InlB₃₂₁* (Daten aus Tab. 3.7 verwendet). Die Bestimmung von ΔC_p erfolgte aus der Steigung der Regressionsgeraden (—). In **B** sind die Wertepaare für den pH-Bereich 3.25 bis 4.5 (Δ) und pH 5.0 bis 10.0 (\blacktriangle) dargestellt. Eine Regression erfolgte über den pH-Bereich von 3.25 bis 10.0 (—) und eine nur über den pH-Bereich von 3.25 bis 4.5 (---).

Mit den nun bekannten $\Delta H(T_m)$ - und ΔC_p -Werten kann das Stabilitätsprofil für die LRR- und Internalin-Domäne berechnet werden. Diese Prozedur ist aber oft inakkurat, da die experimentellen Daten nur einen schmalen Temperatur-Bereich abdecken (meist eine geringe Verteilung der Werte um T_m). Benötigt werden ΔG_U -Werte bei kleineren Temperaturen, welche experimentell aus chemisch-induzierten Gleichgewichtsübergängen bei verschiedenen Temperaturen bestimmt wurden. Im Temperaturbereich von 5 bis 30 °C wurden bei pH 7.5 Harnstoff-induzierte Gleichgewichtsübergänge gemessen. In Tabelle 3.8 und 3.9 sind die nach Anwendung des Zweizustandsmodells bestimmten Parameter ΔG_U , die Kooperativität m und der Übergangsmittelpunkt C_m aufgelistet.

Tab. 3.8: Thermodynamische Größen der Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergänge des InlB₂₄₁ bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur [°C]	ΔG_U [kcal mol ⁻¹]	m [kcal mol ⁻¹ M ⁻¹]	C_m [M]
8	5.2 ± 0.1	3.9 ± 0.1	1.3
10	5.4 ± 0.2	3.9 ± 0.2	1.4
15	5.7 ± 0.3	3.6 ± 0.2	1.6
20	5.5 ± 0.2	3.4 ± 0.1	1.6
25	4.6 ± 0.2	3.1 ± 0.1	1.5
27	4.1 ± 0.2	2.9 ± 0.1	1.4

Tab. 3.9: Thermodynamische Größen der Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergänge des InlB₃₂₁* bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur [°C]	ΔG_U [kcal mol ⁻¹]	m [kcal mol ⁻¹ M ⁻¹]	C_m [M]
5	8.0 ± 0.4	4.2 ± 0.2	1.9
10	9.3 ± 0.4	4.5 ± 0.3	2.1
15	9.5 ± 0.2	4.4 ± 0.1	2.2
20	8.6 ± 0.1	4.0 ± 0.1	2.2
25	8.0 ± 0.2	3.8 ± 0.1	2.1
30	6.3 ± 0.4	3.4 ± 0.2	1.9

Alle beschriebenen Ergebnisse, sowohl in Tabelle 3.8 als auch in 3.9, resultieren aus Messungen in 10 mM MOPS/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 und einer Proteinkonzentration von 5 µg ml⁻¹. Die Fehlerangaben resultieren aus Mehrfachmessungen.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse lassen sich ΔC_p , $\Delta H(T_m)$ und T_m unter Anwendung der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gl. 2.19) berechnen. Da analog zu den thermischen Entfaltungen abermals nur ein kleiner Temperaturbereich abgedeckt wurde, war es sinnvoll, die ΔG_U -Werte der chemischen mit denen der thermischen Entfaltungen zu kombinieren. Eine nicht-lineare Regression dieses Datensatzes mit der Temperatur T als unabhängiger und ΔG_U als abhängiger Variable, ließ eine gute Bestimmung von ΔC_p , $\Delta H(T_m)$ und T_m zu. Die Stabilitätsprofile der LRR- und Internalin-Domäne sind in Abb. 3.17 dargestellt.

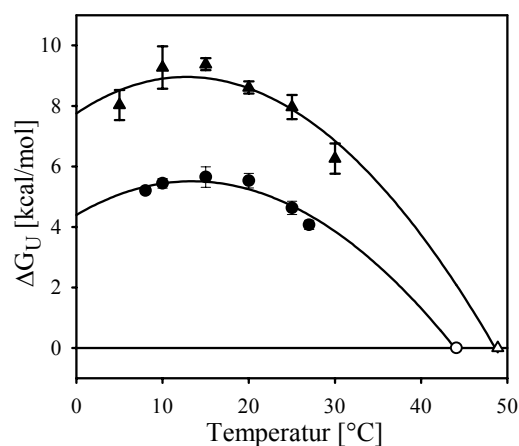


Abb. 3.17: Stabilitätsprofil des InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁* bei pH 7.5

Stabilitätsprofil des InlB₂₄₁ (●) und InlB₃₂₁* (▲). Die Werte für die freie Enthalpie der Entfaltung resultieren aus den Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergängen bei verschiedenen Temperaturen (●,▲) bzw. aus den DSC-Messungen (○,△). Die durchgezogenen Linien (—) repräsentieren die nicht-lineare Regression der Daten nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung. Alle Messungen erfolgten in 10 mM MOPS/NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5.

Sowohl InlB₂₄₁ als auch InlB₃₂₁* weisen bei pH 7.5 eine maximale Stabilität um 15 °C auf. Dies entspricht in ungefähr der vorhergesagten Temperatur von ~10 °C für die maximale Stabilität von kleineren Proteinen (Rees & Robertson, 2001). In Tabelle 3.10 sind die Resultate die aus den DSC-Messungen bei verschiedenen pH-Werten und den Berechnungen mit Hilfe des Kirchhoff-Gesetzes bzw. mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung für pH 7.5 erhalten wurden, zusammengefasst.

Tab. 3.10: Zusammenfassung der thermodynamischen Größen für die LRR- und Internalin-Domäne bei pH 7.5

		Thermische Denaturierung	Gibbs-Helmholtz-Gleichung	Theorie
InIB₂₄₁	T_m [°C]	44.1 ± 0.2	43.9	--
	$\Delta H(T_m)$ [kcal mol ⁻¹]	109 ± 3	113 ± 11	--
	ΔC_p [kcal mol ⁻¹ K ⁻¹]	3.21 ± 0.57	3.51 ± 0.35	3.31
	ΔC_p [cal mol ⁻¹ K ⁻¹] pro Rest	15.2 ± 2.7	16.6 ± 1.7	15.7
	$\Delta G_u(25^\circ\text{C})$ [kcal mol ⁻¹]	4.6 ± 0.2	4.69	--
InIB₃₂₁*	T_m [°C]	48.9 ± 0.2	48.6	--
	$\Delta H(T_m)$ [kcal mol ⁻¹]	172 ± 8	158 ± 16	--
	ΔC_p [kcal mol ⁻¹ K ⁻¹]	7.36 ± 0.66	4.16 ± 0.42	4.72
	ΔC_p [cal mol ⁻¹ K ⁻¹] pro Rest	25.3 ± 2.3	14.3 ± 1.4	16.2
	$\Delta G_u(25^\circ\text{C})$ [kcal mol ⁻¹]	8.0 ± 0.2	7.9	--

Die theoretisch berechneten ΔC_p -Werte resultieren aus der Berechnung nach Gl. 2.16 (Myers *et al.*, 1995). Die Fehlerangaben der thermischen Denaturierung resultieren aus Mehrfachmessungen. Für die Ergebnisse aus der Gibbs-Helmholtz-Gleichung wurden die in der Literatur angegebenen erwarteten maximalen Fehler von 10 % für ΔC_p und $\Delta H(T_m)$ verwendet (Robertson & Murphy, 1997).

Die Resultate, die über die verschiedenen Vorgehensweisen bestimmt wurden, lieferten im Rahmen des Fehlers identische Ergebnisse. Es zeigte sich, dass trotz der erschwerten Auswertung aufgrund des Aggregationsverhaltens der Proteine die ΔH_{cal} -Werte aus den DSC-Experimenten bei den verschiedenen pH-Werten relativ gut bestimmt werden konnten. Auffällig ist jedoch die deutliche Abweichung des ΔC_p -Wertes beim InIB₃₂₁*. Der Wert, der mittels des Kirchhoff-Gesetzes berechnet wurde, ist fast doppelt so groß wie der, der aus dem Stabilitätsprofil bestimmt wurde. Bezogen auf die Anzahl der Aminosäuren würde man theoretisch ein ΔC_p von 13.8 ± 0.5 cal mol⁻¹ K⁻¹ pro Aminosäurerest erwarten (Robertson & Murphy, 1997). Dies lässt sich für InIB₂₄₁ bestätigen (Tabelle 3.10). Beim InIB₃₂₁* zeigt sich auch hier die hohe Überbewertung des ΔC_p (Tabelle 3.10). Um eine eventuelle Vorstellung über die wirkliche Größe des ΔC_p zu bekommen, wurde eine semi-empirische Berechnung vorgenommen. Basierend auf den Beobachtungen, dass die Änderung in der Wärmekapazität während der Entfaltung linear von der Änderung in der Lösungsmittelzugänglichkeit der Proteinoberfläche während der Entfaltung (ΔASA) abhängt, konnte das ΔC_p berechnet werden (Tabelle 3.10) (Livingstone *et al.*, 1991; Spolar *et al.*, 1992; Myers *et al.*, 1995). Der empirisch berechnete Wert von 3.31 kcal mol⁻¹ K⁻¹ für InIB₂₄₁ bestätigt die experimentellen Werte (Tabelle 3.10). Das ΔC_p von 4.72 kcal mol⁻¹ K⁻¹ für InIB₃₂₁* hingegen stimmt nur mit dem aus dem Stabilitätsprofil erhaltenen Wert überein. Eine Erklärung für das abweichende ΔC_p bestimmt nach dem Kirchhoff-Gesetz kann durch die Datenpunkte in Abb. 3.16 B gegeben werden. Die Steigung der Regressionsgeraden wird zum einen durch die Datenpunkte aus den DSC-Läufen bei sauren pH-Werten (Δ in Abb. 3.16 B) und zum anderen aus den Daten der basischen pH-Werte (\blacktriangle in Abb. 3.16 B) definiert. Der Datensatz bei den höheren Temperaturen, also den basischen pH-Werten, weist eine

starke Streuung auf und hat folglich einen beträchtlichen Einfluss auf die Steigung der Regressionsgeraden. Ursache für die Streuung dieser Daten ist die geringe Änderung des T_m^{pH} bei diesen pH-Werten (7 bis 10). Eine weitere Möglichkeit für das Abweichen des ΔC_p von der Kirchhoff-Gleichung wäre, dass bei der Auftragung von ΔH_{cal} gegen T_m^{pH} bei allen pH-Werten ein gemeinsamer Ausgangs- und Endzustand impliziert wird, d. h., sowohl der native als auch der denaturierte Zustand sind gleich. Da bisher noch keine zusätzlichen spektroskopischen Schmelzkurven bei verschiedenen pH-Werten gemessen wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise zwei verschiedene denaturierte Zustände existieren. Es wäre also denkbar, dass bei basischen pH-Werten Proteinbereiche in die Entfaltung mit einbezogen werden, die noch intakt sind. Dies würde bedeuten, dass in der Auftragung von ΔH_{cal} gegen T_m^{pH} nur die Daten ausgewertet werden dürfen, bei denen einheitlich gleiche native und denaturierte Zustände vorliegen. Einen Hinweis hierfür geben die thermischen Denaturierungen im sauren Bereich, bei denen die Entfaltung des InlB₃₂₁* eine erhöhte Reversibilität aufweist. Wird eine Bestimmung des ΔC_p über die Kirchhoff-Gleichung nur für die ΔH_{cal} -Werte durchgeführt, die aus dem pH-Bereich von 3.25 bis 4.5 resultierten, so wird ein ΔC_p von 5.3 kcal mol⁻¹ K⁻¹ erhalten (gestrichelte Linie in Abb. 3.16 B).

Bei der Denaturierung eines Proteins darf zudem die Ionisationsenthalpie nicht vernachlässigt werden. Bei der Kalorimetrie wird jedoch stets davon ausgegangen, dass die Ionisationsenthalpie durch den verwendeten Puffer kompensiert wird (Privalov & Khechinashvili, 1974). Dies gilt besonders im Sauren, wenn Aminosäuren (Glycin) oder Acetat als Puffermedien benutzt werden. Die Ionisierungsenthalpien von den Puffern und Gruppen, die hier titriert werden können, stimmen überein und kompensieren sich somit. Über die pH-Abhängigkeit von ΔH_{cal} kann die Anzahl der Gruppen die während der Entfaltung ionisiert werden, nach:

$$\Delta \nu = - \frac{\Delta H_{\text{cal}}}{2.3 \cdot RT_m^2} \cdot \frac{dT_m}{dpH} \quad (\text{Gl.3.3})$$

berechnet werden (Privalov *et al.*, 1986). Hierbei steht $\Delta \nu$ für die Anzahl der bei der Auffaltung des Proteins ionisierten Gruppen, also der Anzahl der übertragenen Protonen. Für eine Deprotonierung im basischen Bereich können die Imidazolgruppe von Histidin ($pK \approx 6$ bis 7) oder die endständige α -Aminogruppe ($pK \approx 7.5$) mögliche Kandidaten sein (Tanford, 1962). Im alkalischen Bereich ist der Ausdruck dT_m/dpH für das InlB₃₂₁* ungefähr Null, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Ionisierungsenthalpie in diesem Bereich keine wesentliche Rolle spielt. Im Bereich kleiner pH 5 könnten Aspartat- oder Glutamatseitenketten sowie Carboxylgruppen bei der Entfaltung ionisiert werden.

Die Ursache für diese, im Vergleich zum InlB₂₄₁, unterschiedliche Thermostabilität im basischen Bereich kann nur durch die zusätzliche Ig-ähnliche Domäne erklärt werden. Ob für die unterschiedliche Thermostabilität vom InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁* im basischen Bereich möglicherweise

„nicht-normale“ ionisierende Aminosäuregruppen im InlB₃₂₁* verantwortlich sind, bleibt noch zu klären.

3.3.1.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Faltung

Während der Bestimmung der Enthalpie ΔH_{cal} in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigte sich bei den zwei InlB-Konstrukten ein unterschiedliches Verhalten (siehe 3.3.1.3) bezüglich der Reversibilität. Änderungen im pH-Wert können starke Auswirkungen auf die strukturellen Eigenschaften oder die Aktivität eines Proteins haben. Gerade bei Fragestellungen, die die Faltung und Stabilität eines Proteins ansprechen, ist es sehr wichtig zu wissen, unter welchen pH-Bedingungen das betreffende Protein optimal stabilisiert und noch zur Faltung befähigt ist.

Inwieweit der pH-Wert die Faltung der LRR- und Internalin-Domäne beeinflusst, wurde über einen Gleichgewichtsübergang durch Messung der Änderungen in der Fluoreszenz in Puffern verschiedener pH-Werte (von 2 bis 12), aber gleicher Ionenstärke untersucht. Es wurden sowohl die pH-induzierte De- als auch Renaturierung gemessen. Die pH-abhängige Renaturierung wurde dabei zum einen aus einem GdmCl-denaturierten Zustand bei pH 7.5 und zum anderen aus einem säure-denaturierten Zustand (in 50 mM HCl) verfolgt. Als Maß für den Faltungszustand wurde die Intensität der Fluoreszenzemission bei 328 nm (für InlB₃₂₁*) bzw. bei 343 nm (für InlB₂₄₁) verwendet. Die erhaltenen pH-Profile sind in Abb. 3.18 A und B abgebildet. Unter den verwendeten Pufferbedingungen liegt bei pH 7 das Emissionsmaximum für InlB₂₄₁ bei 348 nm und für InlB₃₂₁* bei 344 nm. InlB₂₄₁ zeigte im Bereich von pH 5 bis 10 eine nativ-ähnliche maximale Fluoreszenzemission, während im sauren Bereich die Fluoreszenzintensität um ungefähr 43 % reduziert war. Unterhalb von pH 4 kam es zu einer Verschiebung des Maximums der Fluoreszenzemission nach 338 nm (bei pH 2). Diese Verschiebung deutet daraufhin, dass sich das sonst lösungsmittel-exponierte Tryptophan 124 unter diesen Bedingungen in einer hydrophoberen Umgebung befinden muss. Diese Charakteristika werden noch ausführlicher in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Im pH-Bereich oberhalb von 10 war ebenfalls eine Abnahme der Fluoreszenz zu verzeichnen, die hier jedoch auf die Denaturierung des Proteins zurückzuführen war. Das Maximum der Fluoreszenzemission lag bei 355 nm, welches charakteristisch für entfaltete Proteine ist.

InlB₃₂₁* zeigte im pH-Bereich von 5 bis 10 eine ähnliche Fluoreszenzintensität wie das native Protein bei pH 7. Auch hier nahm die Intensität der Fluoreszenz unterhalb von pH 4 ab und es kam zu einer Blauverschiebung des Emissionsmaximums von 344 nach 340 nm. Im Vergleich zum InlB₂₄₁ war die bei der Internalin-Domäne beobachtete Verschiebung zu kleineren Wellenlängen hin nicht so ausgeprägt. Im basischen Bereich kam es erst oberhalb von pH 10 zu einem Abfall in der Fluoreszenzintensität bei 328 nm, was den Beobachtungen aus den DSC-Experimenten im basischen ähnelt.

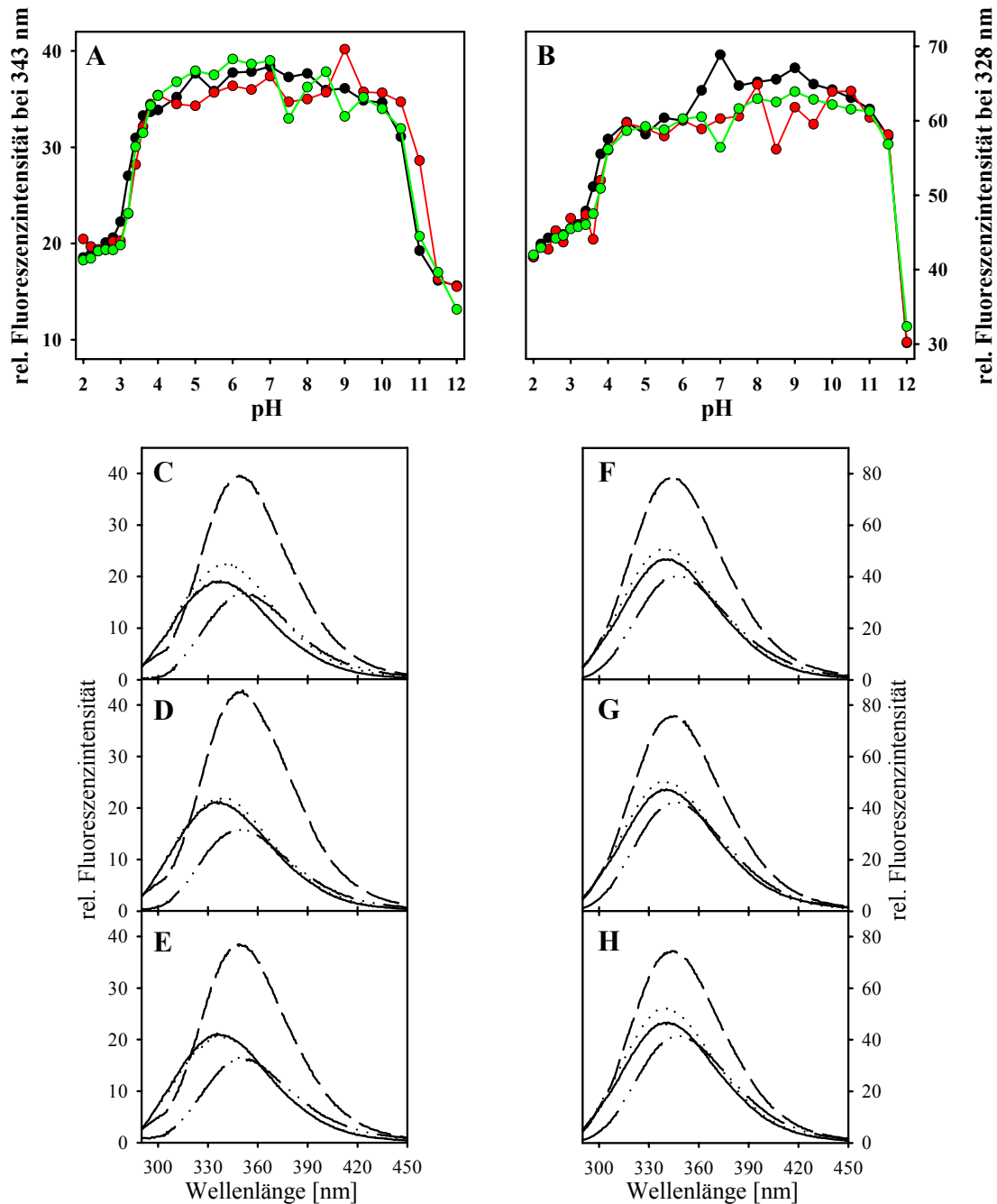


Abb. 3.18: Fluoreszenzemissionsspektren von InlB₂₄₁ und InlB₃₂₁* bei verschiedenen pH-Werten

A und **B** zeigen die Abhängigkeit der Fluoreszenzemission (Anregung: 280 nm) vom InlB₂₄₁ (**A**, bei 343 nm) und InlB₃₂₁* (**B**, bei 328 nm) vom pH-Wert. **C**, **D**, **E** (InlB₂₄₁) und **F**, **G**, **H** (InlB₃₂₁*) zeigen Fluoreszenzemissionsspektren bei folgenden pH-Werten: — pH 2.0; ... pH 3.0; --- pH 7.0 (InlB₂₄₁) bzw. 7.5 (InlB₃₂₁*); -.- pH 12.0. Gezeigt ist die Denaturierung (-●-, **C**, **F**), die Renaturierung von in 3 M GdmCl denaturiertem Protein (-●-, **D**, **G**) und die Renaturierung von in 50 mM HCl denaturiertem Protein (-●-, **E**, **H**) in den jeweiligen pH-Puffern. Die Messungen erfolgten bei 10 °C (InlB₂₄₁) bzw. 20 °C (InlB₃₂₁*) und die Inkubation der Übergänge erfolgte für 48 h. Die Proteinkonzentration betrug 5 µg ml⁻¹ beim InlB₂₄₁ und 10 µg ml⁻¹ beim InlB₃₂₁*. Die Pufferbedingungen waren: 10 mM KH₂PO₄, 10 mM Citrat, 10 mM Borat, 150 mM KCl, pH 2 – 11.

Die Renaturierung aus dem säure- bzw. GdmCl-denaturierten Zustand war bei beiden Proteinen über den ganzen pH-Bereich reversibel (Abb. 3.18 C bis H). Die Lage der Fluoreszenzemissionsmaxima lag jeweils bei der, die auch für das native Protein gefunden wurde. Ein Auftreten von möglicherweise aggregationsanfälligen intermediären Zuständen während der Renaturierung aus dem Säure-denaturierten Zustand war zumindest aus den hier vorliegenden spektroskopischen Daten nicht zu erkennen. Es kann aber nicht völlig ausgeschlossen werden, dass solche Aggregate nicht doch zu einem gewissen Anteil präsent sind. Dies müsste mit anderen Methoden, wie z. B. Lichtstreuung überprüft werden. Die Änderungen, die bei beiden Proteinen in der Fluoreszenzintensität am Maximum der Emission zwischen pH 5 und 10 zu beobachten war, ist sehr wahrscheinlich auf die Titration von Aminosäureresten und eine damit verbundene Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Proteins verbunden (Daten nicht gezeigt).

Vergleicht man die pH-Stabilitätsprofile der LLR- und der Internalin-Superdomäne miteinander, so lässt sich sagen, dass beide Proteine über einen vergleichbaren pH-Bereich eine nativ-ähnliche Fluoreszenzintensität aufweisen.

3.3.1.5 Bindung von Calcium an die N-terminale *Cap*-Domäne des InlB

In der ersten Veröffentlichung der Struktur eines verkürzten Konstruktes des InlB (Aminosäuren 36 bis 248, InlB₂₄₈) wurde von einer neuartigen und ungewöhnlichen Art und Weise der Bindung zweier Calcium-Ionen an die N-terminale *Cap*-Domäne des InlB berichtet (Marino *et al.*, 1999). Diese α -helikale Domäne ähnelt strukturell einer EF-Hand-Domäne, welche für die spezifische Bindung von Calcium-Ionen optimiert ist (Lewit-Bentley & Réty, 2000). Beim näheren Betrachten wurde jedoch deutlich, dass das erste Helix-Loop-Helix EF-Hand-Motiv drastisch reduziert ist und die *Cap*-Region daher eher eine gestutzte EF-Hand-ähnliche Domäne darstellt (Schubert *et al.*, 2001). Die Beobachtung, dass die Bindung des InlB an gC1q-R durch die Zugabe von 1 mM EDTA gestört werden kann, legte die Vermutung nahe, dass die stark exponierten Calcium-Ionen eine Brücke zwischen dem InlB und diesem Rezeptor darstellen könnten (Braun *et al.*, 2000). In Gegenwart von 200 mM Calciumchlorid konnten für die zwei in der Elektronendichte beobachteten Calcium-Ionen apparente Dissoziationskonstanten von ~ 2 mM für die erste, und ~ 50 mM für die zweite Bindungsstelle bestimmt werden (Marino *et al.*, 1999). Da die physiologische extrazelluläre Calcium-Konzentration jedoch geringer als 1.5 mM ist, und eine andere Arbeitsgruppe bei der Lösung der Struktur des InlB₃₂₁ in Gegenwart von 25 mM CaCl₂ keine Elektronendichte für Calcium-Ionen in der N-terminalen Domäne detektieren konnte, stellte sich die Frage nach der Richtigkeit der ursprünglich gemachten Beobachtungen (Schubert *et al.*, 2001).

Eine spezifische und feste Bindung der Calcium-Ionen an die N-terminale *Cap*-Region im InlB sollte in einer Erhöhung der Proteinstabilität resultieren. Zur Untersuchung dieses Phänomens, wurden sowohl chemisch als auch thermisch induzierte Entfaltungsübergänge der LRR- und der Internalin-Domäne in der Gegenwart bzw. Abwesenheit von CaCl₂ gemessen (Abb. 3.19 A und B zeigt dies

exemplarisch anhand des InIB₂₄₈). Verwendet wurden bei diesen Messungen in Analogie zu den Bindungsstudien von Marino *et al.* (1999) die Cystein-haltigen Proteine InIB₃₂₁ und InIB₂₄₈.

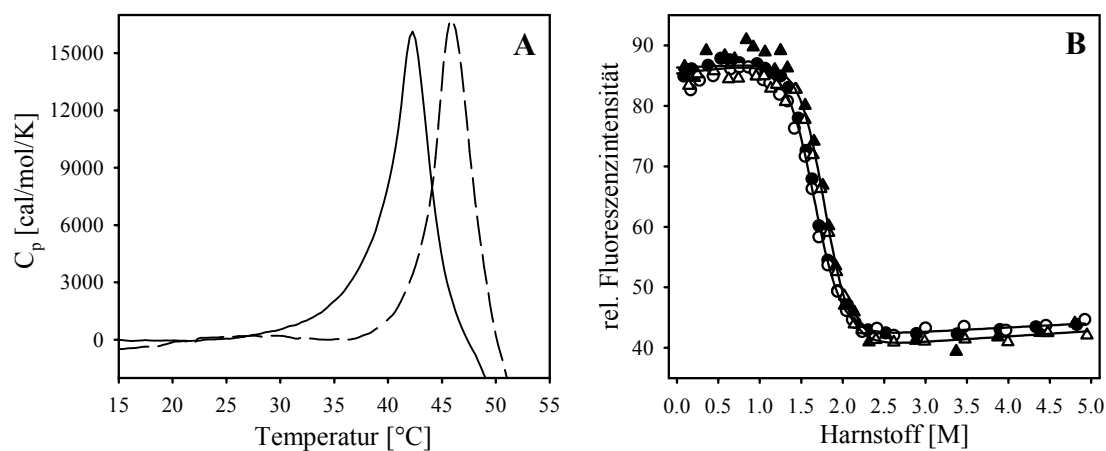


Abb. 3.19: Thermisch- und chemisch-induzierte Entfaltung des InIB₂₄₈ in Gegenwart bzw. Abwesenheit von CaCl₂

A zeigt die thermisch-induzierte Entfaltung des InIB₂₄₈ in Gegenwart (---) bzw. Abwesenheit (—) von CaCl₂ gemessen mit der DSC. **B** zeigt die GdmCl-induzierten Denaturierung (●,▲) und Renaturierung (○,△) des InIB₂₄₈ in Gegenwart (▲,△) bzw. Abwesenheit (●,○) von CaCl₂ bei 20 °C. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Regression der jeweiligen Datenpaare nach Anwendung eines Zweizustandsmodell. Die Pufferbedingungen waren 10 mM MOPS/NaOH, 1 mM EDTA, 2 mM β -Mercaptoethanol, \pm 6 mM CaCl₂, pH 7.5 für die DSC-Messungen und 40 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, \pm 11 mM CaCl₂, pH 7 für die Gleichgewichtsmessungen. Die Proteinkonzentration lag zwischen 0.24 und 0.64 mg ml⁻¹ für die DSC-Messungen und bei 10 μ g ml⁻¹ für die Gleichgewichtsmessungen.

Bei den durch GdmCl- und Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergängen von InIB₃₂₁ und InIB₂₄₈ wurde das Fluoreszenzsignal in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 10 mM freiem Ca²⁺ gemessen. Wurde GdmCl als Denaturierungsmittel verwendet, so konnten keine offensichtlich signifikanten Effekte der Calcium-Ionen aus der Form des Überganges bzw. den Ergebnissen des Zweizustandsmodells beobachtet werden (Tabelle 3.11). Hingegen konnte bei der Verwendung von Harnstoff als Denaturierungsmittel eine leichte Erhöhung des Übergangsmittelpunktes um 0.1 M verzeichnet werden (Tabelle 3.11). Im Rahmen des Fehlers der einzelnen thermodynamischen Parameter ist dieser registrierte Unterschied nicht signifikant. Untersuchungen der thermischen Stabilität beider Proteindomänen in Gegenwart von 5 mM freiem Ca²⁺, zeigte eine Erhöhung des T_m um 2 bis 3 °C (Tabelle 3.11). Dieser leicht stabilisierende Effekt wurde aber auch bei thermischen Entfaltungen registriert, die in der Gegenwart von anderen Salzen, wie z. B. NaCl oder KCl, durchgeführt wurden (die Untersuchungen hierzu erfolgten mit InIB₂₄₁) (Tabelle 3.12). So zeigte sich beim InIB₂₄₁ durch die Zugabe von 150 mM KCl eine Erhöhung des T_m um ungefähr 3 °C und durch die Zugabe von 150 mM NaCl eine Erhöhung des T_m um 4 °C. Die Erhöhung der Salzkonzentration dieser Proteinlösung um weitere 6 mM CaCl₂ resultierte in einer weiteren minimalen Stabilitätszunahme von 0.7 °C. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit einer schwachen Bindungsaffinität des InIB für Calcium, sprechen aber gegen eine hochspezifische Calciumbindung

durch die N-terminale *Cap*-Domäne. Der größte Anteil an der Stabilitätszunahme ist höchstwahrscheinlich auf einen stabilisierenden Effekt durch Salz zurückzuführen.

Tab. 3.11: Thermodynamische Größen der Gleichgewichtsübergänge des InlB₂₄₈ und InlB₃₂₁ in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Ca²⁺

	InlB ₂₄₈	InlB ₂₄₈ + Ca ²⁺	InlB ₃₂₁	InlB ₃₂₁ + Ca ²⁺
$\Delta G^0_{U, \text{Harnstoff}}$ [kcal mol ⁻¹]	5.9 ± 0.3	7.0 ± 0.5	10.9 ± 0.6	10.6 ± 0.5
$m_{\text{Harnstoff}}$ [kcal mol ⁻¹ M ⁻¹]	3.6 ± 0.2	4.0 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.0 ± 0.2
$C_{m, \text{Harnstoff}}$ [M]	1.6	1.7	2.5	2.5
$\Delta G^0_{U, \text{GdmCl}}$ [kcal mol ⁻¹]	5.4 ± 0.4	5.8 ± 0.5	9.9 ± 0.8	10.2 ± 0.6
m_{GdmCl} [kcal mol ⁻¹ M ⁻¹]	7.9 ± 0.6	8.3 ± 0.6	9.6 ± 0.7	9.5 ± 0.6
$C_{m, \text{GdmCl}}$ [M]	0.7	0.7	1.0	1.0
T_m [°C]	42.1 ± 0.2	45.5 ± 0.5	48.9 ± 0.2	52.3 ± 0.1

Tab. 3.12: Abhängigkeit der thermischen Stabilität des InlB₂₄₁ von der Salzkonzentration

	InlB ₂₄₁	InlB ₂₄₁ + Ca ²⁺
T_m [°C]	40.9 ± 0.1	45.0 ± 0.2
T_m [°C] + NaCl	45.0 ± 0.2	45.7 ± 0.2
T_m [°C] + KCl	44.0 ± 0.2	n.b.

Die Konzentration der verwendeten Salze betrug 150 mM NaCl, 150 mM KCl und 6 mM CaCl₂.

In einer aktuellen Studie wurde die Calciumbindung an die N-terminale *Cap*-Domäne des InlB anhand von Punktmutanten der Bindungsstellen untersucht (Marino *et al.*, 2004). Es konnte festgestellt werden, dass die Bindung von Calcium nicht für die intrazelluläre Invasion notwendig ist und keinen nennenswerten Effekt auf die Stabilität und Konformation des Proteins ausübt. Für die zwei Bindungsstellen ergaben sich unter physiologischen Bedingungen Dissoziationskonstanten von 2.6 ± 2.1 und 39 ± 18 μM. Diese Affinitäten sind im Vergleich zu den ursprünglich bestimmten Dissoziationskonstanten um drei Größenordnungen höher, was durch die zuerst durchgeführten Messungen unter nicht-physiologischen Kristallisationsbedingungen erklärt wurde (Marino *et al.*, 1999; 2004). Ein Austausch der an der Bindung beteiligten Aminosäurereste Asparaginsäure 51 (Asp51) bzw. 59 (Asp59) gegen Alanin resultierte in einem Verlust der Calciumbindung an der ersten bzw. zweiten Bindungsstelle, und eine Doppelmutante zeigte keine Bindung von Calciumionen. Überraschenderweise zeigte der Austausch des Asp59, neben dem Verlust der Calciumbindung an dieser Position, auch den vollständigen Verlust der Bindung von Calcium an der ersten Bindungsstelle. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass zwischen den beiden Bindungsstellen eine Interaktion bestehen muss. Die zwei Bindungsstellen für die Calciumionen an der N-terminalen *Cap*-Domäne des InlB werden, da sie keinen direkten Einfluss auf die Aktivierung des Met-Rezeptors oder die intrazelluläre Invasion zeigen, als eher zufällig diskutiert (Marino *et al.*, 2004).

3.3.2 Faltungsmechanismus der LRR- und Internalin-Domäne

Bei der Charakterisierung eines Proteins ist neben der thermodynamischen Stabilität die Untersuchung der Faltungskinetik von ebenso zentraler Bedeutung, weil aus Gleichgewichtsexperimenten die nach einem Zweizustandsmodell verlaufen, keine Informationen über den Faltungsmechanismus gewonnen werden können. Was den Faltungsmechanismus bei der Bildung von Proteindomänen bestehend aus repetitiven Sequenzwiederholungen betrifft, wurden bisher nur Proteine mit Ankyrin- bzw. mit β -Helix-Motiven eingehender untersucht (siehe 1.8). Die nachfolgenden Untersuchungen sollten dazu beitragen, erste Erkenntnisse bezüglich der Faltungseigenschaften sowohl des LRR-Motivs (InlB₂₄₁), als auch der Internalin-Superdomäne (InlB₃₂₁* und InlB₃₂₁*W124S) zu erhalten. Hervorzuheben sind an dieser Stelle nochmals die günstige Positionierung der beiden Tryptophanreste. Es ist jeweils einer in der LRR- und einer in der Ig-ähnlichen Domäne lokalisiert. Diese zwei molekularen Sonden sollten möglicherweise Unterschiede im Faltungsverhalten der Domänen aufzeigen können.

Die Darstellung der aus den Fluoreszenz- und CD-Messungen gewonnenen logarithmierten apparenten Relaxationsraten in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration wird im folgenden nur noch als *Chevronplot* bezeichnet. Alle im weiteren beschriebenen Kinetiken wurden bei 10 °C gemessen. Die mit den Cystein-haltigen Proteinen durchgeführten kinetischen Untersuchungen lieferten identische Resultate (Daten nicht gezeigt).

3.3.2.1 Faltungs- und Entfaltungskinetiken der LRR-Domäne

Die chemisch-induzierten Entfaltungskinetiken des InlB₂₄₁ folgten im Konzentrationsbereich von 0.6 bis 1.2 M GdmCl einer monophasisch verlaufenden Reaktion. Die Kinetiken konnten daher mit einer einphasigen Exponentialfunktion angepasst und die Entfaltungsraten (k_u) bestimmt werden. Die Amplituden der einzelnen Entfaltungskinetiken entsprachen bis ungefähr 0.8 M GdmCl den erwarteten Änderungen zwischen dem Nativ- und dem Denaturierungssignal. Oberhalb von 0.8 M GdmCl, wurden die Denaturierungskinetiken so schnell, dass beim manuellen Mischen die Entfaltungsamplitude nicht vollständig erfasst werden konnte. Die Totzeit beim manuellen Mischen betrug etwa 3 s. Bei einer Denaturierungsmittelkonzentrationen von 1.1 M GdmCl konnten nur noch 85 % der Signaländerung, sowohl der Fluoreszenz als auch der Fern-UV-CD Messungen, erfasst werden (Abb. 3.20 A und B). Im Konzentrationsbereich von 1.1 bis 1.4 M GdmCl konnte die vollständige Amplitudenänderungen mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz gemessen werden (Abb. 3.20 C). Die aus den monoexponentiellen Funktionen erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten zeigten im Bereich der untersuchten Denaturierungsmittelkonzentration eine lineare Abhängigkeit (Abb. 3.20 C). Bei 1.1 M GdmCl wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $k_u = 0.063 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Die registrierten Signaländerungen aus den Fluoreszenz- bzw. CD-Messungen lieferten identische Ergebnisse bezüglich der Geschwindigkeitskonstanten, was darauf hindeutet, dass der Verlust an Tertiärstruktur in der LRR-Domäne nicht von dem Verlust an

Sekundärstruktur entkoppelt ist. Dies entspricht den Resultaten der Gleichgewichtsübergänge (3.3.1.1), wo ebenfalls beobachtet werden konnte, dass die Entfaltung der einzelnen repetitiven Sequenzeinheiten einen kooperativen Prozess darstellt. Die beobachteten Denaturierungskinetiken lieferten keine Hinweise auf die Akkumulierung von Intermediaten.

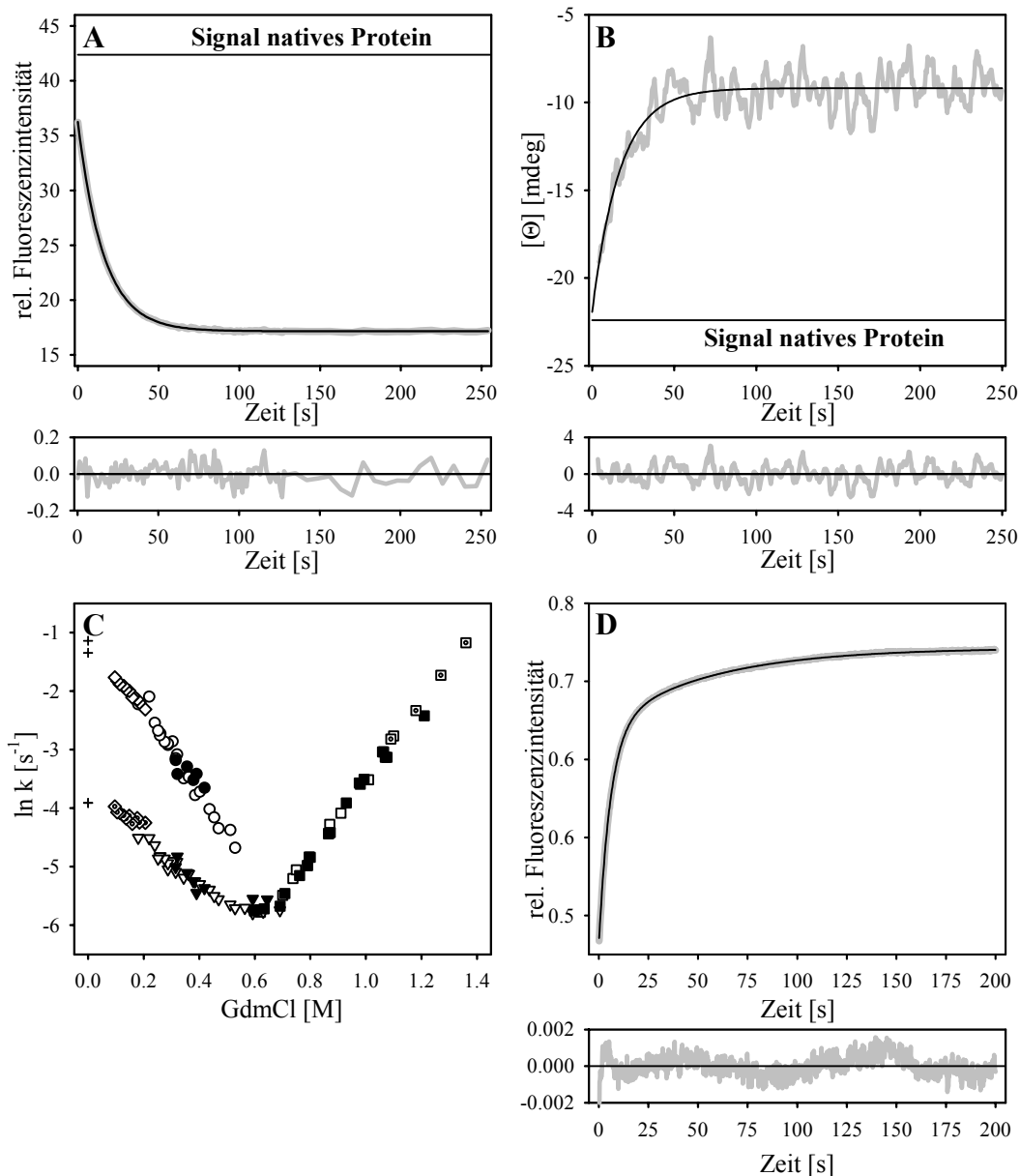


Abb. 3.20: Faltungskinetiken von InIB₂₄₁

A zeigt die Fluoreszenzänderung (Anregung: 280 nm, Emission: 343 nm) des InIB₂₄₁ der Denaturierung in 1.1 M GdmCl (—). **B** zeigt die Änderung des Fern-UV-CD-Signals bei 220 nm während der Denaturierung in 1.1 M GdmCl (—). Die Linien in **A** und **B** repräsentieren die Regression mit einer monoexponentiellen Funktion (—). Darunter: Residuen der Regression für die Denaturierungskinetik. **C** zeigt den sog. *Chevronplot*: Vergleich der aus den manuell gemessenen Fluoreszenz- (offene Symbole) und CD- (gefüllte Symbole), sowie den *stopped-flow*-Fluoreszenz Messungen (□, ◇, ◊) resultierenden apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (□, ■, ▢) und Faltung (k_1 : ○, ●, ◇; k_2 : ▽, ▼, ◆). Apparente Relaxationsraten der Faltung resultierend aus pH-Sprung-Experimenten (+) werden ausführlich unter 3.3.3.3 (siehe S. 103 bis 105) erläutert. **D** zeigt die Fluoreszenzänderung der Renaturierung in der *stopped-flow* bei 0.1 M GdmCl (—). Die Linie repräsentiert die Regression mit einer biexponentiellen Funktion (—). Darunter: Residuen der Regression für die Renaturierungskinetik. Alle Messungen erfolgten bei 10 °C und einer Proteinkonzentration von 10 µg ml⁻¹ bzw. 30 µg ml⁻¹ bei den CD-Messungen. Der verwendete Puffer war 40 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.

Für die Faltungsexperimente wurde InIB₂₄₁ in 4 M GdmCl vollständig entfaltet und die Rückfaltung durch eine 1:100 Verdünnung in Renaturierungspuffer induziert. Die Rückfaltungskinetik konnte im Konzentrationsbereich von 0.5 bis 0.6 M GdmCl mit einer monophasischen Exponentialfunktion beschrieben werden. Unterhalb von 0.5 M GdmCl wurde die Faltungsreaktion komplexer und der Verlauf der Kinetik machte es notwendig, den Angleich mit einer Summe von zwei Exponentialfunktionen durchzuführen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Faltungsgeschwindigkeit der schnellen Phase (k_{f1}) als auch die der langsamen Phase (k_{f2}) linear mit steigender GdmCl-Konzentration abnahm (Abb. 3.20 C). Bei einer Konzentration von 0.18 M GdmCl wurden in der ersten Phase ~ 50 % des Fluoreszenzsignals (die Halbwertszeit beträgt 9 s) und in der zweiten Phase ~ 20 % mit einer Halbwertszeit von 90 s sichtbar. Die Gesamtamplitude der Kinetik konnte jedoch bereits ab einer Konzentration von 0.35 M GdmCl nicht mehr voll aufgelöst werden (bei 0.25 M GdmCl wurden ungefähr 75 % der Änderung in der Gesamtamplitude erfasst), weswegen von den Handmischungsexperimenten auf *stopped-flow*-Messungen übergegangen wurde. Die beobachtete Totzeitamplitude bei den manuellen Mischungen ist höchstwahrscheinlich auf keine kinetische Ursache zurückzuführen, sondern durch den Messaufbau begründet. Bei der niedrigsten erzielbaren GdmCl-Restkonzentration aus den *stopped-flow*-Messungen von 0.1 M hatten die apparenten Geschwindigkeitskonstanten eine Größe von $k_{f1} = 0.171 \text{ s}^{-1}$ und $k_{f2} = 0.019 \text{ s}^{-1}$ (Abb. 3.20 D).

Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten für die Faltung sind bei den Messungen in der Änderung der Fluoreszenzemission und des CD-Signals im fernen UV identisch (Abb. 3.20 C). Dies spricht dafür, dass die Bildung der Tertiär- und der Sekundärstruktur gleichzeitig erfolgt. Die CD-Kinetiken konnten aber nur für einen relativ kleinen Konzentrationsbereich untersucht werden. Im Bereich kleiner 0.3 M GdmCl wurden die nach manueller Mischung erfassbaren Signaländerungen und das Signal/Rausch-Verhältnis sehr klein. Die hier ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten konnten nicht mehr zuverlässig bestimmt werden und sind deswegen nicht mit aufgeführt. Ob die zwei beobachteten Faltungsphasen bei kleineren GdmCl-Konzentrationen im Fluoreszenz-Signal einen identischen Verlauf mit dem CD-Signal zeigen, muss noch untersucht werden. Die beiden Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung zeigten eine lineare Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Der biphasische Verlauf der Renaturierung deutet im Gegensatz zu dem beobachteten Zweizustandsmodell des Gleichgewichtsübergangs auf die Existenz eines kinetischen intermediären Zustandes hin. Dieses Intermediat scheint eine relativ hohe Stabilität zu besitzen, da es nicht nur bei geringen Denaturierungsmittelkonzentrationen, sondern auch nahe dem Übergangsmittelpunkt ($C_m = 0.7 \text{ M GdmCl}$) beobachtet werden kann. Mit steigenden GdmCl-Konzentrationen (bis 0.5 M) verlangsamt sich die Rückfaltung, und die Amplitude der schnellen Renaturierungsphase läuft gegen Null (Abb. 3.21). Mögliche Intermediate könnten bei diesen Konzentrationen an GdmCl so stark destabilisiert werden, dass sie nicht mehr erfassbar und detektierbar sind.

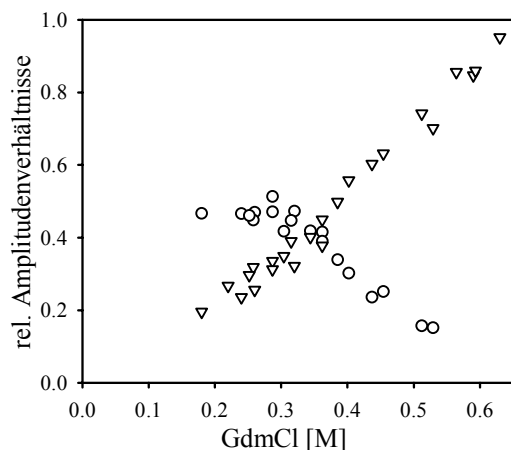


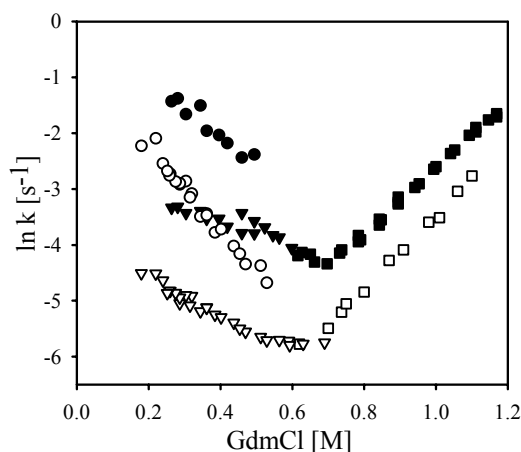
Abb. 3.21: Vergleich der relativen Amplituden der schnellen und langsamen Faltungsphase des InlB₂₄₁

Vergleich der relativen Amplitudenverhältnisse der schnellen (○) und langsamen (▽) Faltungsphase aus den manuell gemessenen Renaturierungskinetiken. Abgebildet sind die aus den Fluoreszenzmessungen erhaltenen Amplituden.

Um einen Einfluss der Temperatur auf die Entfaltung, Faltung und mögliche Intermediate untersuchen zu können, wurden Fluoreszenzkinetiken bei 20 °C gemessen (Abb. 3.22). Analog zu den gemessenen Kinetiken bei 10 °C zeigte sich ebenfalls eine lineare Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung von der Denaturierungsmittelkonzentration. Bei 1 M GdmCl war die Entfaltung um einen Faktor von 2.6 beschleunigt und die Steigungen des Entfaltungastes im *Chevronplot* waren nahezu identisch. Die Renaturierung verlief bei kleineren GdmCl-Konzentrationen biphasisch und zeigte für die beiden apparenten Geschwindigkeitskonstanten eine vergleichbare GdmCl-Abhängigkeit. Der Bereich der monophasisch verlaufenden Faltungskinetiken war bei 20 °C etwas größer, was darauf zurückzuführen ist, dass das Intermediat bereits bei kleineren GdmCl-Konzentrationen schneller entfaltet. Bei 0.36 M GdmCl war die apparente Geschwindigkeitskonstante der schnellen Renaturierungsphase um einen Faktor von 4.5 und die der langsamen zweiten Phase um einen Faktor von 4.8 beschleunigt.

Abb. 3.22: Temperaturabhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung von InlB₂₄₁

Vergleich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung (k_1 : ○, ●; k_2 : ▽, ▼) und Entfaltung (□, ■) gemessen bei 10 °C (offene Symbole) und 20 °C (gefüllte Symbole). Die Messung der Fluoreszenzkinetiken erfolgte bei 343 nm (Anregung: 280 nm) und bei einer Proteinkonzentration von 10 µg ml⁻¹. Der verwendete Puffer war 40 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.



Eine genaue Zuordnung der zwei Faltungsphasen während der Bildung der nativen LRR-Domäne kann aus den hier vorliegenden Daten nicht eindeutig erfolgen und muss noch in weitergehenden Faltungsstudien intensiver charakterisiert werden.

3.3.2.2 Faltungs- und Entfaltungskinetiken der Internalin-Domäne

Die Internalin-Domäne (InlB₃₂₁*) zeigte in der Entfaltung im Vergleich zu der LRR-Domäne ein teilweise anderes Verhalten. Über den gesamten Konzentrationsbereich an GdmCl (0.9 bis 3.9 M) folgten die Kinetiken einem monophasischen Verlauf. Im Bereich von 2.7 bis 3.9 M GdmCl konnte ebenfalls eine lineare Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration beobachtet werden (Abb. 3.23 C). Bei 3.6 M GdmCl wurde eine apparente Geschwindigkeitskonstante von $k_u = 0.115 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Mit den manuell gemessenen Denaturierungskinetiken konnten oberhalb von 2.4 M GdmCl nur noch < 90 % der gesamten Amplitudenänderung erfasst werden. Mit kleiner werdenden GdmCl-Konzentrationen wich die Abhängigkeit jedoch deutlich von ihrem linearen Verhalten ab. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten waren so stark verlangsamt, dass sie zu einem abknickenden Verlauf des Entfaltungssastes im *Chevronplot* führten. Entfaltungskinetiken gemessen im Fern-UV-CD zeigten einen identischen Verlauf der Geschwindigkeitskonstanten (exemplarisch in Abb. 3.23 A und B für das InlB₃₂₁*W124S gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Tertiär- und Sekundärstruktur der Internalin-Domäne, bestehend aus der LRR- und der Ig-ähnlichen Domäne, nicht getrennt voneinander entfalten. Des Weiteren konnte aufgrund des deckungsgleichen Verlaufes der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion im Fluoreszenz- und Fern-UV-CD-Signal der abknickende Kurvenverlauf nicht durch einen *Photobleaching*-Effekt erklärt werden.

Die Entfaltung der Tryptophan-Mutante des InlB₃₂₁* zeigte einen dem pseudo-Wildtyp vergleichbaren Verlauf (Abb. 3.23 D) und weist ebenfalls darauf hin, dass die zwei Domänen gleichzeitig entfalten.

Die Ursache des gekrümmten Entfaltungssastes scheint in der Denaturierungsreaktion selbst begründet zu sein und könnte möglicherweise auch auf teilweise gefaltete Intermediate hindeuten. Eine weitere Erklärung für diesen Verlauf kann durch eine Kopplung der Entfaltungsreaktion mit einer Prolinisomerisierung gegeben werden (Kiefhaber *et al.*, 1992; Kiefhaber & Schmid, 1992). In einigen Fällen konnten solche Beobachtungen auch bei Proteinen gemacht werden, bei denen keine populierte Intermediate oder Beiträge von Prolinisomerisierungen eine Rolle spielten. Die Krümmungen in den *Chevronplots* des humanen Splicisom-Proteins U1A und des Chymotrypsin Inhibitors 2 wurden in Bezug auf das Hammond Verhalten interpretiert (Silow & Oliveberg, 1997; Oliveberg *et al.*, 1998). Dabei wird der native Zustand mit steigenden Konzentrationen an Denaturierungsmittel destabilisiert, was in einer Bewegung des Übergangszustandes zu einer mehr nativ-ähnlichen Struktur resultiert (Oliveberg *et al.*, 1998; Pappenberger *et al.*, 2000). Bei der 27. Immunglobulin-domäne des Titin (TI I27), wurde eine Aufwärtsbewegung im Entfaltungssast des *Chevronplots* durch die Existenz von parallelen Denaturierungswegen erklärt (Fowler & Clarke, 2001; Wright *et al.*, 2003). Dabei soll der sehr kompakte Übergangszustand des einen Entfaltungsweges bei höheren Konzentrationen an Denaturierungsmittel destabilisiert werden und die Proteinmoleküle entfalten über einen weiteren Weg mit einem weniger strukturierten Übergangszustand. Bei dem α -Amylase-Inhibitor Tendamistat wurde die nicht-lineare Abhängigkeit des Entfaltungssastes von der Denaturierungsmittelkonzentration über zwei sequentielle Schritte über ein im Vergleich zum nativen

und entfalteten Zustand energetisch höherliegendes metastabiles Intermediat erklärt (Bachmann & Kiefhaber, 2001; Sánchez & Kiefhaber, 2003b,c,d).

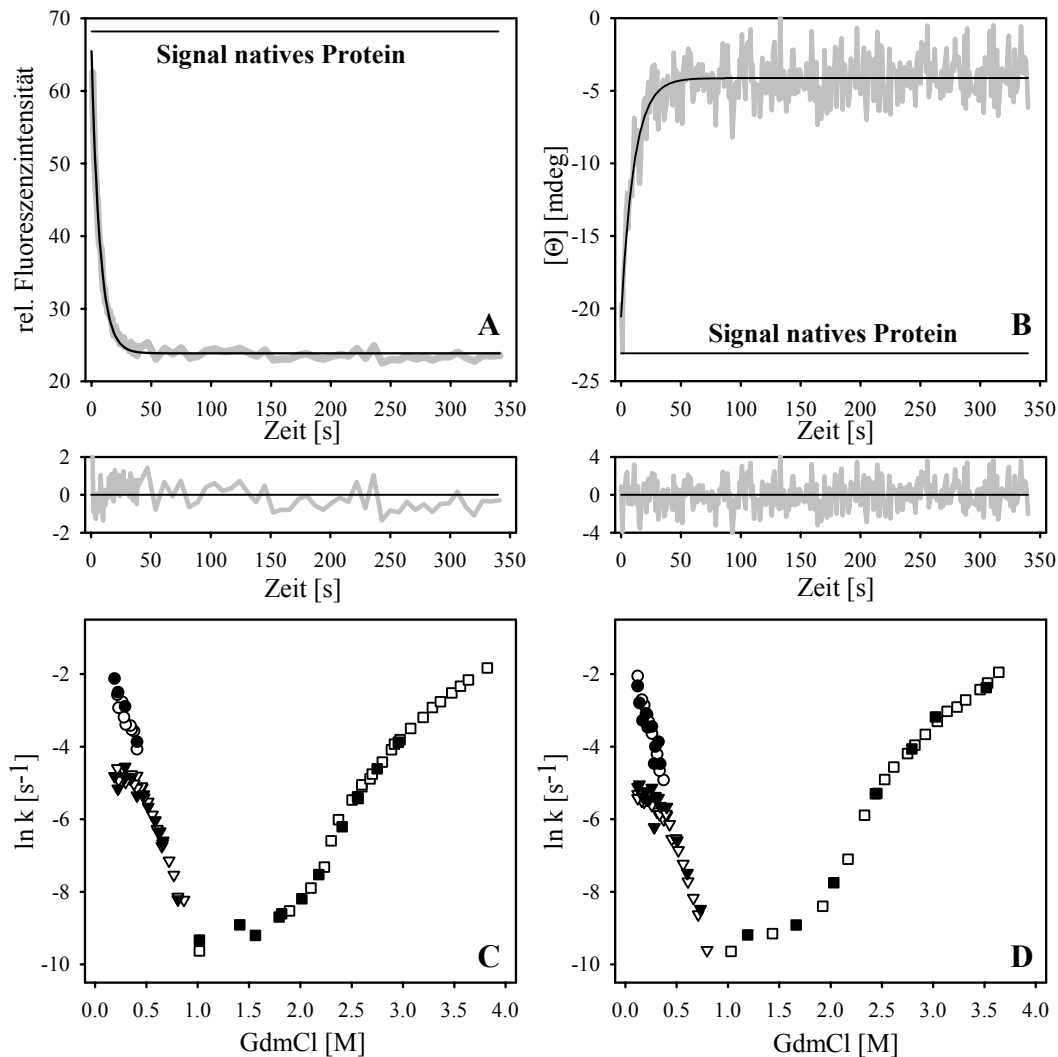


Abb. 3.23: Faltungskinetiken von InlB₃₂₁* und InlB₃₂₁*W124S

A zeigt die Fluoreszenzänderung (Anregung: 280 nm, Emission: 314 nm) des InlB₃₂₁*W124S der Denaturierung in 3.64 M GdmCl (—). Die Linie repräsentiert die Regression mit einer monoexponentiellen Funktion (—). Darunter: Residuen der Regression für die Denaturierungskinetik. **B** zeigt die Änderung des Fern-UV-CD-Signals bei 220 nm während der Denaturierung in 3.52 M GdmCl (—). Die Linie repräsentiert die Regression mit einer monoexponentiellen Funktion (—). Darunter: Residuen der Regression für die Denaturierungskinetik. **C** (InlB₃₂₁*) und **D** (InlB₃₂₁*W124S) zeigen die sog. *Chevronplots*: Vergleich der aus den manuell gemessenen Fluoreszenz- (offene Symbole) und CD- (gefüllte Symbole) Messungen resultierenden apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (□, ■) und Faltung (k_1 : ○, ●; k_2 : ▽, ▼). Die Messung der Fluoreszenzemission des InlB₃₂₁* erfolgte bei 328 nm und die des InlB₃₂₁*W124S bei 314 nm. Alle Messungen erfolgten bei 10 °C und einer Proteinkonzentration von 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ bei den CD-Messungen. Der verwendete Puffer war 20 mM MOPS/NaOH, 1 mM EDTA, pH 7.5.

Die Faltung der Internalin-Domänen-Konstrukte wurde durch eine 1:100-Verdünnung von in 6 M GdmCl vollständig entfaltetem Protein eingeleitet. Im Konzentrationsbereich von 0.4 bis 0.9 M GdmCl konnten die Faltungskinetiken vom InlB₃₂₁* und InlB₃₂₁*W124S mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden (Abb. 3.23 C und D). Unterhalb von 0.4 M GdmCl zeigten die Kinetiken ein biphasisches Verhalten. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der

zwei Faltungsphasen aus den Fluoreszenzmessungen und den Fern-UV-CD-Messungen waren identisch. Bei beiden Konstrukten wies der Verlauf der Rate der langsamen Faltungsphase bei niederen Denaturierungsmittelkonzentrationen (< 0.3 M GdmCl) einen Knick auf. Sie zeigte nur eine schwache Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase zeigten bei geringeren Konzentrationen an Denaturierungsmittel eine lineare Abhängigkeit. Extrapoliert man die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase in Richtung höherer GdmCl-Konzentrationen (bis 0.9 M), so bilden diese mit den Geschwindigkeitskonstanten der monophasisch verlaufenden Faltungskinetiken eine Gerade. Diese Abweichung der Linearität der langsamen Faltungsphase könnte dadurch erklärt werden, dass Intermediate während der Renaturierung akkumuliert werden (Ikai & Tanford, 1973; Tanford *et al.*, 1973; Creighton, 1994; Wagner & Kiefhaber, 1999). Bei höheren GdmCl-Konzentrationen (größer 0.4 M) werden die möglichen intermediären Strukturen destabilisiert, da die Faltungskinetiken einen monophasischen Verlauf aufweisen und die relativen Amplituden der schnellen Phase gegen Null laufen. Bei 0.3 M GdmCl falten InlB₃₂₁* mit $k_{f1} = 0.034$ s⁻¹ und $k_{f2} = 0.007$ s⁻¹ und InlB₃₂₁*W124S mit $k_{f1} = 0.015$ s⁻¹ und $k_{f2} = 0.003$ s⁻¹. Eine ähnlich langsame biphasische Renaturierung konnte auch bei dem humanen FKBP12 C22A beobachtet werden (Russo *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass dieses biexponentielle Verhalten aus einem komplexen Zusammenwirken von Proteinfaltung und Prolinisomerisierung resultierte.

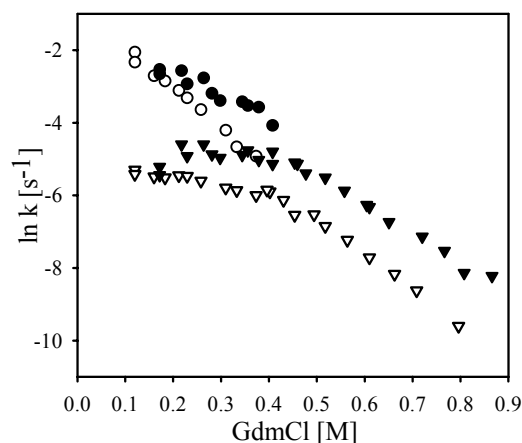


Abb. 3.24: Vergleich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung des InlB₃₂₁* und InlB₃₂₁*W124S

Vergleich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung des InlB₃₂₁* (k_1 : ●; k_2 : ▼) und des InlB₃₂₁*W124S (k_1 : ○; k_2 : ▽) resultierend aus Messungen der Fluoreszenzemission. Diese Abbildung stellt eine Vergrößerung des Renaturierungsastes beider Proteine des Chevronplots aus Abb. 3.22 C und D dar.

Vergleicht man den Renaturierungsast des InlB₃₂₁*W124S mit dem des InlB₃₂₁*, so faltet die Tryptophanmutante geringfügig langsamer (Abb. 3.24). Im Konzentrationsbereich um 0.8 M GdmCl waren die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung um einen Faktor 4 verschieden. Zu geringeren GdmCl-Konzentrationen hin verschwindet der Unterschied nahezu. Diese Differenz in den Geschwindigkeitskonstanten der Faltung hätte gegebenenfalls im Gleichgewichtsübergang beobachtet werden müssen. Man würde theoretisch erwarten, dass eine verlangsamte Faltungsreaktion in der Nähe des Übergangsmittelpunktes in einem späteren abfallenden Verlauf der nativen Basislinie resultieren sollte (Abb. 3.8). Da dies nicht der Fall war, müsste die hier gemachte Beobachtung im

Faltungsverhalten dieser zwei Proteine durch die Messung von mehrfach wiederholten Faltungskinetiken abgesichert werden.

Betrachtet man die Abhängigkeit der relativen Amplituden der beiden Phasen von der Denaturierungsmittelkonzentration, so zeigte sich bei der schnellen Phase nur eine sehr minimale Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration (Abb. 3.25 A und B). Die Amplitude der monoexponentiell verlaufenden Phase nimmt vom Bereich des Übergangsmittelpunktes (0.9 M GdmCl) aus zu kleineren Konzentrationen hin ab. Im Bereich der biexponentiell verlaufenden Kinetiken zeigte die Summe der relativen Amplitudenanteile der zwei Faltungsphasen nicht das erwartete Ergebnis von eins, was darauf hindeuten könnte, dass im Bereich der schnellen Phase eine Totzeitamplitude existiert. In vorläufigen *stopped-flow*-Messungen konnte im Subsekundenbereich keine Amplitude detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies wäre ein Hinweis auf eine weitere schnelle Faltungsreaktion, die im Submillisekundenbereich liegen müsste. Die Summe der zwei Phasen schloss sich dem linearen Verlauf der Amplitude der monoexponentiellen Faltungsphase an. Dieses Verhalten zeigte sich bei beiden Internalin-Konstrukten (Abb. 3.25 A und B).

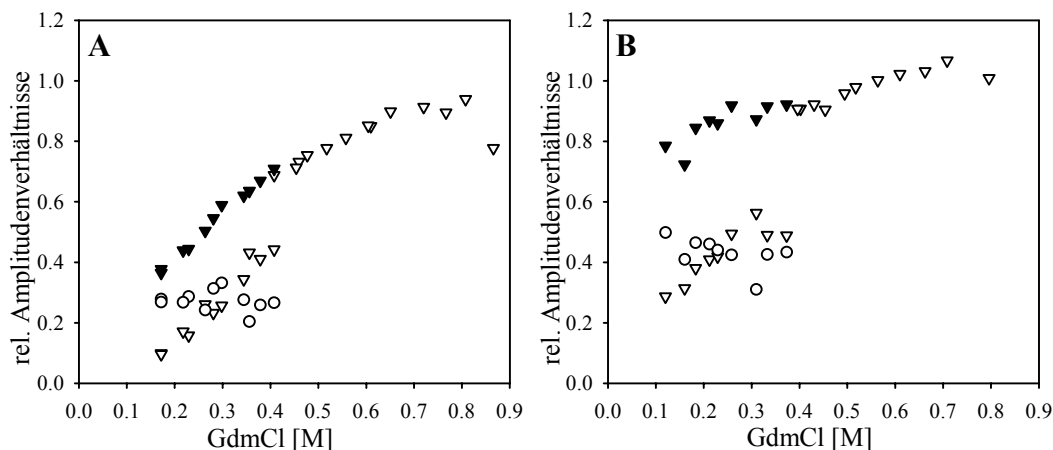


Abb. 3.25: Vergleich der relativen Amplituden der schnellen und langsamen Faltungsphase von InlB₃₂₁* und InlB₃₂₁*W124S

A zeigt den Vergleich der relativen Amplitudenverhältnisse der schnellen (○) und langsamen (∇) Faltungsphase für das InlB₃₂₁* aus den manuell gemessenen Renaturierungskinetiken. **B** zeigt den Vergleich für das InlB₃₂₁*W124S. Die Summe der relativen Amplituden der schnellen und langsamen Faltungsphase sind als (∇) dargestellt. Abgebildet sind die aus den Fluoreszenzmessungen erhaltenen Amplituden

Die Signale der Faltungskinetiken aus der Tryptophanfluoreszenz resultieren aus zwei verschiedenen Bereichen der Internalin-Domäne. Im InlB₃₂₁* erhält man Signale sowohl aus der LRR (W124)- als auch aus der Ig-ähnlichen (W285)-Domäne, während im InlB₃₂₁*W124S nur die Faltung der Ig-ähnlichen Domäne spektroskopisch verfolgt wird. Sollten diese Domänen ein unterschiedliches Faltungsverhalten aufweisen, hätte es im *Chevronplot* vielleicht beobachtet werden können. Inwieweit die hier beobachteten Signale den zwei Domänen zugeordnet werden können, muss noch in weiteren und ausführlicheren Charakterisierungen der zwei Faltungsphasen erfolgen.

Der Einfluss der Temperatur auf das Faltungsverhalten der Internalin-Domäne, wurde anhand von Messungen der Fluoreszenzkinetiken bei 20 °C überprüft (Abb. 3.26). Die Abhängigkeit der Denaturierung des InIB₃₂₁* von der Denaturierungsmittelkonzentration zeigte wieder einen Knick im Entfaltungsast, der bei 20 °C deutlicher hervorgehoben war. Es scheint so zu sein, dass zwei Entfaltungsprozesse existieren, die ein unterschiedliches Verhalten aufweisen. Während der langsame Prozess im Bereich von 1 bis 2.5 M GdmCl eine starke Temperaturabhängigkeit besitzt, zeigte der zweite Prozess oberhalb von 2.5 M GdmCl eine stärkere Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration. Im Bereich des zweiten Prozesses ist die Änderung in der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung nur minimal. Bei kleineren GdmCl-Konzentrationen konnte hingegen eine deutliche Änderung der Geschwindigkeitskonstanten beobachtet werden. Die Renaturierung verlief im Bereich von 0.5 bis 0.9 M GdmCl monophasisch und konnte bei kleineren GdmCl-Konzentrationen nur biphasisch beschrieben werden. Im Bereich der langsamen Phase bzw. der monoexponentiell verlaufenden Geschwindigkeitskonstanten, war die Kinetik um einen Faktor 4 größer. Die schnelle Phase hingegen zeigte eine stärkere Temperaturabhängigkeit und bei 0.34 M GdmCl eine um den Faktor 12 schnellere Kinetik.

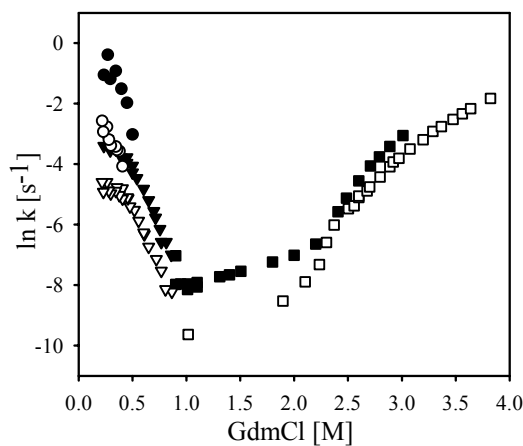


Abb. 3.26: Temperaturabhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung von InIB₃₂₁*

Vergleich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung (k_1 : ○, ●; k_2 : ▽, ▼) und Entfaltung (□, ■) gemessen bei 10 °C (offene Symbole) und 20 °C (gefüllte Symbole). Die Messungen der Fluoreszenzkinetiken erfolgte bei 328 nm (Anregung: 280 nm) und bei einer Proteinkonzentration von 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (20 °C) bzw. 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (10 °C). Der verwendete Puffer war 40 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7 (20 °C) bzw. 20 mM MOPS/NaOH, pH 7.5 (10 °C).

Werden die Endwerte der einzelnen Fluoreszenzkinetiken, sowohl der De- als auch der Renaturierung der drei untersuchten Proteine gegen die Denaturierungsmittelkonzentration aufgetragen, so erhält man einen Verlauf, der einem Übergang entspricht. In Analogie zu den beobachteten Gleichgewichtsübergängen unter 3.3.1.1, zeigten auch die kinetischen Endwerte einen kooperativen Verlauf (Daten nicht gezeigt). Dies verdeutlicht, dass die schnelle kinetische Phase im Gleichgewicht nicht beobachtet wird.

3.3.2.3 Bedeutung der *cis-trans*-Prolinisomerisierung

Eine Erklärung für die in den Faltungskinetiken der LRR- und Internalin-Domäne beobachteten zwei Phasen kann durch schneller bzw. langsamer faltende Spezies (Intermediate) gegeben werden, wobei bei letzterem eventuell die Isomerisierung von Prolinresten auf dem Faltungsweg eine Rolle spielen könnte. Im Protein liegen die Peptidbindungen normalerweise in der *trans*-Konformation vor. Dies gilt sowohl für native als auch für entfaltete Proteine. Peptidyl-Prolyl-Bindungen können hingegen entweder in der *cis*- oder in der *trans*-Konformation vorkommen. Im entfalteten Zustand stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Konformationen ein. Je nach den flankierenden Aminosäuren und den ionischen oder van-der-Waals-Wechselwirkungen, die vielleicht nur in einem isomeren Zustand ausgebildet werden können, variiert der *cis*-Anteil zwischen 10 und 40 % (Cheng & Bovey, 1977). Die Isomerisierungsreaktion zwischen der *cis*- und *trans*-Form der Peptidyl-Prolyl-Bindung benötigt die Rotation um eine partielle Doppelbindung. Prolinisomerisierungen sind deswegen als langsame Reaktionen anzusehen, welche Halbwertszeiten in der Größenordnung von 10 bis 100 s bei 25 °C aufweisen und eine hohe Aktivierungsenergie von 20 bis 22 kcal mol⁻¹ benötigen (Balbach & Schmid, 2000). Sie sind daher oft der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei langsamen Faltungsreaktionen monomerer Proteine.

In der Sequenz des InlB₂₄₁ finden sich insgesamt sieben Proline, von denen alle in der *trans*-Konformation vorliegen. InlB₃₂₁* besitzt zudem noch sieben weitere Proline in der Ig-ähnlichen Domäne. Von diesen insgesamt 14 Prolinresten liegt in der nativen Struktur nur die Bindung zwischen dem Lysinrest 280 und dem Prolinrest 281 im nativen Protein in der *cis*-Konformation vor. Um den Zusammenhang zwischen dem langsamen Faltungsverhalten und einem möglichen Prolin-limitierenden Faltungsprozess bei den beiden Proteinkonstrukten zu untersuchen, wurden zunächst Aktivierungsenergien der Rückfaltung bestimmt.

Die Bestimmung der Aktivierungsenergie der Faltung erfolgte durch Messung der Renaturierungskinetiken bei 0.3 M GdmCl über einen Temperaturbereich von 8 bis 20 °C. Bei dieser GdmCl-Konzentration verlief für beide Proteine die Renaturierungskinetik über den gesamten Temperaturbereich biphasisch. In Abbildung 3.27 A und B sind die bei der jeweiligen Temperatur bestimmten apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung gegen die reziproke Temperatur aufgetragen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden kann die Aktivierungsenergie der beiden Faltungsreaktionen über die Arrhenius-Gleichung (Gl. 3.4) berechnet werden:

$$\ln k = -\left(\frac{E_a}{RT}\right) + \ln A \quad (\text{Gl. 3.4})$$

wobei k für die apparente Geschwindigkeitskonstante, E_a für die Aktivierungsenergie, R für die allgemeine Gaskonstante, T für die Temperatur und A für den prä-exponentiellen Faktor stehen. Für InlB₂₄₁ ergab sich für die schnelle Phase ein E_a von 32 kcal mol⁻¹ und für die langsame Phase von 26 kcal mol⁻¹. Für InlB₃₂₁* konnten Aktivierungsenergien von 37 kcal mol⁻¹ für die schnelle und

27 kcal mol⁻¹ für die langsame Phase bestimmt werden. Die hier bestimmten Aktivierungsenergien liegen über den für eine Prolin-limitierte Faltungsreaktion zu erwarteten Werten und könnten darauf hindeuten, dass keine *cis-trans*-Prolinisomerisierung für die biphasisch verlaufende Faltung verantwortlich ist. Es ist aber möglich, dass Prolin-limitierte Prozesse mit konformationellen Faltungsreaktionen gekoppelt sind und in vergleichbaren Aktivierungsenergien oder Faltungsraten resultieren. Es kann daher an dieser Stelle der Einfluss einer Prolinisomerisierung nicht völlig ausgeschlossen werden.

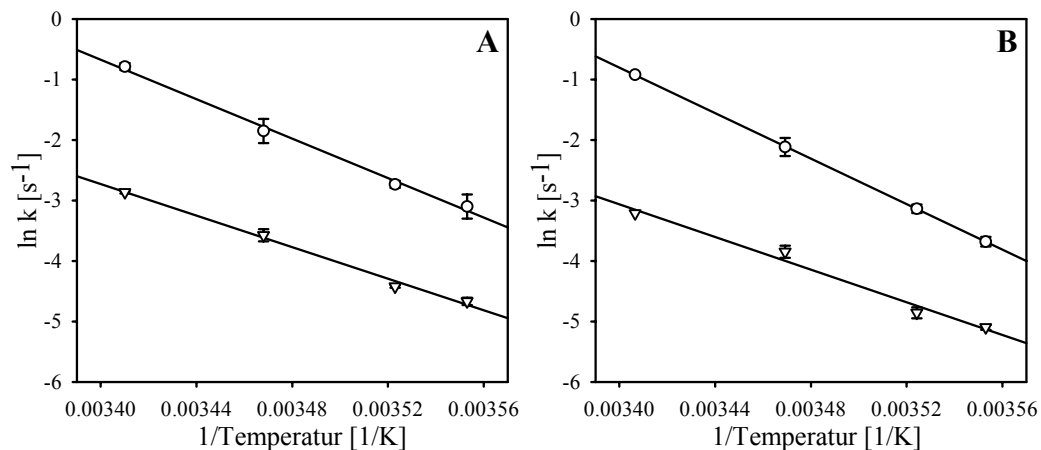


Abb. 3.27: Temperaturabhängigkeit der schnellen und langsamen Faltungsphase des InIB₂₄₁ und InIB₃₂₁*.

A zeigt die Temperaturabhängigkeit der schnellen (○) und langsamen (▽) Faltungsphase des InIB₂₄₁ bei 0.3 M GdmCl. **B** zeigt die Temperaturabhängigkeit für InIB₃₂₁*. Die Aktivierungsenergie wird aus der Steigung der Regressionsgeraden (—) bestimmt. Die Fehlerbalken resultieren aus Mehrfachmessungen. Die Fluoreszenzkinetiken wurden bei 343 nm (InIB₂₄₁) bzw. 328 nm (InIB₃₂₁*) und einer Anregungswellenlänge von 280 nm gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 5 µg ml⁻¹ und der verwendete Puffer war 20 mM MOPS/NaOH, 1 mM EDTA, pH 7.5.

Um den Zusammenhang zwischen der Prolinisomerisierung und der langsamen Faltungsphase aufklären zu können, wurden Doppelsprungexperimente durchgeführt (Brandts *et al.*, 1975; Schmid, 1986). Die InIB-Konstrukte wurden in 5 M GdmCl denaturiert und anschließend zu Renaturierungsbedingungen bei 0.3 M GdmCl verdünnt. Besteht eine Korrelation zwischen der langsamen Renaturierungsphase und der langsamen Gleichgewichtseinstellung der *cis-trans*-Konformationen des Prolins im entfalteten Protein, so sollte diese eine Abhängigkeit von der Denaturierungszeit zeigen. Nach einer kurzen Denaturierungszeit sollten die Prolinreste noch in ihrer nativen Konformation vorliegen und die Amplitude der langsamen Renaturierungsphase dementsprechend klein sein. Mit steigender Denaturierungszeit sollte sich ein Gleichgewicht zwischen der *cis*- und *trans*-Konformation einstellen und die Phase des langsamen Renaturierungsschrittes zunehmen. In Abbildung 3.28 ist die Abhängigkeit der relativen Amplitude der langsamen Renaturierungsphase von der Denaturierungszeit gezeigt. Das InIB₃₂₁* besitzt eine Xaa-Pro-Bindung, die im nativen Zustand in der *cis*-Konformation vorliegt. Alle Renaturierungskinetiken bei 0.3 M GdmCl mussten mit Hilfe einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden. Die relative Amplitude der langsamen Faltungsphase zeigte über den gesamten zeitlichen Verlauf der

Denaturierung (von 30 s bis 3 h) keine Änderung. Doppelsprungexperimente die mit der Tryptophanmutante InlB₃₂₁*W124S und dem InlB₂₄₁ wiederholt wurden, zeigten ebenfalls keine Zunahme der langsamen Renaturierungsphase mit steigender Denaturierungszeit (Daten nicht gezeigt). Die kürzeste Denaturierungszeit beim InlB₃₂₁*W124S betrug 10 s. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass eine Prolinisomerisierung nicht für die zweite langsame Renaturierungsphase während der Faltung des InlB₃₂₁* verantwortlich ist.

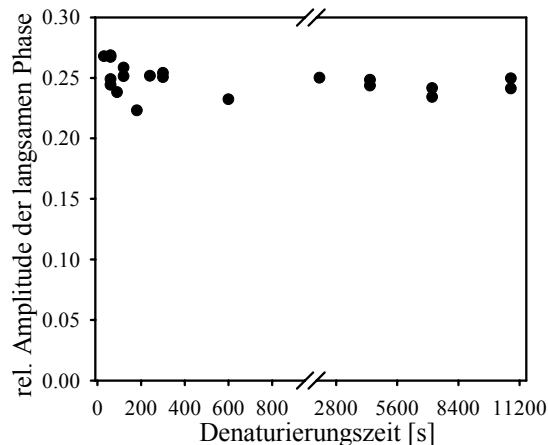


Abb. 3.28: Abhängigkeit der relativen Amplitude der langsamen Faltungsphase des InlB₃₂₁* von der Denaturierungszeit

Abhängigkeit der relativen Amplitude der langsamen Faltungsphase von der Denaturierungszeit bei 10 °C. Gemessen wurde die Fluoreszenzemission bei 328 nm (Anregung: 280 nm) und die Renaturierungskinetik des InlB₃₂₁* wurde jeweils bei 0.3 M GdmCl verfolgt. Der verwendete Puffer war 20 mM MOPS/NaOH, 1 mM EDTA, pH 7.5 und die Proteinkonzentration betrug 5 µg ml⁻¹.

Denkbar wäre noch, dass eine schnelle Reaktion, die schätzungsweise innerhalb der ersten 20 s abläuft, aufgrund der Handmischungsexperimente nicht detektiert werden konnte. Sollte eine *cis-trans*-Prolinisomerisierung für die langsame Faltungsphase verantwortlich sein, so wäre es auch möglich, dass die Bedingungen, unter denen die Doppelsprungexperimente hier durchgeführt wurden, nicht optimal waren. Die Parameter für diese Experimente müssen so gewählt sein, dass sich die Prolin-limitierten Prozesse von den Faltungsreaktionen unterscheiden lassen, die nicht durch Isomerisierungsreaktionen bestimmt werden, und das sowohl in der Entfaltung als auch in der Rückfaltung (Schmid, 1986).

Mit den bisherigen Resultaten zur Untersuchung des Faltungsmechanismus der LRR- und der Internalin-Domäne konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Faltung kinetisch betrachtet keinem Zweizustandsmodell folgt. Über die genaue Natur der beobachteten zwei Phasen während der Faltung der Proteine konnte jedoch bisher keine eindeutige Aussage getroffen werden. Ob die zwei Renaturierungsphasen durch eine Prolinisomerisierung oder durch Intermediate die entweder auf dem Faltungsweg liegen (*on-pathway*) bzw. in eine Sackgasse führen (*off-pathway*) oder sogar durch eine Kopplung beider Prozesse begründet sind, muss in weiteren Faltungsstudien untersucht werden.

3.3.3 Charakterisierung eines im Sauren alternativ gefalteten Zustandes der LRR-Domäne des Internalin B

Der pH-Wert und die Salzkonzentration einer Lösung üben, aufgrund ihrer Fähigkeit die elektrostatischen Wechselwirkungen beeinflussen zu können, einen beträchtlichen Effekt auf die Stabilität, Struktur und Funktion vieler Proteine aus. Die säure-induzierte Entfaltung von Proteinen, bedingt durch die Protonierung von Aminosäureseitenketten und den daraus resultierenden elektrostatischen Abstoßungen, ist eine der ältesten bekannten Methoden, sie verläuft aber oft unvollständig und die säure-denaturierten Proteine nehmen Konformationen an, die von den chemisch-denaturierten Proteinen verschieden sind (Tanford, 1968; Goto *et al.*, 1990b; Dill & Shortle, 1991). Für manche Proteine, wie z. B. beim Cytochrom c und beim α -Lactalbumin, konnte unter sauren Bedingungen die Ausbildung von sogenannten *molten globule* ähnlichen Intermediaten berichtet werden (Jeng *et al.*, 1990; Kuwajima, 1996; Pfeil, 1998b). Hiermit wird im allgemeinen ein kompakter Zustand bezeichnet, welcher schon nativ-ähnliche Sekundärstrukturelemente, aber noch keine Tertiärstruktur aufweist. Da die Definition des Begriffes *molten globule* derzeit für viele Faltungszustände eines Proteins unter sauren Bedingungen Anwendung findet, wird im folgenden der Begriff alternativ gefalteter Zustand verwendet. Dieser Begriff beschreibt im allgemeinen keinen eindeutigen Faltungszustand eines Proteins und ist daher nicht zwingend mit dem *molten globule* gleichzusetzen.

Fluoreszenzspektren des InlB₂₄₁ zeigten bei pH-Werten kleiner 3 in Gegenwart von Salz eine Verschiebung des Emissionsmaximums in den kurzwelligen Bereich (siehe 3.3.1.4). Wie sich die LRR-Domäne unter sauren Bedingungen verhält und welche spektroskopischen und strukturellen Eigenschaften möglicherweise beobachtet werden können, sollte in den folgenden Untersuchungen gezeigt werden.

3.3.3.1 Spektroskopische Eigenschaften der LRR-Domäne im sauren pH-Bereich

Der Einfluss des pH-Wertes auf die LRR-Domäne wurde zunächst ausführlicher mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie untersucht (Abb. 3.29). InlB₂₄₁ wurde dafür in Puffern unterschiedlicher pH-Werte in Gegenwart von 100 mM NaCl inkubiert. Bei pH 7 zeigte das Protein sein charakteristisches Spektrum mit dem Minimum bei 219 nm. Diese typische Form des Fern-UV-CD-Spektrums blieb über einen sehr breiten pH-Bereich (3.5 bis 10.5) erhalten. Eine minimale Änderung war lediglich in der Elliptizität zu verzeichnen. Dies könnte durch geringfügige Sekundärstrukturänderungen erklärt werden. Wurde der pH-Wert auf 2.5 erniedrigt, so war zu beobachten, dass das Minimum bei 219 nm schwächer wurde und ein zweites, sehr stark ausgebildetes Minimum bei 203 nm ($[\Theta]_{MRW} = -14000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) auftrat. Eine weitere Absenkung des pH-Wertes durch Zugabe von 50 mM HCl führte zu keiner weiteren Veränderung im Spektrum.

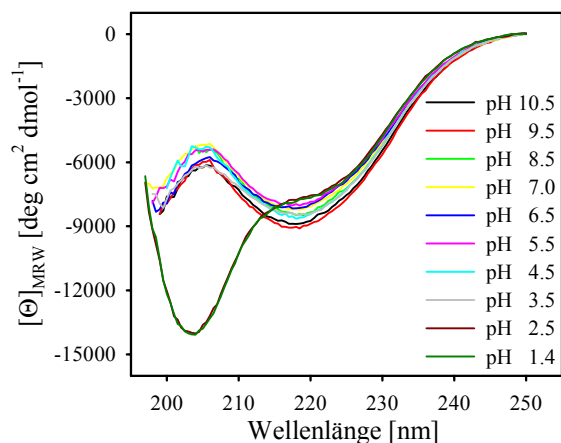


Abb. 3.29: Fern-UV-CD-Spektren des InIB₂₄₁ bei verschiedenen pH-Werten in Gegenwart von 100 mM NaCl

Fern-UV-CD-Spektren von InIB₂₄₁ gemessen bei verschiedenen pH-Werten in Gegenwart von 100 mM NaCl. Die verwendeten Puffer (jeweils 10 mM) waren folgendermaßen zusammengesetzt: pH 10.5 : CAPS/NaOH, 9.5: CHES/NaOH, 8.5: Bicine/NaOH, 7.0: Tris/HCl, 6.5: MOPS/NaOH, 5.5: MES/NaOH, 4.5: Na-Acetat, 3.5, 2.5: Glycin/HCl, 1.4: 50 mM HCl. Die Proteinkonzentration betrug 250 µg ml⁻¹ und die Messtemperatur 10 °C.

Da die bisherigen spektroskopischen Untersuchungen im sauren pH-Bereich (siehe 3.3.1.4 und 3.3.3.1) in Gegenwart von moderaten Salzkonzentrationen durchgeführt wurden und bekannt ist, dass Anionen bei säure-denaturierten Proteinen Sekundärstruktur induzieren können, wurden sowohl die spektroskopischen Eigenschaften in Abhängigkeit vom pH-Wert ohne Salz als auch der Einfluss von Salz auf den bei pH 2 denaturierten Zustand näher untersucht (Goto *et al.*, 1990a; Fink *et al.*, 1994).

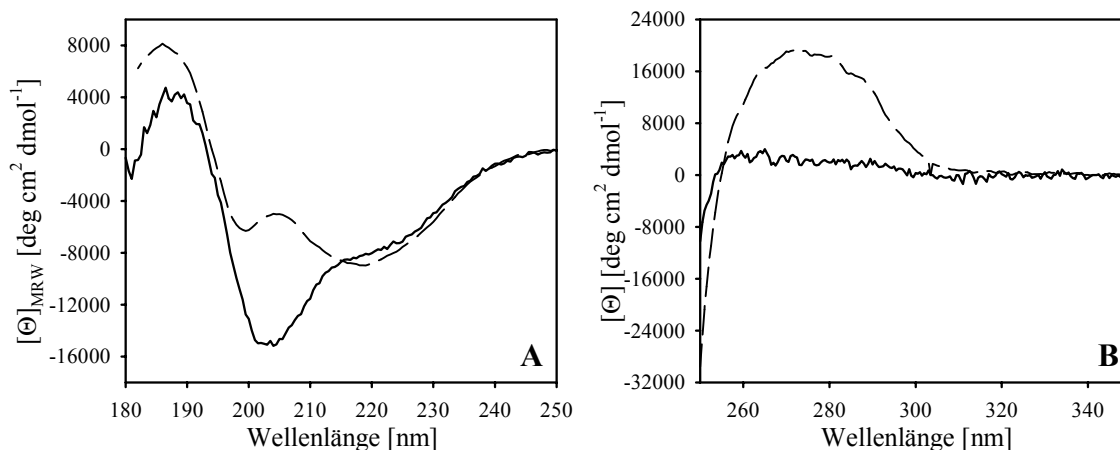


Abb. 3.30: Fern- und Nah-UV-CD-Spektren des InIB₂₄₁ bei pH 1.88

A zeigt das Fern-UV-CD-Spektrum des InIB₂₄₁ bei pH 1.88 (—) und pH 7 (---). **B** zeigt das Nah-UV-CD-Spektrum. Die Messungen erfolgten bei 10 °C mit einer Proteinkonzentration von 250 µg ml⁻¹ (pH 1.88) bzw. 1 mg ml⁻¹ (pH 7). Die verwendeten Puffer waren 11 mM H₂SO₄, pH 1.88 und 20 mM MOPS/NaOH, pH 7.

Abbildung 3.30 A zeigt das Fern-UV-CD-Spektrum des InIB₂₄₁ im Vergleich bei pH 7 und in 11 mM H₂SO₄ bei pH 1.88. Es ist ein deutlicher Unterschied im Bereich von 200 bis 220 nm zu beobachten. Die Form des Spektrums des saure-denaturierten Proteins deutet an, dass ein Teil an Sekundärstruktur verloren gegangen ist. Das Minimum bei 203 nm und das Maximum bei 188 nm lassen jedoch vermuten, dass eine Art Reststruktur vorliegt. Um einen quantitativen Eindruck von der existierenden Sekundärstruktur erhalten zu können, wurde das Programm CDSSTR angewandt (Johnson, 1999). Je nach verwendetem Referenzsatz (entweder mit oder ohne 3₁₀-Helix-Datensatz), wurden ungefähr 42

bis 48 % ungeordnete, 20 % α -helikale und 12 % β -Struktur vorhergesagt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem Programm CONTINLL erzielt (Provencher & Glöckner, 1981). Fern-UV-CD-Spektren die in schwach konzentrierten Na_2SO_4 -Puffern gemessen wurden, zeigten einen kompakteren Zustand mit typischen Charakteristika für β -Strukturen (Daten nicht gezeigt). Diese Änderung im Spektrum ist durch das Sulfat zu erklären. Nach der Hofmeister-Serie zählen SO_4^{2-} -Ionen zu den stärker kosmotropen Salzen und haben eine höhere Ionenstärke als die Cl^- -Ionen. Das Nah-UV-CD-Spektrum in 11 mM H_2SO_4 hat den charakteristischen Verlauf eines entfalteten Proteins und zeigt das Fehlen von Tertiärstruktur (Abb. 3.30 B). Die fehlende Tertiärstruktur, aber vorhandene Sekundärstruktur, könnte ein Hinweis auf das Vorliegen eines alternativ gefalteten Zustandes sein.

Die Fluoreszenzspektren des InlB₂₄₁ zeigen über einen pH-Bereich von 4 bis 9 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Fluoreszenzintensität und der Lage der maximalen Emission (Abb. 3.31). Bei $\text{pH} > 10$ bzw. $\text{pH} < 3$ nimmt die Fluoreszenzquantenausbeute ab, die Lage des Maximums ($\lambda_{\text{max}} = \sim 348 \text{ nm}$) bleibt aber noch unverändert. Bei $\text{pH} 2$ liegt InlB₂₄₁ in einer säure-denaturierten Form vor, was durch die starke Abnahme in der Fluoreszenzemission und der Verschiebung des Emissionsmaximums nach 355 nm wiedergespiegelt wird. Bei einer Proteinlösung, die in 6 M GdmCl denaturiert wurde, liegt das Maximum ebenfalls bei 355 nm, nur ist die Fluoreszenzintensität um das 1.6-fache erhöht. Bei $\text{pH} 2$ wird die Fluoreszenzemission der Chromophore der LRR-Domäne anscheinend in einem stärkeren Maße gelöscht, als dies im chemisch-denaturierten Zustand der Fall ist. Wird der pH-Wert durch Zugabe von 50 mM HCl auf $\text{pH} 1.4$ erniedrigt, so ist eine Verschiebung des Emissionsmaximums zu kürzeren Wellenlängen hin zu beobachten. Das Maximum liegt bei 340 nm, während die Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Zustand bei $\text{pH} 2$ unverändert bleibt. Dieses Resultat könnte durch eine Kompaktierung des sauer-denaturierten Zustandes durch die erhöhte Salzkonzentration bei 50 mM HCl im Vergleich zu 20 mM Glycin $\text{pH} 2$ zu erklären sein. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der β -Lactamase gemacht (Goto *et al.*, 1990b).

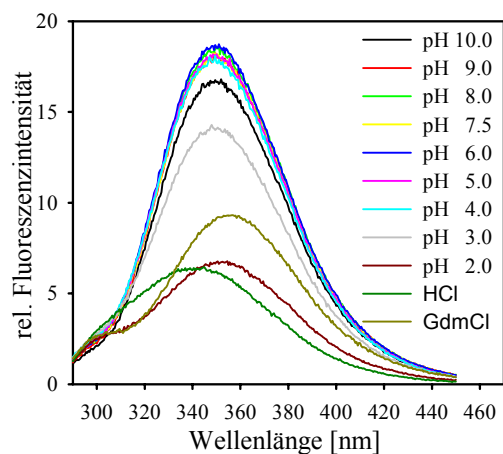


Abb. 3.31: Fluoreszenzemissionsspektren von InlB₂₄₁ bei verschiedenen pH-Werten in Abwesenheit von NaCl

Fluoreszenzemissionsspektren (Anregung: 280 nm) von InlB₂₄₁ bei verschiedenen pH-Werten in Abwesenheit von NaCl. Die verwendeten Puffer (jeweils 20 mM) waren folgendermaßen zusammengesetzt $\text{pH} 10.0$: CAPS/NaOH, 9.0 : CHES/NaOH, 8.0 : Bicine/NaOH, 7.5 : MOPS/NaOH, 6.0 : MES/NaOH, 5.0 , 4.0 : Na-Acetat, 3.0 , 2.0 : Glycin/HCl, HCl: 50 mM HCl, GdmCl: 6 M GdmCl, $\text{pH} 7.5$. Die Proteinkonzentration betrug $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ und die Messtemperatur $10 \text{ }^\circ\text{C}$.

In Abwesenheit von Salz zeigt InlB₂₄₁ im Fern-UV-CD-Spektrum einen Verlauf, der die Charakteristika eines denaturierten Proteins besitzt (Johnson, 1990). Das Minimum liegt bei 200 nm mit einer Elliptizität von $[\Theta]_{\text{MRW}} = -18300 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ (Abb. 3.32). Eine Titration des Proteins mit NaCl bis zu einer Endkonzentration von 500 mM Salz resultierte in einer drastischen Veränderung des Fern-UV-CD-Spektrums. Das ausgeprägte Minimum bei 200 nm verschob sich zu größeren Wellenlängen hin (208 nm bei 500 mM NaCl), und die Schulter bei 220 nm wurde stärker ausgebildet. Diese Änderungen könnten einerseits auf die Induktion von Sekundärstrukturelementen hindeuten, resultieren aber höchstwahrscheinlich aus einer Kompaktierung des sauer-denaturierten Zustandes. Durch die erhöhte Konzentration an Chloridionen in der Lösung erfolgt eine Abschirmung der positiven Ladungen im entfalteten Protein und eine Verminderung der Ladungsabstoßung. Aufgrund der intrinsischen hydrophoben Kräfte kann ein Kollaps zu einem kompakteren Zustand erfolgen (Fink *et al.*, 1994). Dieser Effekt konnte auch beim Cytochrom c und Apomyoglobin beobachtet werden (Goto *et al.*, 1990b). Das Spektrum in Gegenwart von 500 mM NaCl hat die charakteristischen Merkmale einer β -reichen Struktur (Minimum bei 208 nm und eine leichte Schulter bei 220 nm). Denkbar wäre hier auch die Existenz eines aggregierten Zustandes, was aber noch zu untersuchen wäre. Die salzinduzierte Struktur zeigte jedoch noch deutliche Unterschiede zu der nativen Struktur bei pH 7 auf.

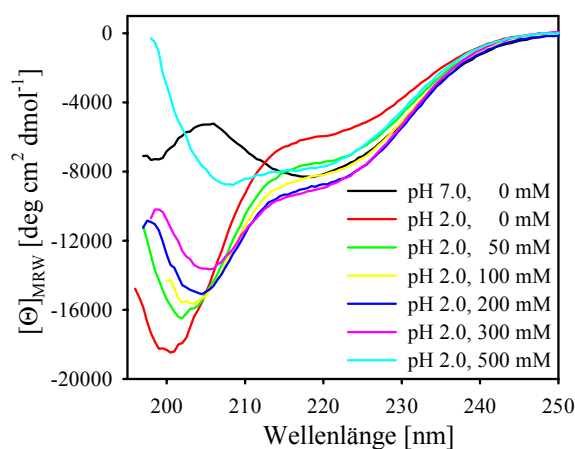


Abb. 3.32: Fern-UV-CD-Spektren von InlB₂₄₁ bei pH 2 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration

Fern-UV-CD-Spektren des InlB₂₄₁ bei pH 2 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Die Salzkonzentration wurde zwischen 0 und 500 mM NaCl variiert und der verwendete Puffer war 20 mM Glycin/HCl, pH 2. Die Spektren wurden mit einer Proteinkonzentration von $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ und bei 10°C gemessen. Als Referenz diente das Spektrum in 20 mM MOPS/NaOH, pH 7.5. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg ml^{-1} .

Die Analyse der Tertiärstruktur vom InlB₂₄₁ bei pH 2 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration konnte anhand der Fluoreszenzeigenschaften des einzelnen Tryptophans an der Position 124 sehr gut durchgeführt werden (Abb. 3.33 A und B). In Abwesenheit von Salz ergab sich ein Spektrum mit einer maximalen Fluoreszenzemission bei 355 nm, welches einem chemisch-denaturierten Protein entspricht. Zugabe von NaCl resultierte in einer Verschiebung des Emissionsmaximums zu kürzeren Wellenlängen hin, und eine Zunahme der Fluoreszenz konnte beobachtet werden. Die Verschiebung in den kurzwelligen Bereich erfolgte um insgesamt 18 nm von 352 nach 334 nm (in Gegenwart von 500 mM NaCl), und die Amplitude nahm im Maximum um das 1.4-fache zu. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Tryptophan in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen keinen direkten

Lösungsmittelzugang mehr aufweist und in einer hydrophoben Umgebung lokalisiert vorliegen muss, entsprechend einem kompakten Zustand. Das Maximum der Fluoreszenzemission des InlB₂₄₁ in Gegenwart von 50 mM NaCl liegt bei 344 nm, was nahe dem Emissionsmaximum des Proteins in 50 mM HCl liegt (Abb. 3.31). Dies würde dafür sprechen, dass die in Abb. 3.31 beobachtete Blauverschiebung im Vergleich zu dem Spektrum in 20 mM Glycin pH 2 durch den erhöhten Salzeffekt hervorgerufen wurde. Oberhalb von 500 mM NaCl scheint keine signifikante Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen hin mehr zu erfolgen (Abb. 3.33 B).

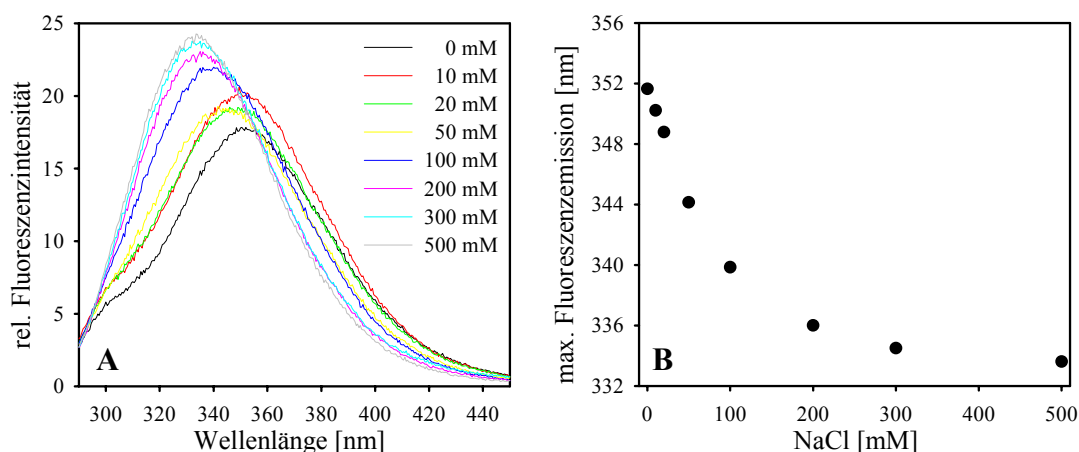


Abb. 3.33: Fluoreszenzemissionsspektren von InlB₂₄₁ bei pH 2 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration

A zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren (Anregung: 280 nm) von InlB₂₄₁ bei pH 2 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. **B** zeigt die Änderung der maximalen Fluoreszenzemission in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Die Messungen wurden in 20 mM Glycin/HCl, pH 2 bei 10 °C mit einer Proteinkonzentration von 10 µg ml⁻¹ durchgeführt.

3.3.3.2 Strukturelle Charakterisierung des alternativ gefalteten Zustandes

Des öfteren konnte bei den durch Anionen induzierten, partiell gefalteten Zuständen von säure-denaturierten Proteinen eine verstärkte Neigung zur Aggregation festgestellt werden (Fink *et al.*, 1994). Um bei den hier weiterführenden Untersuchungen des alternativ gefalteten Zustandes sicher gehen zu können, dass es sich bei den oben beschriebenen spektroskopischen Eigenschaften um die des monomeren Proteins handelt, wurden Lichtstreuungsmessungen durchgeführt.

Zunächst wurde eine Lösung des sauer-denaturierten Proteins bei pH 2 in Abwesenheit von Salz vermessen. Aus der Messung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) konnte ein Stokesradius (R_S) von 3.74 nm und aus der Messung der statischen Lichtstreuung (SLS) ein apparentes Molekulargewicht von 19.9 kDa bestimmt werden, was auf einen monomeren Zustand des InlB₂₄₁ bei pH 2 hindeutete. Ein gesteigertes Aggregationsverhalten des Proteins konnte selbst über einen längeren Zeitraum von einigen Monaten nicht festgestellt werden. Nach Zugabe von 100 mM NaCl zu der Proteinlösung wurde ein etwas kleinerer Stokesradius von $R_S = 3.16$ nm bestimmt, was für eine Kompaktierung des sauer-denaturierten Proteins sprach. Ein ähnlicher Effekt der Kompaktierung konnte auch im Fern-UV-CD und in der Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 3.32 und 3.33). Bei diesen

Salzkonzentrationen konnte eine langsam verlaufende Aggregationskinetik detektiert werden. Über einen Zeitraum von mehreren Stunden änderte sich der monomere Zustand praktisch nicht. Erst nach ungefähr 15 h konnte eine Zunahme von Aggregaten in der Lösung beobachtet werden. Für die spektroskopische Charakterisierung der Wirkung von NaCl auf den alternativ gefalteten Zustand wurden die Proteinlösungen stets frisch angesetzt und innerhalb weniger Stunden vermessen. Einen verfälschenden Einfluss möglicher Aggregate auf die gemessenen spektroskopischen Signale kann somit ausgeschlossen werden.

Die Exposition von Tryptophanen in einem bestimmten Zustand eines Proteins lässt sich besonders gut durch die Messung des Löschens („*quenchens*“) der Tryptophanfluoreszenz durch einen externen *Quencher* bestimmen. Acrylamid ist ein solch effektiver *Quencher*. Aufgrund des polaren Charakters des Acrylamidmoleküls ist es nicht in der Lage, die Fluoreszenz von vollständig verborgenen Tryptophanresten zu *quench*, dafür aber die von oberflächenexponierten oder nur teilweise verborgenen Tryptophanen.

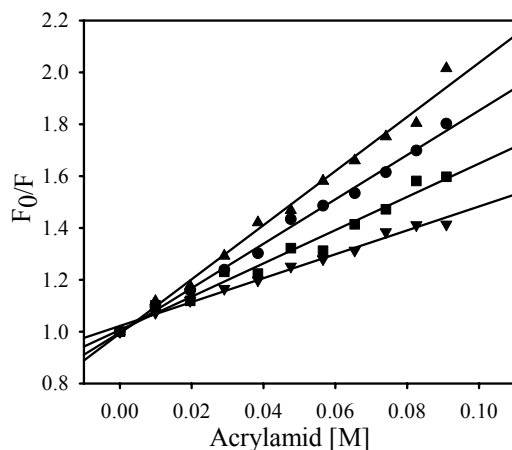


Abb. 3.34: Auftragung der Fluoreszenzlöscherung des InlB₂₄₁ nach Stern-Volmer

Auftragung der Fluoreszenzlöscherung des InlB₂₄₁ gegen die Acrylamidkonzentration unter verschiedenen Bedingungen: pH 7.5 (●), pH 2 (▲), pH 2 100 mM NaCl (■) und pH 2 500 mM NaCl (▼). Die durchgezogenen Linien stellen die Regression der Daten nach der Stern-Volmer-Gleichung dar. Die Messungen erfolgten bei 10 °C mit einer Proteinkonzentration von 10 µg ml⁻¹. Die verwendeten Puffer waren 20 mM MOPS/NaOH, 1 mM EDTA, pH 7.5 und 20 mM Glycin/HCl, pH 2.

In Abbildung 3.34 ist der sogenannte Stern-Volmer-Plot für die Löscherung der intrinsischen Proteinfluoreszenz des InlB₂₄₁ bei pH 7.5 und pH 2 dargestellt. In Tabelle 3.13 sind die *Quench*-Konstanten K_{SV} für die verschiedenen Messbedingungen dargestellt. Für den nativen und in 6 M GdmCl entfalteten Zustand ergaben sich identische K_{SV} -Konstanten, was durch die relativ hohe Lösungsmittelexposition des Tryptophan 124 in der LRR-Domäne zu erklären ist. Unter denaturierten Bedingungen bei pH 2 stieg der Wert für die *Quench*-Konstante. Dies würde darauf hindeuten, dass das Tryptophan im sauer-denaturierten Zustand zugänglicher für das Acrylamid wird, als dies unter chemisch-denaturierten Bedingungen der Fall ist. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch in den Fluoreszenzspektren in Abb. 3.31 gemacht werden. Die Fluoreszenz des in pH 2 denaturierten Proteins wurde stärker gelöscht als in 6 M GdmCl. In Gegenwart von 6 M GdmCl ist aber auch die Viskosität der Lösung sehr stark erhöht, was einen Effekt auf die K_{SV} -Konstante hat und nicht zu vernachlässigen ist (es erfolgte keine Korrektur der Viskosität). Wird die Salzkonzentration bei pH 2 erhöht, so konnte eine deutliche Änderung in den *Quench*-Konstanten beobachtet werden. Die Zugänglichkeit des

Tryptophans für Acrylamid nahm in Gegenwart von 100 mM NaCl auf 6.41 M^{-1} und bei 500 mM NaCl auf 4.60 M^{-1} ab. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass sich das Tryptophan bei pH 2 in Gegenwart von moderaten Salzkonzentrationen in einer hydrophoben Umgebung befinden muss und gut gegen das Acrylamid abgeschirmt ist. Dieses Resultat ist übereinstimmend mit der Blauverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums und den Änderungen im Fern-UV-CD Signal bei pH 2 nach Zugabe von NaCl.

Tab. 3.13: Quench-Konstanten des InlB₂₄₁ bei verschiedenen pH-Werten

InlB ₂₄₁	K _{SV} [M ⁻¹]
pH 7.5	7.7
6 M GdmCl, pH 7.5	7.9
pH 2	10.4
100 mM NaCl, pH 2	6.4
500 mM NaCl, pH 2	4.6

Die verwendeten Puffer sind bei Abb. 3.33 angegeben.

Eine weitere Charakterisierung des Faltungszustandes des InlB₂₄₁ unter sauren Bedingungen erfolgte durch Interaktionsstudien des Proteins mit dem hydrophoben Farbstoff 1-Anilino-8-naphtalensulfonat (ANS). Die unpolare Anilino-Naphtalengruppe des ANS-Moleküls bindet an lösungsmittlexponierte hydrophobe Oberflächenbereiche von Proteinen und ändert dabei seine Fluoreszenzeigenschaften (Slavik, 1982; Engelhard & Evans, 1995). Die Bindung resultiert in einer Verschiebung des Emissionsmaximums und einem Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute, sobald sich der Farbstoff in einer unpolaren Umgebung befindet. Solch eine Umgebung wird durch hydrophobe Regionen bereitgestellt, wie sie auch in einem partiell strukturierten Protein zu finden sind. In einer wässrigen, nicht an ein Protein gebundenen Umgebung, wird die Fluoreszenzemission des ANS-Moleküls wirkungsvoll durch die Lösungsmittelmoleküle gelöscht (Kirk *et al.*, 1996).

In Abbildung 3.35 A sind die Fluoreszenzspektren des ANS bei verschiedenen pH-Werten in Anwesenheit von $0.43 \mu\text{M}$ InlB₂₄₁ abgebildet. Das ANS wurde in einem 100-fachen Überschuss, bezogen auf die molare Proteinkonzentration, zu der Proteinlösung gegeben. Ab einem pH-Wert kleiner gleich 3 war in den Fluoreszenzemissionsspektren eine Interaktion des Proteins mit ANS erkennbar. Bei einer Anregung des ANS-Fluorophores bei 350 nm war zwischen den Zuständen bei pH 3, pH 2 und in 50 mM HCl ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzemission zu erkennen. Interessanterweise wies die Emission bei pH 3 im Vergleich zu pH 2 eine um den Faktor 1.8 und in 50 mM HCl eine um den Faktor 2.3 gesteigerte Intensität auf. Oberhalb von pH 4 und in 6 M GdmCl war keine Fluoreszenz zu beobachten, was darauf hindeutet, dass unterhalb von pH 3 exponierte hydrophobe Bereiche vorliegen müssen, an welche das ANS binden kann.

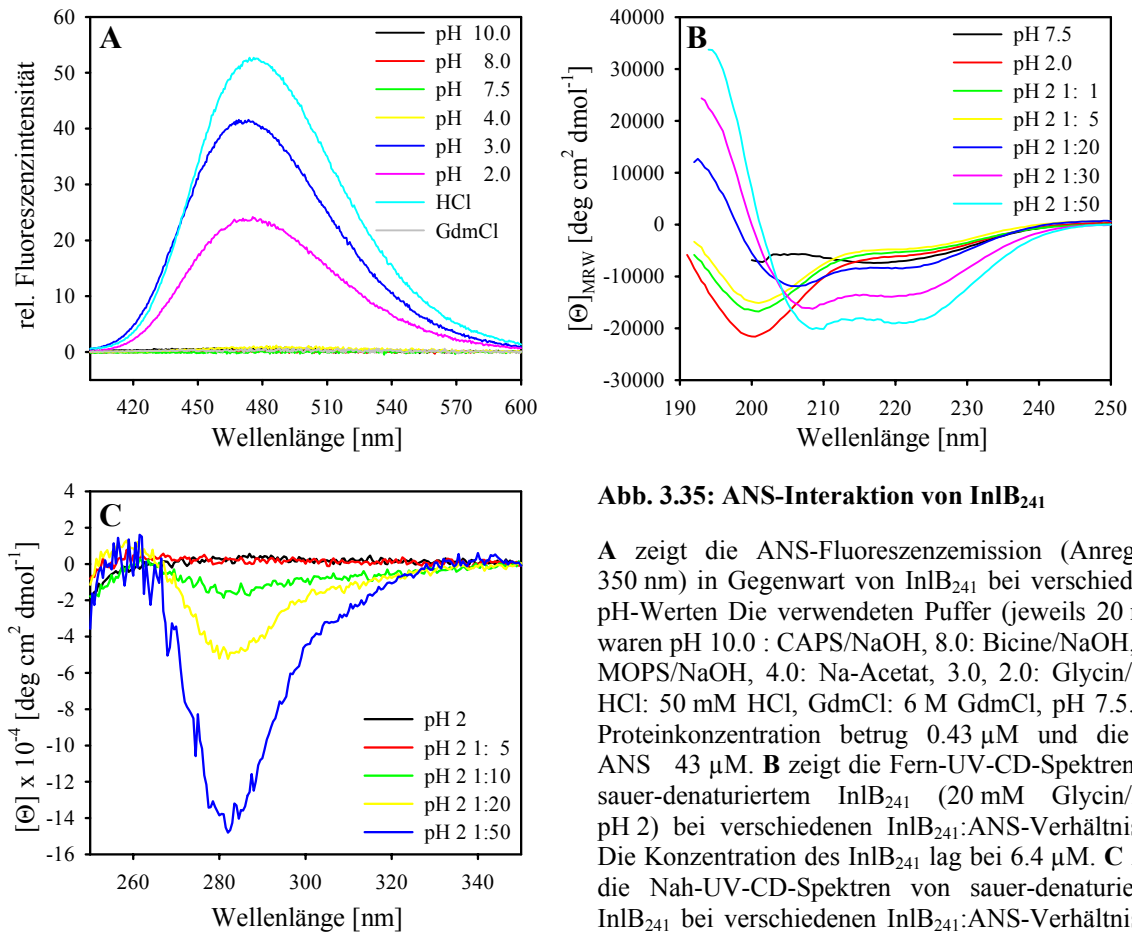


Abb. 3.35: ANS-Interaktion von InIB₂₄₁

A zeigt die ANS-Fluoreszenzemission (Anregung: 350 nm) in Gegenwart von InIB₂₄₁ bei verschiedenen pH-Werten. Die verwendeten Puffer (jeweils 20 mM) waren pH 10.0 : CAPS/NaOH, 8.0: Bicine/NaOH, 7.5: MOPS/NaOH, 4.0: Na-Acetat, 3.0, 2.0: Glycin/HCl, HCl: 50 mM HCl, GdmCl: 6 M GdmCl, pH 7.5. Die Proteinkonzentration betrug 0.43 μM und die des ANS 43 μM . **B** zeigt die Fern-UV-CD-Spektren von sauer-denaturiertem InIB₂₄₁ (20 mM Glycin/HCl, pH 2) bei verschiedenen InIB₂₄₁:ANS-Verhältnissen. Die Konzentration des InIB₂₄₁ lag bei 6.4 μM . **C** zeigt die Nah-UV-CD-Spektren von sauer-denaturiertem InIB₂₄₁ bei verschiedenen InIB₂₄₁:ANS-Verhältnissen. Die Messtemperatur lag bei 10 °C.

Ob eine wirkliche Bindung des ANS an das sauer-denaturierte InIB₂₄₁ erfolgte, sollte mittels CD-Spektroskopie untersucht werden. In Abbildung 3.35 B ist die Bindung von verschiedenen ANS-Konzentrationen bei pH 2 an das Protein, verfolgt im Fern-UV-CD, abgebildet. Bei pH 2 ist wieder das charakteristische Fern-UV-CD-Spektrum eines entfalteten Proteins mit dem ausgeprägten Minimum bei 200 nm zu erkennen ($[\Theta]_{\text{MRW}} \approx -20000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). Mit steigendem molarem Überschuss an ANS (Proteinkonzentration 6.4 μM) nahm die Elliptizität bei 200 nm sukzessive ab und das Minimum verschob sich zu größeren Wellenlängen hin. Bereits in Gegenwart von 6.4 μM ANS erfolgte eine Abnahme der Elliptizität bei 200 nm. Ab einem 20-molaren Überschuss an ANS bildete sich eine Schulter bei ungefähr 220 nm aus. Zudem war ein Maximum bei 195 nm zu erkennen, welches mit weiter steigender Konzentration an ANS deutlich zunahm. In Gegenwart eines 50-molaren Überschusses an ANS (320 μM ANS) zeigte das Fern-UV-CD Spektrum die typischen Charakteristika eines α -helikalen Proteins. Es hatte ausgeprägte Minima bei 220 und 210 nm und ein Maximum bei 195 nm. Die Sekundärstrukturvorhersage mit Hilfes des Programmes CDSSTR ergab einen α -Helix-Gehalt von ungefähr 60 %. Die Zugabe des hydrophoben Farbstoffes ANS scheint somit einen Zustand bei pH 2 zu induzieren, der reich an Sekundärstruktur ist.

Im Nah-UV-CD-Spektrum war ab einem 10-molaren Überschuss an ANS eine beginnende Veränderung des Spektrums zu beobachten (Abb. 3.35 C). Mit steigendem ANS-Gehalt in der Proteinlösung wird ein sehr prominentes Minimum bei 280 nm induziert. Das Nah-UV-CD-Spektrum des InlB₂₄₁ unter nativen Bedingungen bei pH 7.5 weist ausschließlich einen positiven Verlauf auf (siehe Abb. 3.30 B). Die hier beobachteten Änderungen im CD bei 280 nm könnten durch das ANS selbst erklärt werden. Der Farbstoff besitzt ein sehr ausgeprägtes Absorptionsspektrum mit typischen Maxima bei 350, 280 und 210 nm. Die Bindung bei pH 2 an InlB₂₄₁ und die daraus folgende induzierte Struktur könnte das ANS-Molekül in einer asymmetrischen Umgebung immobilisieren, was in einer negativen CD-Bande bei 280 nm resultieren könnte.

In Gegenwart eines 100-molaren Überschusses an ANS war die Proteinlösung trübe, was auf einen Aggregationsprozess hindeutete. Um sicher gehen zu können, dass in Gegenwart von 320 μ M ANS die Proteinlösung keine Aggregate enthielt, wurden Lichtstreuungsmessungen durchgeführt. Überraschenderweise zeigten die Ergebnisse der DLS-Messungen, dass bei einem 50-molaren Überschuss an ANS kein monomeres InlB₂₄₁ mehr in der Lösung zu detektieren war. Es konnte hingegen ein oligomerer Zustand identifiziert werden, der einen Stokes-Radius von $R_S = 9.9$ nm besaß. Die apparente Molekularmasse dieses oligomeren Zustandes betrug 846 kDa. Unter der Annahme es handelt sich um ein monodisperses Oligomer, so würde dieses, basierend auf der apparenten Molekularmasse des monomeren InlB₂₄₁ bei pH 2 (19.9 kDa), aus ca. 43 Monomeruntereinheiten bestehen. Aufgrund der geringen Größe im Vergleich zu aggregierten bzw. filamentösen Oligomeren, könnte vermutet werden, dass eine Art Proteinmicelle gebildet wurde, in welcher das ANS eingeschlossen vorliegt.

3.3.3.3 Stabilität und Faltung unter sauren Bedingungen

Unter 3.3.3.1 konnte gezeigt werden, dass die LRR-Domäne des Internalin B bei pH 2 in Gegenwart von moderaten Salzkonzentrationen einen alternativ gefalteten Zustand ausbildet. Im folgenden sollte versucht werden die Stabilität und mögliche Faltung dieses Zustandes näher zu charakterisieren.

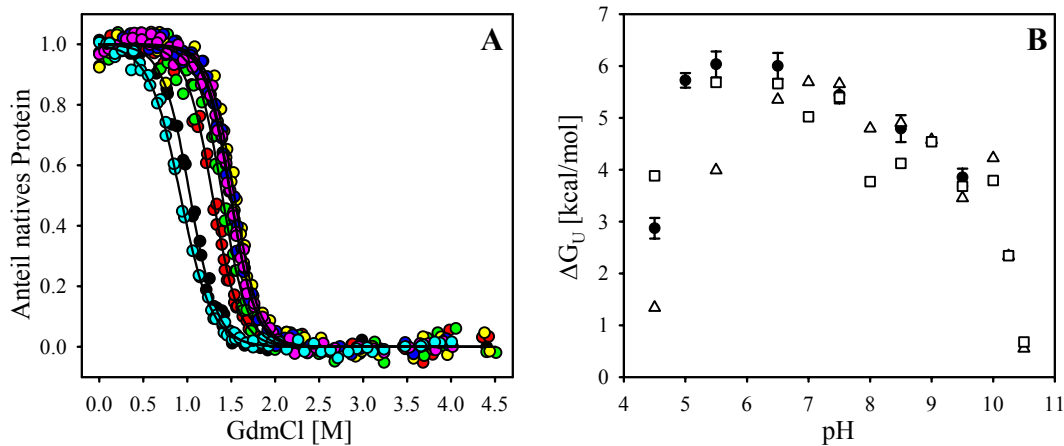
Es wurden Harnstoff-induzierte Gleichgewichtsübergänge in Abhängigkeit von dem pH-Wert bei einer Salzkonzentration von 100 mM NaCl gemessen. Über einen pH-Bereich von 4.5 bis 9.5 konnte jeweils ein kooperativer und vollständig reversibel verlaufender Denaturierungs- und Renaturierungsübergang detektiert werden (Abb. 3.36 A). Unterhalb von pH 4.5 bzw. oberhalb von pH 9.5 konnten die Gleichgewichtsübergänge aufgrund der verringerten Stabilität des InlB₂₄₁ nicht mehr zuverlässig mit einem Zweizustandsmodell ausgewertet werden. Ansonsten konnten die Datenpunkte aller Übergänge mit einem Zweizustandsmodell beschrieben werden (Tabelle 3.14). Betrachtet man die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_U bzw. den Übergangsmittelpunkt als Maß für die Stabilität des InlB₂₄₁, so konnte eine drastische Abnahme unterhalb von pH 5.0 beobachtet werden. Stabilitätsmessungen mittels DSC konnten hingegen bis zu einem pH-Wert von 3.5 durchgeführt werden (siehe 3.3.1.3). Hierbei ergab sich eine Schmelztemperatur T_m von ungefähr 31.5 °C.

Tab. 3.14: Ergebnisse der Harnstoff-Übergänge des InlB₂₄₁ bei verschiedenen pH-Werten

pH	ΔG_U [kcal mol ⁻¹]	m [kcal mol ⁻¹ M ⁻¹]	C_m [M]
4.5	2.9 ± 0.2	3.1 ± 0.1	0.9
5.0	5.7 ± 0.1	3.8 ± 0.1	1.5
5.5	6.0 ± 0.3	4.0 ± 0.2	1.5
6.5	6.0 ± 0.3	3.9 ± 0.2	1.5
7.5	5.4 ± 0.2	3.9 ± 0.2	1.4
8.5	4.8 ± 0.3	3.7 ± 0.2	1.3
9.5	3.9 ± 0.2	3.7 ± 0.1	1.1

Die verwendeten Puffer sind bei Abb. 3.34 angegeben.

Die Abhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung ΔG_U vom pH-Wert zeigt eine maximale Stabilität bei pH 6.0 (Abb. 3.36 B). Dies ist erwartungsgemäß übereinstimmend mit den Resultaten der T_m^{pH} -Bestimmung aus den DSC-Experimenten in Abhängigkeit vom pH-Wert (siehe 3.3.1.3). Berechnet man mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gl. 2.19) die ΔG_U -Werte für 10 °C aus den DSC-Läufen bei den verschiedenen pH-Werten, mit $\Delta C_p = 3.21 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, so erhält man ein Stabilitätsprofil, welches dem aus den Gleichgewichtsübergängen entspricht. Einige der berechneten ΔG_U -Werte weichen drastisch von den aus den Gleichgewichtsübergängen bestimmten ab. Dies ist durch die problematische Abschätzung des ΔH_{cal} aufgrund der Aggregation zu erklären (siehe 3.3.1.3). Ein Unterschied in der verwendeten Auswertemethode (ob Integration des DSC-Peaks oder Anwendung eines Zweizustandsmodells) kann nicht beobachtet werden.

**Abb. 3.36: Stabilität von InlB₂₄₁ bei verschiedenen pH-Werten**

A zeigt Harnstoff-induzierte Gleichgewichtsübergänge von InlB₂₄₁ bei verschiedenen pH-Werten. Abgebildet sind die De- und Renaturierungsübergänge bei pH: 9.5 (●), 8.5 (●), 7.5 (●), 6.5 (●), 5.5 (●), 5.0 (●) und 4.5 (●). Die durchgezogenen Linien stellen die Regression der Daten nach einem Zweizustandsmodell dar. Die verwendeten Puffer (jeweils 10 mM) waren pH 9.5: CHES/NaOH, 8.5: Bicine/NaOH, 7.5, 6.5: MOPS/NaOH, 5.5, 5.0: MES/NaOH, 4.5: Na-Acetat mit 1 mM EDTA, 100 mM NaCl. Die Messungen wurden bei 10 °C mit einer Proteinkonzentration von 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ durchgeführt. **B** zeigt die Abhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung vom pH-Wert. Aufgetragen sind die ΔG_U -Werte der Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergänge (●) und der aus den DSC-Experimenten bei verschiedenen pH-Werten berechneten. Dies erfolgt zum einen mit den ΔH_{cal} -Werten aus der Integration der DSC-Peaks mit kubischer Basislinie (Δ) und mit denen resultierend aus der Anwendung eines Zweizustandsmodells (\square).

Bei den DSC-Messungen erwies sich der alternativ gefaltete Zustand gegenüber thermisch-induzierter Denaturierung bei pH 2 in Gegenwart von 100 mM NaCl als äußerst instabil (Abb. 3.37). Temperaturübergänge gemessen im Fern-UV-CD lieferten keine auswertbare Entfaltung. Dies war in Bezug auf die spektroskopischen Eigenschaften, gemessen im Fern-UV-CD, auch zu erwarten gewesen. Hier zeigte sich in Gegenwart von 100 mM NaCl nur eine minimale Unterscheidung zum *random coil* Zustand.

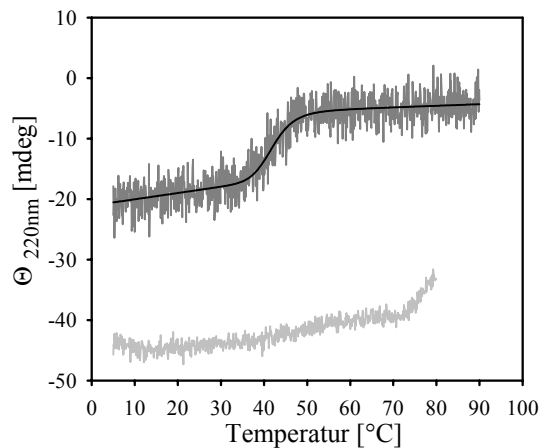


Abb. 3.37: Thermische Denaturierung von InlB₂₄₁ bei pH 2

Thermische Denaturierung von InlB₂₄₁ bei pH 2 (—) und bei pH 2 in Gegenwart eines 50-molaren Überschusses (320 μ M) an ANS (---). Die durchgezogene Linie (---) repräsentiert die Regression der Daten nach einem Zweizustandsmodell. Die verwendeten Puffer waren 20 mM Glycin/HCl, 100 mM NaCl, pH 2 bzw. bei dem Ansatz mit ANS nur 20 mM Glycin/HCl, pH 2. Die Proteinkonzentration lag bei 150 μ g ml⁻¹.

In Anwesenheit eines 50-molaren Überschusses an ANS (320 μ M) konnte die Ausbildung eines oligomeren Zustandes, welcher reich an α -helikaler Sekundärstruktur war, beobachtet werden (siehe 3.3.3.2). Es stellte sich die Frage, ob dieses Oligomer stabil genug war, um es thermodynamisch untersuchen zu können. Aus diesem Grund wurde eine temperatur-induzierte Entfaltung im Fern-UV-CD bei 222 nm gemessen (Abb. 3.37). Der Temperaturübergang dieses oligomeren Zustandes resultierte in einer kooperativen Entfaltung mit einem T_m -Wert von 42.2 °C. Der Übergang verhielt sich, wie bei den anderen InlB-Konstrukten auch, als thermisch irreversibel und resultierte in einer Aggregation der Proteinlösung. Der beobachtete T_m -Wert ist für ein Oligomer dieser Größe nicht sehr hoch, woraus geschlossen werden könnte, dass entweder die Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinuntereinheiten nicht sehr stark sind oder der monomere Zustand eine zu geringe Stabilität aufweist.

Beim Einbringen des InlB₂₄₁ in pH 2-Puffer zeigte sich eine vollständige Entfaltung (siehe 3.3.3.1). Da die Spektren bei den verschiedenen pH-Puffern nach längerer Inkubationszeit, also eher im Gleichgewicht, vermessen wurden, sollten die kinetischen Aspekte der Faltung bei pH 2 untersucht werden. Der zeitliche Verlauf der Entfaltung der Tertiärstruktur beim Sprung von pH 7.5 nach pH 2 ließ sich mit Hilfe von *stopped-flow*-Messungen der Änderungen in der Tryptophanfluoreszenz verfolgen (Abb. 3.38 A). Die relativ schnelle Kinetik konnte mit einer monoexponentiellen Gleichung beschrieben werden und lieferte eine Geschwindigkeitskonstante von $k_u^{\text{pH}} = 0.17 \text{ s}^{-1}$. Die Änderung in der Fluoreszenzamplitude konnte vollständig aufgelöst werden, d. h. es wurde keine Totzeitamplitude

detektiert. Die Renaturierung des sauer-denaturierten InlB₂₄₁ konnte durch einen entgegengesetzt verlaufenden pH-Sprung initiiert werden. Der kinetische Verlauf ließ sich am besten mit einer biexponentiellen Gleichung beschreiben und lieferte eine schnelle Phase mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_{f1}^{pH} = 0.26 \text{ s}^{-1}$ und einer zweiten langsameren Phase von $k_{f2}^{pH} = 0.02 \text{ s}^{-1}$. Das Endsignal der Renaturierung erreichte zwar das Signal des nativen Proteins in pH 7.5, jedoch wurde zu Beginn der Kinetik eine Totzeitamplitude detektiert. Der Amplitudenverlust während der Totzeit der Messung ($\sim 5 \text{ ms}$) entsprach ungefähr 40 % von der gesamten Signaländerung.

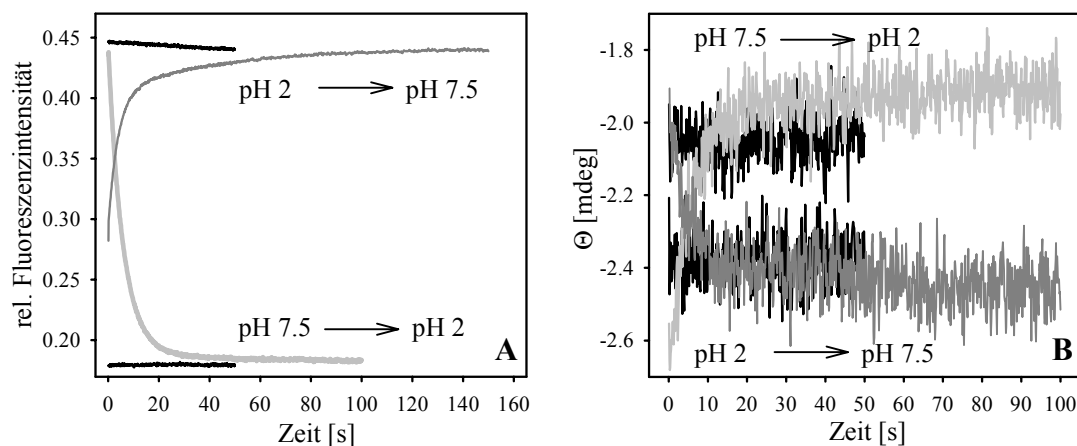


Abb. 3.38: pH-Sprung-induzierte Faltungs- und Entfaltungskinetiken des InlB₂₄₁

A zeigt die durch einen pH-Sprung initiierten Faltungs- (—) und Entfaltungskinetiken (---) des InlB₂₄₁, gemessen mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz (Anregung: 280 nm). **B** zeigt die entsprechenden Faltungs- (—) und Entfaltungskinetiken (---) gemessen mittels *stopped-flow*-Fern-UV-CD (bei 220 nm). Die schwarzen Linien repräsentieren die native und denaturierte Kontrolle (—) des Proteins. Die verwendeten Puffer waren 20 mM MOPS/NaOH, pH 7.5 und 20 mM Glycin/HCl, pH 2. Die Proteinkonzentration lag bei $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ bei den Fluoreszenz- und $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ bei den CD-Messungen. Alle Messungen erfolgten bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ein Ansatz für die Begründung der fehlenden 40 % in der Bildung der Tertiärstruktur wäre, dass diese auf strukturelle Veränderungen in der Sekundärstruktur zurückzuführen sind. Aus diesem Grund wurden die kinetischen Abläufe mittels *stopped-flow*-Fern-UV-CD charakterisiert. Die Denaturierung beim Sprung nach pH 2 verlief ebenfalls in einer Kinetik, die einem monoexponentiellen Verlauf entsprach (Abb. 3.38 B). Die Geschwindigkeitskonstante betrug $k_u^{pH} = 0.16 \text{ s}^{-1}$, was der aus den Fluoreszenzmessungen bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung entsprach. Diese Beobachtung würde dafür sprechen, dass die Tertiär- und Sekundärstruktur beim Überführen in pH 2 in einem vergleichbaren Zeitfenster entfalten. Die Renaturierung von in pH 2 denaturiertem InlB₂₄₁ folgte einem Verlauf, welcher auch mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden musste. Die Geschwindigkeitskonstanten der zwei Phasen lagen bei $k_{f1}^{pH} = 0.32 \text{ s}^{-1}$ für die schnelle und bei $k_{f2}^{pH} = 0.02 \text{ s}^{-1}$ für die langsame. Im Gegensatz zu den Fluoreszenzkinetiken war bei den CD-Messungen die vollständige Amplitudenänderung erfassbar. Aufgrund der geringen CD-Signale und relativ starken Streuung der Messdaten, ist der Unterschied von ungefähr 20 % in den

Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase als nicht signifikant zu betrachten. Aus der Übereinstimmung der zwei Geschwindigkeitskonstanten, sowohl aus den Fluoreszenz- als auch den CD-Messungen, kann eine Änderung der Sekundärstruktur als Ursache für die beobachtete Totzeitamplitude ausgeschlossen werden. Denkbar wäre hier ein Kollaps des denaturierten Zustandes. Vergleicht man die logarithmierten apparenten Geschwindigkeitskonstanten der zwei Faltungsphasen ausgehend vom sauer- bzw. chemisch-denaturierten Protein miteinander, so liegen diese auf einer Geraden (siehe Abb. 3.20C). Dies spricht dafür, dass die Art der Denaturierung eines Proteins nicht ausschlaggebend für die Faltungsreaktion ist. Bei der Überführung des denaturierten Proteins zu „nativen“ Bedingungen kommt es zu einer Reorganisation der entfalteten Proteinkette und zur Initiierung der Faltungsreaktion.

Die unter 3.3.3 gewonnenen Ergebnisse zur säure-induzierten Entfaltung bei pH 2 in Abwesenheit von Salz zeigen, dass InlB₂₄₁ ein Typ I Protein nach der Klassifizierung von Fink *et al.* ist, und direkt vom nativen (N) in einen säure-denaturierten Zustand (U_A) übergeht (Fink *et al.*, 1994). Solche Beobachtungen konnten z. B. auch bei der β -Lactamase, dem Cytochrom c und der Ribonuklease A gemacht werden (Fink *et al.*, 1994). Die Renaturierung des in pH 2 entfalteten Proteins verläuft über ein kinetisches Intermediat (I_{pH}), während die Denaturierung in pH 2 einer einphasigen Reaktion folgt. Nach Zugabe von moderaten Konzentrationen an NaCl wird eine Kompaktierung des säure-denaturierten Proteins zu einem anderen Zustand (A) beobachtet, was wahrscheinlich aus der Anlagerung von Anionen an die positiv geladenen Gruppen der Aminosäureseitenketten im Protein resultiert (Goto *et al.*, 1990a). Dies bewirkt eine Abschirmung der abstoßenden positiven Ladungen im Protein und eine Ausbildung von hydrophoben Interaktionen. Die Existenz eines hydrophoben Kerns kann durch ANS-Bindung und eine reduzierte Zugänglichkeit gegenüber *quenched* Substanzen nachgewiesen werden. In Gegenwart eines auf die Proteinkonzentration bezogenen 50-molaren Überschuss an ANS, kommt es zu einer Oligomerisierung (bestehend aus ca. 43 Monomereinheiten) des sauer-denaturierten Proteins. Nach längeren Inkubationszeiten in Gegenwart von mehr als 100 mM NaCl kann eine Aggregation beobachtet werden.

Diese Beobachtungen könnten durch das in Abbildung 3.39 dargestellte Minimalmodell zum Faltungsverhalten des InlB₂₄₁ im Säuren beschrieben werden.

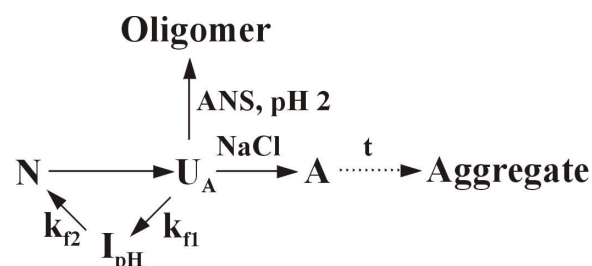


Abb. 3.39: Minimalmodell für das Faltungsverhalten der LRR-Domäne unter sauren Bedingungen

Die Erläuterung der Buchstaben erfolgte im Text. k_{f1} und k_{f2} sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der zwei Phasen während der Faltungsreaktion.

4. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Während bisher die Erforschung der *leucine-rich repeat* Proteine nahezu ausschließlich auf die Untersuchung der Funktion innerhalb der zellulären Prozesse bzw. den Mechanismus der Bindung ausgerichtet war, wurde der Aspekt der generellen Prinzipien der Stabilität und Faltung dieser Proteinklasse vernachlässigt.

In dieser Arbeit wurde die LRR-Domäne (InlB₂₄₁), sowie die sogenannte Internalin-Superdomäne (InlB₃₂₁*) des Invasionsproteins Internalin B des Bakteriums *Listeria monocytogenes* untersucht. Beide Domänen ließen sich rekombinant in *E. coli* in löslicher Form exprimieren. Sie waren aufgrund der spektroskopischen Eigenschaften als nativ gefaltet anzusehen und sollten der biophysikalischen Charakterisierung bezüglich der Stabilität und der Faltungseigenschaften dienen.

Kooperatives Zweizustandsverhalten der Entfaltung der LRR-Domäne

Proteine mit einer *repeat*-reichen Struktur unterscheiden sich von typischen globulären Proteinen darin, dass ihre Tertiärstruktur aus einer regulären und linearen Anordnung von Modulen besteht, die nur über kurzreichende Wechselwirkungen miteinander interagieren. Diese modulare Architektur lässt vermuten, dass auch die Stabilität der LRR-Domäne einen modularen Charakter aufweist, d. h., dass sich die individuellen *repeats* möglicherweise thermodynamisch unabhängig voneinander verhalten und unabhängig von ihren benachbarten *repeats* falten. Dies konnte in einer aktuellen Studie an der Ankyrin-Domäne des Notch Rezeptors gezeigt werden. Die Gesamtstabilität des Proteins setzt sich aus der Summe der Einzelstabilitäten von unterschiedlichen Konstrukten, die sich in der Anzahl der *repeats* unterscheiden, zusammen (Mello & Barrick, 2004). Entgegen der modularen Architektur von LRR-Domänen, kann für die LRR-Domäne des InlB₂₄₁ kein Hinweis auf eine solche modulare Stabilität gefunden werden. Denaturierungsmittelinduzierte Gleichgewichtsübergänge mit einem Mittelpunkt bei 0.7 M GdmCl zeigen, dass diese Domäne eine reversibel und kooperativ faltende Einheit darstellt. Die Signaländerungen, die sowohl in der Fluoreszenz als auch im Fern-UV-CD zu beobachten sind, zeigen einen identischen sigmoidalen Verlauf und erfüllen die Kriterien zur Anwendung eines Zweizustandsmodells der Faltung. Obwohl die thermisch-induzierte Entfaltung nur zu ~60 % reversibel verläuft, kann ein Vergleich der ΔH_{cal} - und $\Delta H_{\text{v.H.}}$ -Werte die Gültigkeit eines Zweizustandsmodells zur Auswertung bekräftigen. Diese Feststellung ist nicht unbedingt selbstverständlich, da die aus sequentiell angeordneten *repeats* bestehende solenoide Tertiärstruktur ohne weitreichende Wechselwirkungen stabilisiert wird. Das Zweizustandsverhalten spricht aber eher für eine langreichende Kooperativität, die sich über die gesamte LRR-Domäne erstreckt. Dies könnte über die konkave Seite der LRR-Domäne erklärt werden, auf welcher es durch die Stapelung der β -Faltblattstränge der einzelnen *repeats* zu einem ausgedehnten β -Faltblatt kommt. In diesem stehen die einzelnen β -Faltblattstränge über Wasserstoffbrückenbindungen mit den benachbarten Strängen in

Wechselwirkung. Es wäre denkbar, dass durch diese weitreichenderen Interaktionen strukturelle Veränderungen, wie z. B. eine Entfaltung, dazu führen würden, dass die einzelnen *repeats* aufgrund der gestörten Wechselwirkungen zwischen den β -Strängen in einem zusammenhängenden Prozess entfalten.

Vergleichbare Beobachtungen in der chemisch-induzierten Entfaltung konnten auch bei Proteinen mit Ankyrin- oder β -Helix-Motiven gemacht werden (Tang *et al.*, 1999; Kamen *et al.*, 2000; Zhang & Peng, 2000; Zweifel & Barrick, 2001a; Zeeb *et al.*, 2002). Das in dieser Arbeit beobachtete hochkooperative Faltungsverhalten der LRR-Domäne des InlB widerspricht aber den Resultaten von artifiziell entworfenen LRR-Proteinen (Stumpp *et al.*, 2003). Diese konzipierten LRR-Proteine bestehen aus drei bis fünf *repeats* und besitzen anstelle der 3_{10} -Helices, wie sie im InlB zu finden sind, α -Helices. Die Konstrukte zeigten zwar ein reversibles Faltungsverhalten, jedoch waren die Änderungen in den Fluoreszenz- und CD-Signalen nicht übereinstimmend und die freie Enthalpie der Entfaltung sowie die Kooperativität der Gleichgewichtsübergänge war signifikant geringer als für globuläre Proteine der gleichen Größe zu erwarten gewesen wäre.

Aufgrund der verschiedenen Hinweise für das Vorliegen eines Zweizustandsmodells ist es auf diese Weise möglich, thermodynamische Parameter zur Beschreibung der Stabilität zu ermitteln. Der sehr hohe Kooperativitätswert des Gleichgewichtsübergangs von $m_{\text{GdmCl}} = 7.4 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ deutet ebenfalls auf ein „Alles-oder-nichts“ Prinzip hin und lässt keine Entfaltung von individuellen *repeats* erkennen. Denn eine individuelle und unabhängige Entfaltung von einzelnen *repeats* sollte in einer eher flachen Übergangskurve resultieren. Die Änderung der Exposition der Proteinoberfläche während der Entfaltung ist im Allgemeinen nicht nur ein Maß für den m -Wert, sondern auch für die Änderung der partiellen molaren Wärmekapazität ΔC_p während der Entfaltung. Bei globulären Proteinen, deren Faltung einem Zweizustandsmodell folgt, kann für diese beiden Parameter beobachtet werden, dass es eine direkte lineare Relation zwischen der Quantität dieser thermodynamischen Parameter und der geschätzten Änderung in der Oberflächenzugänglichkeit während der Entfaltung gibt (Myers *et al.*, 1995). Für InlB₂₄₁ kann ein ΔC_p von $3.51 \pm 0.35 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ bestimmt werden, welcher mit dem aus der Aminosäuresequenz vorhergesagten von $3.31 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ übereinstimmt. Überraschenderweise zeigen die theoretisch berechneten m -Werte für die Denaturierung in GdmCl bzw. Harnstoff in beiden Fällen einen um ungefähr 30 % kleineren Wert, als experimentell beobachtet wird. Elongierte Proteine besitzen im nativen Zustand ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, weswegen während der Entfaltung nur eine kleinere Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit der Oberfläche eintreten sollte. Zu erwarten wäre deswegen ein kleinerer m -Wert. Stabilitätsmessungen der Ankyrin-Domäne des Notch Rezeptors zeigen sowohl im m - als auch im ΔC_p -Wert eine gute Korrelation in Bezug auf die lineare Abhängigkeit von der Proteingröße (Zweifel & Barrick, 2001a).

Die LRR-Domäne hat bei 10 °C und pH 6 ihre maximale Stabilität ($\sim 6 \text{ kcal mol}^{-1}$), was nahe dem berechneten isoelektrischen Punkt liegt. Bei pH 7.5 und 20 °C besitzt das Protein eine freie Stabilisierungsenthalpie von $\Delta G_{U, \text{GdmCl}} = 4.7 \pm 0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Dieser Wert liegt im unteren Stabilitätsbereich, der normalerweise für Proteine dieser Größe erwartet wird. Für andere solenoide Proteine mit sieben vollständigen *repeats*, welche das β -Helix-Faltungsmotiv (Pektat Lyase C) oder Ankyrin *repeats* (Notch Rezeptor) aufweisen, und ebenfalls nach einem Zweizustandsmodell falten, konnten freie Stabilisierungsenthalpien von 12 kcal mol^{-1} (PelC) bzw. $5.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Notch Rezeptor) bestimmt werden (Kamen *et al.*, 2000; Kamen *et al.*, 2001; Zweifel & Barrick, 2001a; Bradley & Barrick, 2002).

Das reversible Faltungsverhalten im Gleichgewicht qualifiziert das InlB₂₄₁ als Modellprotein für die Untersuchung der Stabilität und Faltung einer LRR-Domäne auf der Basis direkter Mutagenesestudien.

Kinetisches Minimalmodell für die Faltung der LRR-Domäne

Entfaltungskinetiken des InlB₂₄₁, gemessen in der Fluoreszenz und im Fern-UV-CD, lassen sich mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion beschreiben und zeigen im untersuchten Denaturierungsmittelbereich eine lineare Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Kinetische Renaturierungsexperimente des InlB₂₄₁ zeigen im Gegensatz zu den Gleichgewichtsübergängen die Existenz eines Intermediates. Unter nativen Bedingungen kann sowohl im Fluoreszenz- als auch im Fern-UV-CD-Signal das Auftreten von zwei kinetischen Faltungsphasen registriert werden. Im Bereich der durchgeführten Messungen und im Rahmen des Messfehlers sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der CD- und Fluoreszenz-Kinetiken identisch. Durch *stopped-flow*-Fluoreszenzmessungen kann bei einer Restkonzentration von 0.1 M GdmCl eine Relaxationszeit von ca. 6 s für die schnelle und von 53 s für die langsame Faltungsphase bestimmt werden. Werden mehrere Faltungsphasen detektiert, so ist dies meist ein Hinweis auf die Existenz von intermediären Zuständen (Ikai & Tanford, 1973; Baldwin, 1996; Wagner & Kiefhaber, 1999; Bieri & Kiefhaber, 2000). In InlB₂₄₁ findet sich keiner der sieben Prolinreste in einer *cis*-Konformation und vorläufige Untersuchungen mittels Doppelsprungexperimenten konnten auch keinen direkten Hinweis auf das Vorliegen einer Isomerisierungsreaktion als Erklärung für die langsame Faltungsphase geben. Mit Sicherheit kann dies jedoch nicht ausgeschlossen werden, so dass *stopped-flow*-Messungen zur Bestätigung noch ausstehen. Man könnte sich vorstellen, dass zu Beginn der Faltung der LRR-Domäne eine Ausbildung individueller *repeats* erfolgt, die schließlich in der elongierten Tertiärstruktur resultiert. Das aus der beobachteten, schnellen Renaturierungsphase abgeleitete kinetische Intermediat kann im Chevronplot bis unmittelbar vor den Übergangsmittelpunkt bei 0.7 M GdmCl detektiert werden, was darauf hindeutet, dass es relativ stabil sein muss. Im Gleichgewichtsübergang kann dieses kinetische Intermediat hingegen nicht beobachtet werden, was dadurch erklärt werden könnte, dass es zu kurzlebig ist, um populiert werden zu können.

In Abbildung 4.1 sind denkbare Minimalmodelle für die Faltung der LRR-Domäne dargestellt, welche die vorläufigen kinetischen Daten beschreiben würden (Baldwin, 1996).

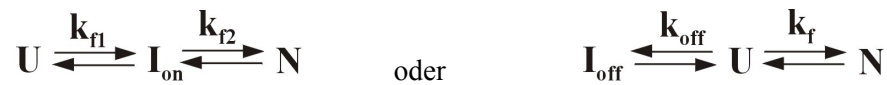


Abb. 4.1: Allgemeine Modelle für die Faltung der LRR-Domäne (modifiziert nach Baldwin (1996)).

U und N stehen für den entfalteten und nativen Zustand, I_{on} und I_{off} für die Population von Intermediaten, die auf (I_{on}) bzw. entgegen (I_{off}) dem Faltungsweg lokalisiert sind. k stellt die apparente Geschwindigkeitskonstante der produktiven (k_f) bzw. der nicht-produktiven (k_{off}) Faltungsrichtung auf dem Weg zum nativen Zustand dar.

Thermodynamik der Entfaltung der Internalin-Superdomäne

In der Kristallstruktur des InlB₃₂₁ wird ein fließender Übergang von der LRR- in die Ig-ähnliche Domäne über einen durchgehenden β -Strang beobachtet und dieser Teil vom InlB wird deshalb in der Gesamtheit als Superdomäne bezeichnet (Schubert *et al.*, 2001). Die Ig-ähnliche Domäne ist für den Prozess der Invasion des InlB nicht notwendig, jedoch bei allen Mitgliedern der Internalin-Familie zu finden (Braun *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2001). Die hoch kooperativen Gleichgewichtsübergänge sowohl im Fluoreszenz- als auch im Fern-UV-CD-Signal bestätigen, dass sich die drei Domänen (N-terminale *Cap*, LRR und Ig-ähnliche) einen gemeinsamen hydrophoben Proteinkern teilen (Schubert *et al.*, 2001). Eine unabhängige Entfaltung der Domänen voneinander kann nicht beobachtet werden. Die Anwesenheit der Ig-ähnlichen Domäne im InlB₃₂₁* resultiert im Gleichgewichtsübergang nahezu in einer Verdopplung der Stabilität gegenüber dem InlB₂₄₁. Es wird für dieses Konstrukt eine freie Stabilisierungsenthalpie von $\Delta G_{U, GdmCl} = 8.8 \pm 0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ bei 20 °C und pH 7.5 bestimmt. Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass der hydrophobe Kern der LRR-Domäne in diesem Konstrukt sowohl N-terminal durch die *Cap*- als auch C-terminal durch die Ig-ähnliche Domäne vom umgebenden hydrophilen Medium abgeschirmt wird. Die LRR-Domäne bildet also mit ihren beiden flankierenden Domänen eine kooperativ faltende Superdomäne, wie dies auch schon auf der Basis der Struktur vorgeschlagen wurde (Schubert *et al.*, 2001). Analog zum InlB₂₄₁ konnte beim InlB₃₂₁* im Vergleich der experimentell bestimmten und berechneten m -Werte eine Diskrepanz von 30 % beobachtet werden (Myers *et al.*, 1995).

Ein dem InlB₃₂₁* entsprechendes Konstrukt aus der Internalinfamilie stellt das InlA₄₉₆ dar (Schubert *et al.*, 2002). Diese verkürzte Variante des wt InlA besitzt in der LRR-Domäne 15 anstelle von 7 *repeats*. Chemisch-induzierte Gleichgewichtsentfaltungen resultieren beim InlA₄₉₆ in einer freien Stabilisierungsenthalpie von $\Delta G_{U, GdmCl} = 24 \text{ kcal mol}^{-1}$ und einer Kooperativität von $m = 14.3 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ bei 20 °C und pH 7 (Lengefeld, 2003). Diese drastische Erhöhung der Stabilität des InlA₄₉₆ ist wahrscheinlich vor allem auf die etwa doppelt so große Anzahl an *repeats* in der LRR-Domäne zurückzuführen. Beim InlA₄₉₆ lag der experimentell ermittelte m -Wert 40 % über dem theoretisch berechneten (Lengefeld, 2003). Dies weist darauf hin, dass die elongierte Form der

LRR-Domäne für diese ungewöhnlich hohen Kooperativitäten während der Faltung verantwortlich sein könnte.

Minimalmodell für das Faltungsverhalten der Internalin-Superdomäne

Eine mögliche Heterogenität in der Entfaltung des InIB₃₂₁* deutet sich in den Denaturierungskinetiken an. Das abknickende Verhalten während der Entfaltung des InIB₃₂₁* im Chevronplot von der ansonsten linearen Abhängigkeit vom Denaturierungsmittel kann durch das eventuelle Auftreten von Intermediaten oder durch eine Kopplung der Denaturierungsreaktion mit einer Prolinisomerisierung erklärt werden. Eine Erhöhung der Temperatur zeigt einen starken Einfluss auf den sehr langsamen Entfaltungsprozess (Halbwertszeit von 1.4 h bei 1.9 M GdmCl), während der zweite schnelle Prozess stärker von der GdmCl-Konzentration abhängig ist. Die Entfernung des Tryptophan 124 aus der LRR-Domäne zeigt keine Veränderung der beobachteten Denaturierung, woraus geschlossen werden könnte, dass die zwei Entfaltungsprozesse nicht aus einer denkbaren parallelen oder sequentiellen Denaturierung der LRR- und Ig-ähnlichen Domäne resultieren. Die identischen Änderungen der Tryptophanfluoreszenz- und Fern-UV-CD-Signale deuten an, dass die Tertiär- und Sekundärstruktur nicht getrennt voneinander entfalten.

Faltungskinetiken der Internalin-Domäne verlaufen biphasisch, was auf die Präsenz eines kinetischen Intermediates auf dem Faltungsweg hindeutet. Im InIB₃₂₁* befindet sich von den insgesamt 14 Prolinresten nur die Bindung zwischen Lysin 280 und Prolin 281 in der *cis*-Konformation. Doppelsprungexperimente die sowohl mit InIB₃₂₁* als auch mit InIB₃₂₁*W124S durchgeführt wurden, zeigen keine Zunahme der langsam faltenden Spezies in Abhängigkeit von der Zeit nach vollständiger Denaturierung. Dies spricht dafür, dass in dem beobachteten Zeitfenster der manuellen Handmischungsexperimente keine *cis-trans*-Prolinisomerisierung beobachtet werden kann. Die bestimmte Aktivierungsenergie von 27 kcal mol⁻¹ für die langsame Phase der Renaturierung liegt höher als die erwartete Aktivierungsenergie von 20 bis 22 kcal mol⁻¹ für solch eine Isomerisierungsreaktion (Balbach & Schmid, 2002). Dies spricht ebenfalls gegen eine Prolinisomerisierung als Erklärung für die langsame Phase und steht somit mit den Beobachtungen der Doppelsprungexperimente im Einklang.

Betrachtet man die Amplituden der zwei Faltungsphasen, so zeigt die schnelle Phase eine minimale Abhängigkeit vom Denaturierungsmittel. Die Summe der relativen Amplitudenanteile der schnellen und langsamen Phase weisen darauf hin, dass während der schnellen Faltungskinetik eine Totzeitamplitude existiert, die auf ein weiteres Intermediat hindeutet. Diese zusätzliche, schnelle Faltungsphase konnte auch nicht in vorläufigen *stopped-flow*-Messungen beobachtet werden. Dies deutet an, dass ein mögliches Intermediat im Submillisekundenbereich auftreten könnte oder ein Kollaps des denaturierten Zustandes erfolgt (Bieri & Kiefhaber, 1999). Nach der Entfernung des Tryptophans aus der LRR-Domäne zeigt sich in den Fluoreszenzkinetiken der Faltungsreaktion zwar die gleiche Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration, jedoch ist bei GdmCl-

Konzentrationen vor dem Übergangsmittelpunkt die Kinetik der Renaturierung um einen Faktor 4 langsamer. Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass beim InlB₃₂₁*W124S nur die Faltung der Ig-ähnlichen Domäne in der Tryptophanfluoreszenz verfolgt wird. Beim InlB₃₂₁* hingegen resultieren die detektierten Fluoreszenzsignale aus zwei Tryptophanresten unterschiedlicher Domänen. Es wäre denkbar, dass das Fluoreszenzsignal vom Tryptophan 124 der LRR-Domäne das des Tryptophan 285 der Ig-ähnlichen Domäne teilweise überlagert.

Abbildung 4.2 zeigt ein mögliches Minimalmodell für die Faltung der Internalin-Superdomäne. Die hierin beschriebenen Intermediate sind in weiteren Arbeiten noch eingehender zu charakterisieren.

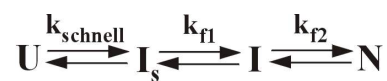


Abb. 4.2: Allgemeines Faltungsmodell für die Internalin-Superdomäne.

U und N stehen für den entfalteten und nativen Zustand, I_s und I für die Population von Intermediaten im Submillisekundenbereich und Sekundenbereich. k bezeichnet die apparente Geschwindigkeitskonstante der Faltung.

Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die LRR-Domäne des InlB sollten es ermöglichen, weitere umfangreiche biophysikalische Charakterisierungen bezüglich der Stabilität und Faltung durchführen zu können.

In der *in vitro* Faltung sowohl bei der LRR- als auch bei der Internalin-Domäne wurde die Existenz von Intermediaten nachgewiesen. Es bleibt zu klären, ob diese Intermediate produktiv und obligatorisch bei der Ausbildung der nativen Struktur sind. Des weiteren konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob während der Faltungsreaktion eine *cis-trans*-Prolinisomerisierung stattfindet. Die Charakterisierung der Natur der Intermediate erfolgt dabei am besten über reverse Doppelsprungexperimente mittels *stopped-flow*-Messungen oder durch die kinetische Untersuchung von Prolinmutanten. Da die Entfaltungskinetik des InlB₃₂₁* auf das Vorliegen einer nicht monoexponentiell verlaufenden Reaktion hindeutet, sollte versucht werden, denkbare Intermediate oder sequentielle Schritte kinetisch zu detektieren und zu charakterisieren.

Es wäre auch interessant zu untersuchen, welche minimale Anzahl an *repeats* nötig ist, um noch eine vollständig gefaltete LRR-Domäne zu erhalten. Dies könnte über Mutagenesestudien erfolgen, wo sukzessive die einzelnen *repeats* vom C-Terminus des InlB₂₄₁ entfernt werden. In dem Zusammenhang könnte auch untersucht werden, ob die Faltung bzw. Entfaltung von einem Ende her oder vom N- und C-Terminus gleichzeitig erfolgt. Dies könnte möglicherweise durch eine Markierung der Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen für Messungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer oder im Einzelmolekülspektroskopieexperiment erfolgen.

5. Literaturverzeichnis

- Agashe, V.R., Shastry, M.C., and Udgaonkar, J.B. (1995) Initial hydrophobic collapse in the folding of barstar. *Nature* **377**: 754-757.
- Andrade, M.A., Perez-Iratxeta, C., and Ponting, C.P. (2001) Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J Struct Biol* **134**: 117-131.
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230.
- Arakawa, T., and Timasheff, S.N. (1982) Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry* **21**: 6545-6552.
- Arakawa, T., and Timasheff, S.N. (1984) Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry* **23**: 5912-5923.
- Bachmann, A., and Kiefhaber, T. (2001) Apparent two-state tendamistat folding is a sequential process along a defined route. *J Mol Biol* **306**: 375-386.
- Baker, D., and Agard, D.A. (1994) Kinetics versus thermodynamics in protein folding. *Biochemistry* **33**: 7505-7509.
- Balbach, J., and Schmid, F.X. (2000) Proline isomerization and its catalysis in protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding*. Pain, R.H. (ed): Oxford University Press, pp. 212-249.
- Baldwin, R.L. (1996) On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Fold Des* **1**: R1-8.
- Baldwin, R.L., and Rose, G.D. (1999a) Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem Sci* **24**: 26-33.
- Baldwin, R.L., and Rose, G.D. (1999b) Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem Sci* **24**: 77-83.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905-920.
- Banerjee, M., Copp, J., Vuga, D., Marino, M., Chapman, T., Van Der Geer, P., and Ghosh, P. (2004) GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are required for potentiation of Met activation. *Mol Microbiol* **52**: 257-271.
- Becktel, W.J., and Schellman, J.A. (1987) Protein stability curves. *Biopolymers* **26**: 1859-1877.
- Bieri, O., and Kiefhaber, T. (1999) Elementary steps in protein folding. *Biol Chem* **380**: 923-929.
- Bieri, O., and Kiefhaber, T. (2000) Kinetic models in protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding*. Pain, R.H. (ed): Oxford University Press, pp. 34-64.
- Bierne, H., Dramsi, S., Gratacap, M.P., Randriamampita, C., Carpenter, G., Payrastra, B., and Cossart, P. (2000) The invasion protein InlB from *Listeria monocytogenes* activates PLC-gamma1 downstream from PI 3-kinase. *Cell Microbiol* **2**: 465-476.
- Bierne, H., and Cossart, P. (2002) InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *J Cell Sci* **115**: 3357-3367.
- Bierne, H., Mazmanian, S.K., Trost, M., Pucciarelli, M.G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Garcia-del Portillo, F., Schneewind, O., and Cossart, P. (2002) Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol Microbiol* **43**: 869-881.
- Bierzynski, A., Kim, P.S., and Baldwin, R.L. (1982) A salt bridge stabilizes the helix formed by isolated C-peptide of RNase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 2470-2474.
- Binz, H.K., Stumpp, M.T., Forrer, P., Amstutz, P., and Pluckthun, A. (2003) Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J Mol Biol* **332**: 489-503.
- Birchmeier, C., and Gherardi, E. (1998) Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* **8**: 404-410.
- Birboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Biron, Z., Khare, S., Samson, A.O., Hayek, Y., Naider, F., and Anglister, J. (2002) A monomeric 3(10)-helix is formed in water by a 13-residue peptide representing the neutralizing determinant of HIV-1 on gp41. *Biochemistry* **41**: 12687-12696.
- Bradley, C.M., and Barrick, D. (2002) Limits of cooperativity in a structurally modular protein: response of the Notch ankyrin domain to analogous alanine substitutions in each repeat. *J Mol Biol* **324**: 373-386.
- Brandts, J.F. (1964) The thermodynamics of protein denaturation. I. The denaturation of chymotrypsinogen. *J Am Chem Soc* **86**: 4291-4301.
- 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.
- Braun, L., Ohayon, H., and Cossart, P. (1998) The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol* **27**: 1077-1087.

- Braun, L., Nato, F., Payraastre, B., Mazie, J.C., and Cossart, P. (1999) The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol Microbiol* **34**: 10-23.
- Braun, L., Ghebrehwet, B., and Cossart, P. (2000) gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **19**: 1458-1466.
- Brockwell, D.J., Smith, D.A., and Radford, S.E. (2000) Protein folding mechanisms: new methods and emerging ideas. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 16-25.
- Buchanan, S.G., and Gay, N.J. (1996) Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **65**: 1-44.
- Burley, S.K., and Petsko, G.A. (1988) Weakly polar interactions in proteins. *Adv Protein Chem* **39**: 125-189.
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., and Cossart, P. (2002) Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol* **10**: 238-245.
- Cameron, L.A., Footer, M.J., van Oudenaarden, A., and Theriot, J.A. (1999) Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4908-4913.
- Camilli, A., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1993) Dual roles of plcA in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol* **8**: 143-157.
- Cammett, T.J., Luo, L., and Peng, Z.Y. (2003) Design and characterization of a hyperstable p16INK4a that restores Cdk4 binding activity when combined with oncogenic mutations. *J Mol Biol* **327**: 285-297.
- 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.
- Chen, B.L., and Schellman, J.A. (1989) Low-temperature unfolding of a mutant of phage T4 lysozyme. 1. Equilibrium studies. *Biochemistry* **28**: 685-691.
- Cheng, H.N., and Bovey, F.A. (1977) Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycyl-L-proline. *Biopolymers* **16**: 1465-1472.
- Copp, J., Marino, M., Banerjee, M., Ghosh, P., and van der Geer, P. (2003) Multiple regions of internalin B contribute to its ability to turn on the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **278**: 7783-7789.
- Cossart, P. (2000) Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell Microbiol* **2**: 195-205.
- Cossart, P. (2001) Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol* **9**: 105-107.
- Cossart, P., Pizarro-Cerda, J., and Lecuit, M. (2003) Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* **13**: 23-31.
- Cossart, P., and Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.
- Cox, R., and Mirkin, S.M. (1997) Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5237-5242.
- Creighton, T.E. (1994) The energetic ups and downs of protein folding. *Nat Struct Biol* **1**: 135-138.
- Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A., and Southwick, F.S. (1990) *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6068-6072.
- Danner, M., Fuchs, A., Miller, S., and Seckler, R. (1993) Folding and assembly of phage P22 tailspike endorhamnosidase lacking the N-terminal, head-binding domain. *Eur J Biochem* **215**: 653-661.
- Danner, M., and Seckler, R. (1993) Mechanism of phage P22 tailspike protein folding mutations. *Protein Sci* **2**: 1869-1881.
- Darby, N., and Creighton, T.E. (1995) Disulfide Bonds in Protein Folding and Stability. In *Protein Stability and Folding: Theory and Practice (Methods in Molecular Biology, Vol. 40)*. Shirley, B.A. (ed): Humana Press Inc., pp. 219-252.
- Deutschman, W.A., and Dahlquist, F.W. (2001) Thermodynamic basis for the increased thermostability of CheY from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **40**: 13107-13113.
- Devi, V.S., Binz, H.K., Stumpp, M.T., Pluckthun, A., Bosshard, H.R., and Jelesarov, I. (2004) Folding of a designed simple ankyrin repeat protein. *Protein Sci* **13**: 2864-2870.
- Di Matteo, A., Federici, L., Mattei, B., Salvi, G., Johnson, K.A., Savino, C., De Lorenzo, G., Tsernoglou, D., and Cervone, F. (2003) The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10124-10128.
- Dill, K.A. (1985) Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry* **24**: 1501-1509.
- Dill, K.A. (1990) The meaning of hydrophobicity. *Science* **250**: 297-298.
- Dill, K.A., and Shortle, D. (1991) Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem* **60**: 795-825.
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wachter, M., Wuenscher, M., and Chakraborty, T. (1992) A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *Embo J* **11**: 1981-1990.

- Dramsi (1995) Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Molecular Microbiology*.
- Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P.L., and Cossart, P. (1997) Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun* **65**: 1615-1625.
- Dubendorff, J.W., and Studier, F.W. (1991a) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* **219**: 45-59.
- Dubendorff, J.W., and Studier, F.W. (1991b) Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. *J Mol Biol* **219**: 61-68.
- Ellis, R.J., and Hartl, F.U. (1999) Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 102-110.
- Ellman, G.L. (1958) A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys* **74**: 443-450.
- Engelbrecht, F., Chun, S.K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., and Sokolovic, Z. (1996) A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol* **21**: 823-837.
- Engelhard, M., and Evans, P.A. (1995) Kinetics of interaction of partially folded proteins with a hydrophobic dye: evidence that molten globule character is maximal in early folding intermediates. *Protein Sci* **4**: 1553-1562.
- Fairbanks, G., Steck, T.L., and Wallach, D.F. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-2617.
- Farber, J.M., and Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* **55**: 476-511.
- Fersht, A.R. (1995) Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10869-10873.
- Fersht, A.R. (1997) Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 3-9.
- Fersht, A.R., and Daggett, V. (2002) Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* **108**: 573-582.
- Fink, A.L., Calciano, L.J., Goto, Y., Kurotsu, T., and Palleros, D.R. (1994) Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. *Biochemistry* **33**: 12504-12511.
- Flaherty, K.M., Zozulya, S., Stryer, L., and McKay, D.B. (1993) Three-dimensional structure of recoverin, a calcium sensor in vision. *Cell* **75**: 709-716.
- Fling, S.P., and Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155**: 83-88.
- Formaggio, F., Crisma, M., Rossi, P., Scrimin, P., Kaptein, B., Broxterman, Q.B., Kamphuis, J., and Toniolo, C. (2000) The first water-soluble 3(10)-helical peptides. *Chemistry* **6**: 4498-4504.
- Forrer, P., Binz, H.K., Stumpp, M.T., and Pluckthun, A. (2004) Consensus design of repeat proteins. *ChemBiochem* **5**: 183-189.
- Fowler, S.B., and Clarke, J. (2001) Mapping the folding pathway of an immunoglobulin domain: structural detail from Phi value analysis and movement of the transition state. *Structure (Camb)* **9**: 355-366.
- Fuchs, A., Seiderer, C., and Seckler, R. (1991) In vitro folding pathway of phage P22 tailspike protein. *Biochemistry* **30**: 6598-6604.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**: 1127-1141.
- Gaillard, J.L., Jaubert, F., and Berche, P. (1996) The inlAB locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes in vivo. *J Exp Med* **183**: 359-369.
- Galan, J.E. (2000) Alternative strategies for becoming an insider: lessons from the bacterial world. *Cell* **103**: 363-366.
- Garandeau, C., Reglier-Poupet, H., Dubail, I., Beretti, J.L., Berche, P., and Charbit, A. (2002) The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence. *Infect Immun* **70**: 1382-1390.
- Gast, K., Nöppert, A., Müller-Frohne, M., Zirwer, D., and Damaschun, G. (1997) Stopped-flow dynamic light scattering as a method to monitor compaction during protein folding. *Eur Biophys J* **25**: 211-219.
- Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (2000) Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**: 999-1003.
- Geiger, B., and Ayalon, O. (1992) Cadherins. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 307-332.
- Gellin, B.G., and Broome, C.V. (1989) Listeriosis. *Jama* **261**: 1313-1320.
- Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P. (1987) Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **55**: 1641-1646.
- Gerbal, F., Chaikin, P., Rabin, Y., and Prost, J. (2000) An elastic analysis of *Listeria monocytogenes* propulsion. *Biophys J* **79**: 2259-2275.

- Ghebrehiwet, B., Lim, B.L., Peerschke, E.I., Willis, A.C., and Reid, K.B. (1994) Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q. *J Exp Med* **179**: 1809-1821.
- Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319-326.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.D., Fsihi, H., Portillo, F.G., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J.C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-852.
- Glomski, I.J., Gedde, M.M., Tsang, A.W., Swanson, J.A., and Portnoy, D.A. (2002) The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J Cell Biol* **156**: 1029-1038.
- Goto, Y., Calciano, L.J., and Fink, A.L. (1990a) Acid-induced folding of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 573-577.
- Goto, Y., Takahashi, N., and Fink, A.L. (1990b) Mechanism of acid-induced folding of proteins. *Biochemistry* **29**: 3480-3488.
- 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.
- Greenfield, N.J. (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem* **235**: 1-10.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K.S., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M., and Kuhn, M. (1998) Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun* **66**: 5260-5267.
- Groves, M.R., and Barford, D. (1999) Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 383-389.
- Hallerbach, B., and Hinz, H.-J. (1999) Protein heat capacity: inconsistencies in the current view of cold denaturation. *Biophys Chem* **76**: 219-227.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Harpaz, Y., and Chothia, C. (1994) Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J Mol Biol* **238**: 528-539.
- Harrison, S.C., and Durbine, R. (1985) Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4028-4030.
- Hartman, A.B., Venkatesan, M., Oaks, E.V., and Buysse, J.M. (1990) Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, ipaH, of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* **172**: 1905-1915.
- Heringa, J. (1998) Detection of internal repeats: how common are they? *Curr Opin Struct Biol* **8**: 338-345.
- Heukeshoven, J., and Dernick, R. (1985) Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **326**: 91-101.
- Hollien, J., and Marqusee, S. (1999a) Structural distribution of stability in a thermophilic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13674-13678.
- Hollien, J., and Marqusee, S. (1999b) A thermodynamic comparison of mesophilic and thermophilic ribonucleases H. *Biochemistry* **38**: 3831-3836.
- Huizinga, E.G., Tsuji, S., Romijn, R.A., Schiphorst, M.E., de Groot, P.G., Sixma, J.J., and Gros, P. (2002) Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science* **297**: 1176-1179.
- Ikai, A., and Tanford, C. (1971) Kinetic evidence for incorrectly folded intermediate states in the refolding of denatured proteins. *Nature* **230**: 100-102.
- Ikai, A., and Tanford, C. (1973) Kinetics of unfolding and refolding of proteins. I. Mathematical analysis. *J Mol Biol* **73**: 145-163.
- Ireton, K., Payrastra, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M., and Cossart, P. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* **274**: 780-782.
- Ireton, K., and Cossart, P. (1997) Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annu Rev Genet* **31**: 113-138.
- Ireton, K., Payrastra, B., and Cossart, P. (1999) The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **274**: 17025-17032.

- Itzhaki, L.S., Otzen, D.E., and Fersht, A.R. (1995) The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. *J Mol Biol* **254**: 260-288.
- Jackson, S.E., and Fersht, A.R. (1991) Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition. *Biochemistry* **30**: 10428-10435.
- Jackson, S.E. (1998) How do small single-domain proteins fold? *Fold Des* **3**: R81-91.
- Jaenicke, R. (1987) Folding and association of proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **49**: 117-237.
- Jaenicke, R. (1991) Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry* **30**: 3147-3161.
- Jaenicke, R., and Buchner, J. (1993) From unboiling of an egg to catalysis of folding. *Chemtracts: Biochem. and Mol. Biol.* **4**: 1-30.
- Jaenicke, R. (1996) Protein folding and association: in vitro studies for self-organization and targeting in the cell. *Curr Top Cell Regul* **34**: 209-314.
- Jaenicke, R., and Seckler, R. (1997) Protein misassembly in vitro. *Adv Protein Chem* **50**: 1-59.
- Jeng, M.F., Englander, S.W., Elove, G.A., Wand, A.J., and Roder, H. (1990) Structural description of acid-denatured cytochrome c by hydrogen exchange and 2D NMR. *Biochemistry* **29**: 10433-10437.
- Johnson, W.C. (1999) Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* **35**: 307-312.
- Johnson, W.C., Jr. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* **7**: 205-214.
- Jones, D.A., and Jones, J.D.G. (1997) The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Adv Bot Res* **24**: 89-167.
- Jonquieres, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., and Cossart, P. (1999) Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **34**: 902-914.
- Jonquieres, R., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2001) Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **42**: 955-965.
- Junttila, J.R., Niemela, S.I., and Hirn, J. (1988) Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J Appl Bacteriol* **65**: 321-327.
- Kabsch, W., and Sander, C. (1983) How good are predictions of protein secondary structure? *FEBS Lett* **155**: 179-182.
- Kabsch, W., and Sander, C. (1984) On the use of sequence homologies to predict protein structure: identical pentapeptides can have completely different conformations. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1075-1078.
- Kajava (1998) Structural diversity of Leucine-rich repeat proteins. *Journal of molecular Biology*.
- Kajava, A.V., Vassart, G., and Wodak, S.J. (1995) Modeling of the three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure* **3**: 867-877.
- Kajava, A.V. (2002) What curves alpha-solenoids? Evidence for an alpha-helical toroid structure of Rpn1 and Rpn2 proteins of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* **277**: 49791-49798.
- Kamen, D.E., Griko, Y., and Woody, R.W. (2000) The stability, structural organization, and denaturation of pectate lyase C, a parallel beta-helix protein. *Biochemistry* **39**: 15932-15943.
- Kamen, D.E., and Woody, R.W. (2001) A partially folded intermediate conformation is induced in pectate lyase C by the addition of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS). *Protein Sci* **10**: 2123-2130.
- Kamen, D.E., and Woody, R.W. (2002a) Identification of proline residues responsible for the slow folding kinetics in pectate lyase C by mutagenesis. *Biochemistry* **41**: 4724-4732.
- Kamen, D.E., and Woody, R.W. (2002b) Folding kinetics of the protein pectate lyase C reveal fast-forming intermediates and slow proline isomerization. *Biochemistry* **41**: 4713-4723.
- Karplus, M., and Weaver, D.L. (1994) Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data. *Protein Sci* **3**: 650-668.
- Kataoka, M., and Goto, Y. (1996) X-ray solution scattering studies of protein folding. *Fold Des* **1**: R107-114.
- Kelley, A.M., Michalet, X., and Weiss, S. (2001) Chemical physics. Single-molecule spectroscopy comes of age. *Science* **292**: 1671-1672.
- Kelly, S.M., and Price, N.C. (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* **1**: 349-384.
- Kemler, R. (1993) From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* **9**: 317-321.
- Khyse-Andersen, J. (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-209.
- Kiefhaber, T., Grunert, H.P., Hahn, U., and Schmid, F.X. (1992) Folding of RNase T1 is decelerated by a specific tertiary contact in a folding intermediate. *Proteins* **12**: 171-179.
- 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, P.S., and Baldwin, R.L. (1982) Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu Rev Biochem* **51**: 459-489.
- Kim, P.S., and Baldwin, R.L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem* **59**: 631-660.
- King, J., and Laemmli, U.K. (1971) Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol* **62**: 465-477.
- King, S.M., and Johnson, W.C. (1999) Assigning secondary structure from protein coordinate data. *Proteins* **35**: 313-320.
- Kirk, W.R., Kurian, E., and Prendergast, F.G. (1996) Characterization of the sources of protein-ligand affinity: 1-sulfonato-8-(1')anilinonaphthalene binding to intestinal fatty acid binding protein. *Biophys J* **70**: 69-83.
- Klink, T.A., Vicentini, A.M., Hofsteenge, J., and Raines, R.T. (2001) High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein Expr Purif* **22**: 174-179.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1993a) Crystallization and preliminary X-ray analysis of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *J Mol Biol* **231**: 137-140.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1993b) Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature* **366**: 751-756.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1995a) A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* **374**: 183-186.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1995b) Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol* **5**: 409-416.
- Kobe, B., and Kajava, A.V. (2000) When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends Biochem Sci* **25**: 509-515.
- Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 725-732.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1992) L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* **68**: 521-531.
- Kohl, A., Binz, H.K., Forrer, P., Stumpp, M.T., Pluckthun, A., and Grutter, M.G. (2003) Designed to be stable: crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1700-1705.
- Kohlhoff, M., Dahm, A., and Hensel, R. (1996) Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Lett* **383**: 245-250.
- Koradi, R., Billeter, M., and Wuthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* **14**: 51-55, 29-32.
- Kumar, S., Tsai, C.J., and Nussinov, R. (2001) Thermodynamic differences among homologous thermophilic and mesophilic proteins. *Biochemistry* **40**: 14152-14165.
- Kuwajima, K. (1996) The molten globule state of alpha-lactalbumin. *Faseb J* **10**: 102-109.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., and Cossart, P. (1997) Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* **65**: 5309-5319.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B., and Cossart, P. (1999) A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **18**: 3956-3963.
- Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., and Cossart, P. (2001) A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* **292**: 1722-1725.
- Lecuit, M., and Cossart, P. (2002) Genetically-modified-animal models for human infections: the *Listeria* paradigm. *Trends Mol Med* **8**: 537-542.
- Lee, F.S., and Vallee, B.L. (1993) Structure and action of mammalian ribonuclease (angiogenin) inhibitor. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **44**: 1-30.
- Leimeister-Wachter, M., and Chakraborty, T. (1989) Detection of listeriolysin, the thiol-dependent hemolysin in *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri*. *Infect Immun* **57**: 2350-2357.
- Leimeister-Wachter, M., Domann, E., and Chakraborty, T. (1991) Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **5**: 361-366.
- Lengefeld, J. (2003) Stabilität, Faltung und Struktur von Internalin. Diplomarbeit, Universität Potsdam.
- Leung, K.Y., and Straley, S.C. (1989) The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J Bacteriol* **171**: 4623-4632.
- Levinthal, C. (1968) Are there pathways of folding. *J Chim Phys*: 44-45.
- Lewit-Bentley, A., and Rety, S. (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 637-643.
- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1995) Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun* **63**: 3896-3903.

- Lipman, E.A., Schuler, B., Bakajin, O., and Eaton, W.A. (2003) Single-molecule measurement of protein folding kinetics. *Science* **301**: 1233-1235.
- Livingstone, J.R., Spolar, R.S., and Record, M.T., Jr. (1991) Contribution to the thermodynamics of protein folding from the reduction in water-accessible nonpolar surface area. *Biochemistry* **30**: 4237-4244.
- Lorber, B. (1997) Listeriosis. *Clin Infect Dis* **24**: 1-9; quiz 10-11.
- Machner, M.P., Frese, S., Schubert, W.D., Orian-Rousseau, V., Gherardi, E., Wehland, J., Niemann, H.H., and Heinz, D.W. (2003) Aromatic amino acids at the surface of InlB are essential for host cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **48**: 1525-1536.
- Main, E.R., Jackson, S.E., and Regan, L. (2003a) The folding and design of repeat proteins: reaching a consensus. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 482-489.
- Main, E.R., Xiong, Y., Cocco, M.J., D'Andrea, L., and Regan, L. (2003b) Design of stable alpha-helical arrays from an idealized TPR motif. *Structure (Camb)* **11**: 497-508.
- Makhatadze, G.I., and Privalov, P.L. (1995) Energetics of protein structure. *Adv Protein Chem* **47**: 307-425.
- Marcotte, E.M., Pellegrini, M., Yeates, T.O., and Eisenberg, D. (1999) A Census of Protein Repeats. *JMB* **293**: 151-160.
- Marino, M., Braun, L., Cossart, P., and Ghosh, P. (1999) Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Mol Cell* **4**: 1063-1072.
- Marino, M., Banerjee, M., Jonquieres, R., Cossart, P., and Ghosh, P. (2002) GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *Embo J* **21**: 5623-5634.
- Marino, M., Banerjee, M., Copp, J., Dramsi, S., Chapman, T., van der Geer, P., Cossart, P., and Ghosh, P. (2004) Characterization of the calcium-binding sites of *Listeria monocytogenes* InlB. *Biochem Biophys Res Commun* **316**: 379-386.
- Matheson, R.R., and Scheraga, H.A. (1978) A Method for Predicting Nucleation Sites for Protein Folding Based on Hydrophobic Contacts. *Macromolecules* **11**: 819-829.
- Mello, C.C., and Barrick, D. (2004) An experimentally determined protein folding energy landscape. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14102-14107.
- Mengaud, J., Lecuit, M., Lebrun, M., Nato, F., Mazie, J.C., and Cossart, P. (1996) Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect Immun* **64**: 5430-5433.
- Miao, E.A., Scherer, C.A., Tsolis, R.M., Kingsley, R.A., Adams, L.G., Baumler, A.J., and Miller, S.I. (1999) *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* **34**: 850-864.
- Miller, S., Schuler, B., and Seckler, R. (1998) A reversibly unfolding fragment of P22 tailspike protein with native structure: the isolated beta-helix domain. *Biochemistry* **37**: 9160-9168.
- Mogilner, A., and Oster, G. (1996) Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J* **71**: 3030-3045.
- Mosavi, L.K., Minor, D.L., Jr., and Peng, Z.Y. (2002a) Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16029-16034.
- Mosavi, L.K., Williams, S., and Peng Zy, Z.Y. (2002b) Equilibrium folding and stability of myotrophin: a model ankyrin repeat protein. *J Mol Biol* **320**: 165-170.
- Myers, J.K., Pace, C.N., and Scholtz, J.M. (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* **4**: 2138-2148.
- Navarre, W.W., and Schneewind, O. (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 174-229.
- Neira, J.L., Davis, B., Ladurner, A.G., Buckle, A.M., Gay Gde, P., and Fersht, A.R. (1996) Towards the complete structural characterization of a protein folding pathway: the structures of the denatured, transition and native states for the association/folding of two complementary fragments of cleaved chymotrypsin inhibitor 2. Direct evidence for a nucleation-condensation mechanism. *Fold Des* **1**: 189-208.
- Nicholson, E.M., and Scholtz, J.M. (1996) Conformational stability of the *Escherichia coli* HPr protein: test of the linear extrapolation method and a thermodynamic characterization of cold denaturation. *Biochemistry* **35**: 11369-11378.
- 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.
- Otzen, D.E., Itzhaki, L.S., elMasry, N.F., Jackson, S.E., and Fersht, A.R. (1994) Structure of the transition state for the folding/unfolding of the barley chymotrypsin inhibitor 2 and its implications for mechanisms of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10422-10425.
- Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* **131**: 266-280.
- Pace, C.N. (1990) Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotechnol* **8**: 93-98.

- Pace, C.N., Heinemann, U., Hahn, U., and Saenger, W. (1991) Ribonuklease T1: Struktur, Funktion und Stabilität. *Angewandte Chemie* **103**: 351-369.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**: 2411-2423.
- Pace, C.N., and Shaw, K.L. (2000) Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins Suppl* **4**: 1-7.
- Pace, N.C., and Tanford, C. (1968) Thermodynamics of the unfolding of beta-lactoglobulin A in aqueous urea solutions between 5 and 55 degrees. *Biochemistry* **7**: 198-208.
- Papageorgiou, A.C., Shapiro, R., and Acharya, K.R. (1997) Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor--an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *Embo J* **16**: 5162-5177.
- 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.
- Parida, S.K., Domann, E., Rohde, M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1998) Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol* **28**: 81-93.
- Pendaries, C., Tronchere, H., Plantavid, M., and Payrastré, B. (2003) Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Lett* **546**: 25-31.
- Pengo, P., Pasquato, L., Moro, S., Brigo, A., Fogolari, F., Broxterman, Q.B., Kaptein, B., and Scrimin, P. (2003) Quantitative correlation of solvent polarity with the alpha-3(10)-helix equilibrium: a heptapeptide behaves as a solvent-driven molecular spring. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 3388-3392.
- Pfeil, W., and Privalov, P.L. (1976a) Thermodynamic investigations of proteins. I. Standard functions for proteins with lysozyme as an example. *Biophys Chem* **4**: 23-32.
- Pfeil, W., and Privalov, P.L. (1976b) Thermodynamic investigations of proteins. II. Calorimetric study of lysozyme denaturation by guanidine hydrochloride. *Biophys Chem* **4**: 33-40.
- Pfeil, W., and Privalov, P.L. (1976c) Thermodynamic investigations of proteins. III. Thermodynamic description of lysozyme. *Biophys Chem* **4**: 41-50.
- Pfeil, W., Bychkova, V.E., and Ptitsyn, O.B. (1986) Physical nature of the phase transition in globular proteins. Calorimetric study of human alpha-lactalbumin. *FEBS Lett* **198**: 287-291.
- Pfeil, W. (1998a) Stability and co-operative properties of partially folded proteins. *Biochemistry (Mosc)* **63**: 294-302.
- Pfeil, W. (1998b) Is the molten globule a third thermodynamic state of protein? The example of alpha-lactalbumin. *Proteins* **30**: 43-48.
- Pfeil, W. (2001) *Protein stability and folding: a collection of thermodynamic data*. Berlin ; New York: Springer.
- Price, S.R., Evans, P.R., and Nagai, K. (1998) Crystal structure of the spliceosomal U2B''-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature* **394**: 645-650.
- Privalov, P.L., and Khechinashvili, N.N. (1974) A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J Mol Biol* **86**: 665-684.
- Privalov, P.L. (1979) Stability of proteins: small globular proteins. *Adv Protein Chem* **33**: 167-241.
- Privalov, P.L. (1982) Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv Protein Chem* **35**: 1-104.
- Privalov, P.L., Griko Yu, V., Venyaminov, S., and Kutysenko, V.P. (1986) Cold denaturation of myoglobin. *J Mol Biol* **190**: 487-498.
- Privalov, P.L., and Gill, S.J. (1988) Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv Protein Chem* **39**: 191-234.
- Privalov, P.L. (1990) Cold denaturation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**: 281-305.
- Provencher, S.W., and Glockner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**: 33-37.
- Ptitsyn, O.B., and Rashin, A.A. (1975) A model of myoglobin self-organization. *Biophys Chem* **3**: 1-20.
- Ptitsyn, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zerovnik, E., and Razgulyaev, O.I. (1990) Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett* **262**: 20-24.
- Ptitsyn, O.B. (1991) How does protein synthesis give rise to the 3D-structure? *FEBS Lett* **285**: 176-181.
- Radford, S.E. (2000) Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* **25**: 611-618.
- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., Kaufmann, S.H., and Goebel, W. (1998) The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet* **260**: 144-158.
- Rees, D.C., and Robertson, A.D. (2001) Some thermodynamic implications for the thermostability of proteins. *Protein Sci* **10**: 1187-1194.
- Robertson, A.D., and Murphy, K.P. (1997) Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chem Rev* **97**: 1251-1268.
- Rocourt, J. (1988) Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection* **16 Suppl 2**: S89-91.

- Roder, H., Maki, K., Cheng, H., and Shastry, M.C. (2004) Rapid mixing methods for exploring the kinetics of protein folding. *Methods* **34**: 15-27.
- Rusnati, M., and Presta, M. (1996) Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparan sulfate proteoglycans. Biological implications in neovascularization. *Int J Clin Lab Res* **26**: 15-23.
- Russo, A.T., Rosgen, J., and Bolen, D.W. (2003) Osmolyte effects on kinetics of FKBP12 C22A folding coupled with prolyl isomerization. *J Mol Biol* **330**: 851-866.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, I.E., and Kiefhaber, T. (2003a) Origin of unusual phi-values in protein folding: evidence against specific nucleation sites. *J Mol Biol* **334**: 1077-1085.
- Sanchez, I.E., and Kiefhaber, T. (2003b) Hammond behavior versus ground state effects in protein folding: evidence for narrow free energy barriers and residual structure in unfolded states. *J Mol Biol* **327**: 867-884.
- Sanchez, I.E., and Kiefhaber, T. (2003c) Non-linear rate-equilibrium free energy relationships and Hammond behavior in protein folding. *Biophys Chem* **100**: 397-407.
- Sanchez, I.E., and Kiefhaber, T. (2003d) Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding. *J Mol Biol* **325**: 367-376.
- Sanger, J.M., Sanger, J.W., and Southwick, F.S. (1992) Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **60**: 3609-3619.
- 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.
- Schellman, J.A., Lindorfer, M., Hawkes, R., and Grutter, M. (1981) Mutations and protein stability. *Biopolymers* **20**: 1989-1999.
- Schlech, W.F., 3rd (2000) Foodborne listeriosis. *Clin Infect Dis* **31**: 770-775.
- Schmid, F.X. (1986) Fast-folding and slow-folding forms of unfolded proteins. *Methods Enzymol* **131**: 70-82.
- Schmid, F.X. (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure: A Practical Approach*. Creighton, T.E. (ed): Oxford University Press, pp. 261-296.
- Schubert, W.D., Gobel, G., Diepholz, M., Darji, A., Kloer, D., Hain, T., Chakraborty, T., Wehland, J., Domann, E., and Heinz, D.W. (2001) Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J Mol Biol* **312**: 783-794.
- Schubert, W.D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M.P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T., and Heinz, D.W. (2002) Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* **111**: 825-836.
- Schubert, W.D., and Heinz, D.W. (2003) Structural Aspects of Adhesion to and Invasion of Host Cells by the Human Pathogen *Listeria monocytogenes*. *Chembiochem* **4**: 1285-1291.
- Schuler, B., Lipman, E.A., and Eaton, W.A. (2002) Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature* **419**: 743-747.
- Sedgwick, S.G., and Smerdon, S.J. (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci* **24**: 311-316.
- Seeliger, H.P. (1984) Modern taxonomy of the *Listeria* group relationship to its pathogenicity. *Clin Invest Med* **7**: 217-221.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501-510.
- Shoemaker, K.R., Kim, P.S., Brems, D.N., Marqusee, S., York, E.J., Chaiken, I.M., Stewart, J.M., and Baldwin, R.L. (1985) Nature of the charged-group effect on the stability of the C-peptide helix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 2349-2353.
- Shortle, D. (1996) The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *Faseb J* **10**: 27-34.
- Silow, M., and Oliveberg, M. (1997) High-energy channeling in protein folding. *Biochemistry* **36**: 7633-7637.
- Slavik, J. (1982) Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim Biophys Acta* **694**: 1-25.
- Smith, L.J., Fiebig, K.M., Schwalbe, H., and Dobson, C.M. (1996) The concept of a random coil. Residual structure in peptides and denatured proteins. *Fold Des* **1**: R95-106.
- Spolar, R.S., Livingstone, J.R., and Record, M.T., Jr. (1992) Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surface from water. *Biochemistry* **31**: 3947-3955.
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., and Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal Biochem* **287**: 243-251.

- Sreerama, N., and Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**: 252-260.
- Sreerama, N., and Woody, R.W. (2004) Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol* **383**: 318-351.
- Stella, M.C., and Comoglio, P.M. (1999) HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 1357-1362.
- Stryer, L. (1965) The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J Mol Biol* **13**: 482-495.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Stumpp, M.T., Forrer, P., Binz, H.K., and Pluckthun, A. (2003) Designing repeat proteins: modular leucine-rich repeat protein libraries based on the mammalian ribonuclease inhibitor family. *J Mol Biol* **332**: 471-487.
- Sudha, T.S., Vijayakumar, E.K., and Balaram, P. (1983) Circular dichroism studies of helical oligopeptides. Can 3(10) and alpha-helical conformations be chiroptically distinguished? *Int J Pept Protein Res* **22**: 464-468.
- Takeichi, M. (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* **59**: 237-252.
- Tanford, C. (1962) The interpretation of hydrogen ion titration curves of proteins. *Adv Protein Chem* **17**: 69-165.
- 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.
- Tanford, C., Aune, K.C., and Ikai, A. (1973) Kinetics of unfolding and refolding of proteins. 3. Results for lysozyme. *J Mol Biol* **73**: 185-197.
- Tang, K.S., Guralnick, B.J., Wang, W.K., Fersht, A.R., and Itzhaki, L.S. (1999) Stability and folding of the tumour suppressor protein p16. *J Mol Biol* **285**: 1869-1886.
- Tang, K.S., Fersht, A.R., and Itzhaki, L.S. (2003) Sequential Unfolding of Ankyrin Repeats in Tumor Suppressor p16. *Structure (Camb)* **11**: 67-73.
- Teale, F.W. (1960) The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution. *Biochem J* **76**: 381-388.
- Thomas, A., Meurisse, R., Charloteaux, B., and Brasseur, R. (2002) Aromatic side-chain interactions in proteins. I. Main structural features. *Proteins* **48**: 628-634.
- Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **109**: 1597-1608.
- Toniolo, C., Polese, A., Formaggio, F., Crisma, M., and Kamphuis, J. (1996) Circular Dichroism Spectrum of a Peptide 3₁₀-Helix. *J Am Chem Soc* **118**: 2744-2745.
- Toniolo, C., Formaggio, F., Tognon, S., Broxterman, Q.B., Kaptein, B., Huang, R., Setnicka, V., Keiderling, T.A., McColl, I.H., Hecht, L., and Barron, L.D. (2004) The complete chiro-spectroscopic signature of the peptide 3(10)-helix in aqueous solution. *Biopolymers* **75**: 32-45.
- Tsong, T.Y., Baldwin, R.L., and Elson, E.L. (1971) The sequential unfolding of ribonuclease A: detection of a fast initial phase in the kinetics of unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 2712-2715.
- 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.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., and Verbrugh, H. (1998) Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 275-293.
- Wagner, C., and Kiefhaber, T. (1999) Intermediates can accelerate protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6716-6721.
- Walter, M. (2002) Die parallele β -Helix der Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis*: Stabilität, Faltungsmechanismus und Faltungsmutanten. Doktorarbeit, Universität Potsdam.
- Weiner, M.P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B., and Vaillancourt, P. (1994). *Strategies* **7**: 41-43.
- Wintrode, P.L., Makhatadze, G.I., and Privalov, P.L. (1994) Thermodynamics of ubiquitin unfolding. *Proteins* **18**: 246-253.
- Woody, R.W., and Dunker, A.K. (1996) Aromatic and Cystine Side-Chain CD in Proteins. In *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Fasman, G.D. (ed). New York: Plenum Press, pp. 109-157.
- Wright, C.F., Lindorff-Larsen, K., Randles, L.G., and Clarke, J. (2003) Parallel protein-unfolding pathways revealed and mapped. *Nat Struct Biol* **10**: 658-662.
- Yadav, S., and Ahmad, F. (2000) A new method for the determination of stability parameters of proteins from their heat-induced denaturation curves. *Anal Biochem* **283**: 207-213.

- Yap, A.S., Briher, W.M., and Gumbiner, B.M. (1997) Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 119-146.
- Yu, Y., Makhatadze, G.I., Pace, C.N., and Privalov, P.L. (1994) Energetics of ribonuclease T1 structure. *Biochemistry* **33**: 3312-3319.
- Zeeb, M., Rosner, H., Zeslawski, W., Canet, D., Holak, T.A., and Balbach, J. (2002) Protein folding and stability of human CDK inhibitor p19(INK4d). *J Mol Biol* **315**: 447-457.
- Zhang, H., Seabra, M.C., and Deisenhofer, J. (2000) Crystal structure of Rab geranylgeranyltransferase at 2.0 Å resolution. *Structure Fold Des* **8**: 241-251.
- Zweifel, M.E., and Barrick, D. (2001a) Studies of the ankyrin repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch receptor. 2. Solution stability and cooperativity of unfolding. *Biochemistry* **40**: 14357-14367.
- Zweifel, M.E., and Barrick, D. (2001b) Studies of the ankyrin repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch receptor. 1. Solution conformational and hydrodynamic properties. *Biochemistry* **40**: 14344-14356.

Aminosäuresequenz der Internalin B-Konstrukte

```

30  GPLGSETITV PTPIKQIFSD DAFAETIKDN LKKKSVTDAV TQNELNSIDQ
                                           InlB321*W124 Trp->Ser
                                           ↓
81  IIANNSDIKS VQGIQYLPNV TKLFLNGNKL TDIKPLANLK NLGWLFLDEN

131  KVKDLSSLKD LKKLKSLSE HNGISDINGL VHLPQLESLY LGNNKITDIT

181  VLSRLTKLDT LSLEDNQISD IVPLAGLTKL QNLYLSKNHI SDLRALAGLK
      Stop InlB241           Stop InlB248
      ↓                   ↓
231  NLDVLELFSQ ECLNKPINHQ SNLVVPNTVK NTDGSLVTPE IISDDGDYEK
      Cys->Ser InlB321*
281  PNVKWHLPEF TNEVSFIFYQ PVTIGKAKAR FHGRVTQPLK E
                                           ↑
                                           Stop InlB321
                                           Stop InlB321*

```

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der Internalin-Superdomäne. Die N-terminale Signalsequenz (1-34) ist nicht mit aufgeführt. Die in grau unterlegten ersten fünf Aminosäuren resultieren von der Klonierung aus dem Linker zwischen dem GST und dem Internalin B. Die letzte C-terminale Aminosäure des jeweiligen Konstruktes ist mit einem Pfeil markiert. Die gegen Serin ausgetauschten Aminosäuren Tryptophan 124 (W124) bzw. Cystein 242 (C242) sind in rot dargestellt. In blau sind die in der Fünffachmutante zusätzlich zum W124 gegen Serin ausgetauschten aromatischen Aminosäuren markiert.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren und mir mit Tipps und Tricks während der letzten Jahre hilfreich zur Seite gestanden haben.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Robert Seckler danke ich, dass er mir die Chance gegeben hat in seiner Gruppe zu arbeiten und viel von ihm über das große und weite Gebiet der Proteinfaltung zu lernen. Ich danke ihm für die zahlreichen Ratschläge und Anregungen, wenn es um die Diskussion von Ergebnissen oder messtechnischen Fragestellungen ging und dass er mir immer, auch wenn die Zeit mal knapp war, mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Dirk Heinz, Dr. Wolf-Dieter Schubert und Dr. Matthias Machner an der GBF in Braunschweig für die gute Zusammenarbeit und die Überlassung der diversen Internalin B-Konstrukte bedanken.

Ein ganz großer und besonderer Dank an Prof. Dr. Wolfgang Pfeil für die Einführung in die Kalorimetrie und die Hilfe bei all den DSC-Messungen (besonders den vielen Pufferläufen und Waschprozeduren) und seine Diskussionsbereitschaft. Ich danke Ihm, für die Zeit die er sich genommen hat, um alle meine vielen Fragen zu beantworten.

Vielen Dank an Ben, Uli und Moni für die vielen Anregungen, Kommentare und Tipps und für das Korrekturlesen aus der Schweiz, dem fernen Amerika und Regensburg.

Überhaupt möchte ich allen Mitgliedern der „Secklerei“ (inklusive der Schweizer Fraktion), also Anaït, Andreas, Antje, Anja, Anwar, Armin, meinem Zimmerkumpanen Ben *aka* Kuni, Ben, Christof, Christian, Frank, Jan, Jana, Jeannette, Karolin, Klaus, Mandy, Marion, Moni, Peter, Prof. Pfeil, Steffi und Steffi, Sonja, Sweta und Uli für die gute Zusammenarbeit, das freundliche und harmonische Arbeitsklima, die schöne Zeit, das Korrekturlesen und einfach alles danken.

Fr. Dr. Sophie Haebel vom Interdisziplinären Zentrum für Massenspektrometrie von Biopolymeren (Uni Potsdam) danke ich für die Anfertigung der Massenspektren.

Antje Völkel aus der AG Cölfen (MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung) danke ich für die UZ-Messungen.

Dr. Klaus Gast (MDC Berlin-Buch/Uni Potsdam) danke ich, dass er die Lichtstreuungsmessungen noch kurz vor dem Umzug nach Potsdam durchgeführt hat.

Mein Dank gilt schließlich meinen Eltern (besonders meiner Mutter) und meinem Bruder Robert, die mich moralisch, finanziell und überhaupt in allem immer voll und ganz unterstützt haben. Ein großes Danke schön auch an Paulina, die mir oft an den vielen Wochenenden beim Wechsel der Dialysepuffer oder dem Messen von Spektren geholfen hat und dass sie, besonders in den letzten Wochen, Geduld und Verständnis hatte, wenn ich mal länger im Labor war.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere weiterhin, dass allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Diese Arbeit wurde bislang weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch veröffentlicht.

Golm, den 06.11.2004

(Alexander Freiberg)

