

**Untersuchung der putativen Substratbindungsstelle von
Escherichia coli Parvulin 10**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,



vorgelegt
von
André Diessner

geb. am 01.06.1982 in Halle (Saale)

Promotion eingereicht am: 07.12.2016

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29.05.2017

Gutachter: Prof. Dr. Frank Bordusa

Prof. Dr. Mike Schutkowski

Prof. Dr. Peter Bayer

Meiner Familie.

Wenn wir wüssten, was wir tun, würden wir das nicht Forschung nennen.

Albert Einstein (1879-1955)

Abstract

Keywords: Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase), Parvulin 10, Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC), pK_a , semisynthesis, peptide segment condensation, native chemical synthesis, enzymatic ligation, fluorescent labeling

This thesis has a focus on *Escherichia coli* Parvulin 10 (Par10), the founding member of the parvulin enzyme family, a class of peptidyl-prolyl-*cis/trans*-isomerases (PPIases). As the prototypical member of the parvulin family, Par10 is particularly suitable to answer basic questions pertaining to substrate specificity and catalytic mechanism of these enzymes. Par10 catalyzes the interconversion of *cis* and *trans* conformers of prolyl bonds (Xaa-Pro bonds) in peptides and proteins. Furthermore, some PPIases exhibit chaperone activity and cell regulation functions, which are often mediated by additional protein domains besides the PPIase domain. Members of *human* Parvulins, e. g. *human* Pin1 (*hPin*), are associated with a variety of diseases, including breast cancer, PARKINSON's and ALZHEIMER's disease. This work was thought to contribute to a better understanding of the mode of operation of parvulins by using structural studies and by providing novel, chemically modified parvulin species.

The interaction between parvulin 10 and its, so far, only known natural interaction partner, the alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC), has been further investigated in this study and has been examined at the atomic level for the first time by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy. The direct binding of a partial amino acid sequence of AhpC to the catalytic site of Par10 could be shown as well as the enzymatic conversion of an AhpC segment by Par10.

For a long time a highly conserved cysteine residue in parvulins has been a subject of intense studies. Results of the here presented study show significantly lowered pK_a values for both cysteine side chains in Par10 compared to cysteines in short, unstructured peptides and a great influence of Cys⁴⁰ on Par10's overall protein structure. Additionally, more *in vitro* and *in vivo* studies are required to understand how Par10 recognizes prolyl bonds in proteins and catalyzes its *cis/trans* conversion.

Beside the interaction and structural studies a vast number of methods were used to provide catalytically active and site-specific fluorescence-labeled Par10 molecules, thus laying the foundation for further inhibition and protein-ligand studies.

Kurzzusammenfassung

Schlüsselwörter: Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase), Parvulin 10, Alkylhydroperoxid-Reduktase Untereinheit C (AhpC) pK_s , Semisyntese, Peptidsegmentkondensation, Natürlich Chemische Ligation, Enzymatische Ligation, Fluoreszenzmarkierung

Diese Arbeit befasst sich mit Parvulin 10 (Par10) aus *Eschericia coli*, dem Namensgeber der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Familie der Parvuline. Als prototypischer Vertreter dieser Enzymfamilie ist Par10 besonders geeignet, um grundlegende Fragen bezüglich der Substratspezifität und des Katalysemechanismus dieser Enzyme zu beantworten. Par10 katalysiert die Umwandlung der *cis*- und *trans*-Konformere von Prolylbindungen (Xaa-Pro-Bindungen) in Peptiden und Proteinen. Darüber hinaus besitzen einige Parvuline Chaperonaktivität und Zellzykluskontrollfunktionen, welche oft durch zusätzliche Proteindomänen neben der PPIase-Domäne vermittelt werden. Vertreter humaner Parvuline, wie zum Beispiel *humanes* Pin1 (*hPin*), werden mit einer Vielzahl von Erkrankungen, wie dem Brustkrebs, der PARKINSON- und der ALZHEIMER-Krankheit, in Verbindung gebracht. Diese Arbeit sollte durch Strukturuntersuchungen und durch die Bereitstellung neuartiger, chemisch modifizierter Parvulinspezies zum Verständnis der Funktionsweise der Parvuline beitragen.

Die Interaktion zwischen Parvulin 10 und dem bislang einzig bekannten natürlichen Interaktionspartner, der Alkylhydroperoxid Reduktase Untereinheit C (AhpC), wurde in dieser Arbeit eingehender und erstmalig auf atomarer Ebene mittels der Kernspinresonanzspektroskopie untersucht. Es konnte eine direkte Bindung eines AhpC-Segments an das katalytische Zentrum von Par10 und die enzymatische Umsetzung dieses Segments durch Par10 gezeigt werden.

Seit langem ist ein in Parvulinen hoch konservierter Cysteinrest immer wieder Ziel intensiver Studien. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich abgesenkte pK_s -Werte für die beiden in Par10 vorkommenden Cysteinseitenketten verglichen mit Cysteinseitenketten in kurzen, unstrukturierten Peptiden und einen starken Einfluss des Cys⁴⁰ auf die Raumstruktur von Parvulin 10. Um zu verstehen, wie Par10 Prolylbindungen in Proteinen erkennt und ihre *cis/trans*-Isomerisierung katalysiert, sind weitere *in vitro* und *in vivo* Studien notwendig.

Neben Interaktions- und Strukturstudien wurde eine Vielzahl von Methoden für die Bereitstellung katalytisch aktiver und positionsspezifisch fluoreszenzmarkierter Par10-Moleküle angewendet und damit die Grundlage für tiefgehende Inhibierungs- und Protein-Ligand-Studien geschaffen.

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1	Einleitung	1
1.1	Enzyme – die Biokatalysatoren des Lebens	1
1.2	Prolylbindungen und Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	2
1.3	Parvulin 10 und die Familie der Parvuline	5
1.4	Alkylhydroperoxid-Reduktase Untereinheit C	11
1.5	Gewinnung und Modifizierung von Proteinen	13
2	Problemstellung und Zielsetzung	16
3	Materialien und Methoden	18
3.1	Liste der Hersteller und Zulieferer	18
3.2	Materialien.....	19
3.2.1	Chemikalien.....	19
3.2.2	Verbrauchsmaterialien	20
3.2.3	PCR-Primer, Plasmide und <i>E. coli</i> -Stämme	20
3.2.4	Enzyme.....	21
3.2.5	Nährmedien, Stammlösungen und Puffer	22
3.2.6	Standards und Reagenzienzusammenstellungen	22
3.2.7	Säulenmaterialien	23
3.2.8	Allgemeine Geräte	23
3.2.9	Computerprogramme und Datenbanken	24
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	25
3.3.1	Polymerasekettenreaktion	25
3.3.2	Enzymatische Modifizierung von DNA.....	25
3.3.3	Auftrennung, Isolierung und Reinigung von DNA.....	25
3.3.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	26
3.3.5	DNA-Sequenzierung.....	26
3.3.6	Anlegen von Glycerinkryokulturen	26
3.3.7	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen und Genexpression	26
3.4	Präparative Methoden.....	27
3.4.1	Zellaufschluss, Proteinreinigung und Proteinkonzentrierung	27
3.4.2	Intein-vermittelte Peptidthioestersynthese	29
3.4.3	Festphasenpeptidsynthese	30
3.4.4	Peptid- und Peptidthioesterreinigung	32
3.5	Segmentkondensationen	32
3.5.1	Natürlich Chemische Ligation	32
3.5.2	Enzymatische Ligation.....	33
3.5.3	Synthese des Quenchers 2-INPA.....	34

3.6	Analytische Methoden.....	34
3.6.1	Nukleinsäure-, Peptid- und Proteinquantifizierung.....	34
3.6.2	Denaturierende und native Polyacrylamidelektrophorese.....	35
3.6.3	Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatografie	35
3.6.4	Massenspektrometrische Untersuchungen.....	36
3.6.5	Limitierte Proteolyse.....	36
3.6.6	Fern-UV CD-Spektroskopie	36
3.6.7	pK _S -Wertbestimmung freier Cysteine	37
3.6.8	Fluoreszenzspektroskopische Bindungsstudien	39
3.6.9	Kernspinresonanzspektroskopie.....	40
3.7	Enzymaktivitätstests	41
3.7.1	PPLase-Aktivitätstests und pH-Abhängigkeit der PPLase-Aktivität.....	42
3.7.2	AhpC-Aktivitätstest	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Rekombinant hergestellte Proteine und Proteinderivate	44
4.1.1	Exprimierte Parvulin 10-Varianten	44
4.1.2	Exprimierte AhpC 10-Varianten.....	45
4.2	Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen	47
4.2.1	Vorversuche zur AhpC-NMR	47
4.2.2	NMR-Interaktionsstudien von Par10 und AhpC.....	49
4.2.3	Homonukleare 2D-NOESY-Experimente an AhpC ¹¹⁵⁻¹³²	53
4.2.4	¹ H ^N - ¹⁵ N-HSQC-Spektren von ¹⁵ N-Par10 C40A.....	54
4.3	Synthese fluoreszenzmarkierter Par10-Varianten.....	55
4.3.1	Synthese der Fluoreszenzsonde Dap(Abz).....	56
4.3.2	Synthese der Par10-Segmente.....	57
4.3.3	Ligation zu fluoreszenzmarkierten Par10-Varianten	61
4.4	Fern-UV CD-Spektroskopie zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts.....	62
4.5	Proteolytische Stabilität der Parvulinvarianten gegenüber Trypsin	66
4.6	Experimentell bestimmte Enzymaktivitäten.....	67
4.6.1	Spezifitätskonstanten der Par10-Varianten und ausgewählter Par10-Segmente	67
4.6.2	AhpC-Aktivitätstest	69
4.7	pH-Aktivitätsprofil und pK _S -Werte der Cys ⁴⁰ - und Cys ⁶⁸ -Seitenkette in Parvulin 10	70
4.8	Par10-Ligand-Bindungsstudien	72
4.8.1	Fluoreszenzlöschung der Par10-Varianten durch kovalente Bindung von 2-INPA.....	72
4.8.2	Fluoreszenzlöschung der Par10-Varianten durch nicht-kovalente Bindung von Suc-AAPF-pNA.....	74
4.8.3	Kompensationsbindungsstudien an Par10-Varianten	75
5	Diskussion	78
5.1	Gewinnung der rekombinant erzeugten Proteinvarianten und Peptid- α -thioester	78
5.1.1	Par10- und AhpC-Varianten	78
5.1.2	Par10 H-1-35-MESNa und Par10 H-1-67-MESNa	79
5.2	Fluoreszenzmarkierte Par10-Varianten als zukünftige Untersuchungsobjekte	81
5.2.1	Festlegung der ausgetauschten Aminosäuren und der Positionen der Ligationsstellen	81
5.2.2	Synthese von Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH und Festphasenpeptidsynthese	84
5.2.3	Eignung der gewählten Ligationsreaktionen	87

5.2.4	Fluoreszenztitrationsen	92
5.3	Struktur-Aktivitäts-Beziehung von Parvulin 10	95
5.3.1	Sekundärstrukturen der Par10-Varianten	96
5.3.2	PPlase-Aktivitäten der Par10-Varianten	102
5.3.3	pK ₅ -Werte der Sulfhydrylseitenketten von Cys ⁴⁰ und Cys ⁶⁸	105
5.4	Betrachtung der Par10-AhpC-Interaktion auf atomarer Ebene.....	115
5.4.1	Interaktion von Par10 mit der Peroxireduktase AhpC.....	115
5.4.2	Lösungsstruktur der Peroxireduktase AhpC	118
6	Zusammenfassung und Ausblick	123
7	Literaturverzeichnis	127
III	Anhang	i
A 1	Sequenzierungen und abgeleitete Primärsequenzen.....	i
A 2	Experimentell bestimmte Molekülmassen	iv
A 3	Absolute und relative Spezifitätskonstanten	v
A 4	Schema der Festphasenpeptidsynthese	vi
A 5	Schema der Natürlich Chemischen Ligation	vii
A 6	Schema der proteasekatalysierten Peptidsynthese	vii
A 7	Abbildungsverzeichnis	viii
A 8	Tabellenverzeichnis.....	ix
A 9	Gleichungsverzeichnis	x
	Stichwortverzeichnis	x
	Danksagung	xi
	Lebenslauf	xii
	Publikationen und Tagungsbeiträge	xii
	Selbstständigkeitserklärung	xiii

II Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\delta$	Änderung der chemischen Verschiebung
ΔG	GIBBS Energie (frei GIBBSsche Energie)
ΔH	Enthalpieänderung
ε	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
η	Ausbeute
θ	Elliptizität
λ	Wellenlänge
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{An}	Anregungswellenlänge
τ_c	Korrelationszeit (Relaxationsparameter)
1D	eindimensional
2-Abz-	2-Aminobenzoyl-
2D	zweidimensional
2-ClTrt-	2-Chlortrityl-
2-INPA	2-Iod- <i>N</i> -(4-nitrophenyl)acetamid
Å	Ångström
Abs	Absorption
AhpC	Alkylhydroperoxid-Reduktase Untereinheit C
Äq.	Äquivalent
Abz	Aminobenzoyl-
ACN	Acetonitril
Amp ⁺	Ampicillin enthaltend
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäureeinheiten
AU	Absorptionseinheit (<i>absorption unit</i>)
bp	Basenpaare
BMRB	Biological Magnetic Resonance (Data) Bank
Bn-	Benzyl- (CH ₂ -Ph)
BnOH	Benzylalkohol
BnSH	Benzylmercaptan, auch: Benzylthiol
Boc-	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl-
BTP	1,3-Bis-[tris-(hydroxymethyl)-methylamino]-propan
Bz-	Benzoyl- (CO-Ph)
CBD	Chitin-Bindedomäne
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CsA	Cyclosporin A
Cyp	Cyclophilin
d	Schichtdicke
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
Da	Dalton
Dansyl-	5-(Dimethylamino)-naphthalin-1-sulfonyl-
Dap	2,3-Diaminopropionsäure
Dap(Abz)	<i>N</i> ^β -2-Aminobenzoyl-2,3-diaminopropionsäure

DCM	Dichlormethan
DEAE	Diethylaminoethyl-
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
(ds) DNA	(doppelsträngige) Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure (ELLMAN's Reagenz)
DTT	Dithiothreitol (CLELAND's Reagenz)
EC	Enzymkommission (<i>Enzyme Commission</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	Enzymatische Ligation
EP	Enteropeptidase (veraltet: Enterokinase)
EPL	Ligation Exprimierter Proteine (<i>Expressed Protein Ligation</i>)
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
$F_{(max)}$	(maximale) relative Fluoreszenzintensität
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FKBP	FK506-bindendes Protein
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
FPLC	<i>fast performance/protein liquid chromatography</i>
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , ein Zytokin
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat
HCTU	2-(6-Chlor-1- <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSQC	(heteronukleare Einquantenkohärenz-Spektroskopie) <i>heteronuclear single-quantum coherence spectroscopy</i>
IB	<i>inclusion body</i>
IEX	Ionenaustauschchromatografie (<i>Ion Exchange Chromatographie</i>)
IMAC	immobilisierte Metallchelataffinitätschromatografie (<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>)
IMPACT-TWIN	<i>Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-Binding Tag-Two Intein</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
K_A	Assoziationskonstante
Kan ⁺	Kanamycin enthaltend
kb	Kilobasenpaare
KC ₅₀	Konzentration des Kompetitors bei 50%iger Verdrängung des Liganden aus der Par10-Bindungsstelle
K_D	Dissoziationskonstante
K_{D_app}	apparente Dissoziationskonstante von Par10 und Ligand
K_{K_app}	apparente Dissoziationskonstante von Par10 und Kompetitor
k_{kat}	Wechselzahl

$k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1}$	Spezifitätskonstante als Maß der katalytischen Effizienz
K_{M}	MICHAELIS-Konstante
k_{obs}	beobachtete (<i>observed</i>) Geschwindigkeitskonstante
KP _i	Kaliumphosphatpuffer (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ -Puffersystem)
K _S	Säurestärke
LA	<i>lysogeny agar</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC-MS	Flüssigkeitschromatografie-Massenspektrometrie (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
MALDI-ToF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight</i>
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MESNa	Natrium-2-mercaptoethansulfonat/ β -Mercaptoethansulfonsäure Natriumsalz
-MESNa	-ethansulfonsäurethioester
MPPF	Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle (Saale)
MS	Massenspektrometrie
Mth RIR1	Intein der <i>Ribonucleoside-diphosphate-reductase, α-subunit</i> aus <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
NAD ⁺	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NaP _i	Natriumphosphatpuffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ -Puffersystem)
NCL	Natürlich Chemische Ligation (<i>Native Chemical Ligation</i>)
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NMR	nukleare magnetische Resonanz (Kernresonanzspektroskopie)
NMWL	nominelle Molekulargewichtsgrenze (<i>nominal molecular weight limit</i>)
NOESY	Kern-OVERHAUSER-Effekt- und Austausch-Spektroskopie (<i>nuclear OVERHAUSER enhancement and exchange spectroscopy</i>)
NTB	2-Nitro-5-thiobenzoessäure
OD	optische Dichte
OSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidester
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Par10	Parvulin 10
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
PDB	<i>RCSB Protein Data Bank</i>
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PhSH	Thiophenol
Pin	<i>protein interacting with NIMA (never in mitosis A, eine Aspergillus-Kinase)</i>
-pNA	<i>para</i> -Nitroanilid
PPlase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
pK _S	negativer dekadischer Logarithmus der Säurestärke
pSer	Phosphoseryl-
pThr	Phosphothreonyl-
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PyBOP	(1- <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl-oxy)- <i>tris</i> -(pyrrolidino)-phosphonium-hexafluorophosphat
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
-SBn	-thiobenzylester/-benzylthioester

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecylsulfate</i>)
SEC	Größenausschlusschromatografie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>solid-phase peptide synthesis</i>)
-SPh	-thiophenylester/-phenylthioester
tBHP	<i>tert.</i> -Butylhydroperoxid
TCEP	<i>tris</i> -(2-Carboxyethyl)-phosphin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
tBu-/tButyl-	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl-
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Gesamtionenstrom (<i>Total Ion Current</i>)
TIS	Triisopropylsilan
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
TOCSY	vollständige Korrelationspektroskopie (<i>total correlation spectroscopy</i>)
TROSY	transversal-relaxationsoptimierte Spektroskopie (<i>transverse relaxation optimized spectroscopy</i>)
Trt-	Trityl-/Triphenylmethyl-
TWIN	<i>two intein</i>
UniProtKB	<i>universal protein knowledgebase</i>
UV/Vis	ultraviolettes/sichtbares Licht
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
wtPar10	Wildtypform von Parvulin 10 aber auch rekombinant hergestelltes Voll-längen-Par10 ohne Aminosäurerestaustausch oder chemischer Modifikation
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
Xaa	beliebige genkodierte Aminosäure
Yaa	beliebige genkodierte Aminosäure außer Prolin
Z-	Benzyloxycarbonyl-

Aus dem Englischen oder Lateinischen übernommene Begriffe wurden *kursiv* und Personennamen in KAPITÄLCHEN geschrieben.

Aminosäuren wurden nach dem Ein- beziehungsweise Dreibuchstabencode entsprechend den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur [Eur. J. Biochem. 138, 9-37 (1984)] abgekürzt. Hochgestellte Ziffern an vorangegangenen Ein- und Dreibuchstabencodes kennzeichnen die Positionen der Aminosäuren in der Primärsequenz eines Peptids oder Proteins.

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Aspartat	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutamat	M	Met	Methion	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Trptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	X	Xaa	variable AS
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin	Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Enzyme – die Biokatalysatoren des Lebens

An nahezu allen biochemischen Prozessen sind Enzyme als biologische Katalysatoren beteiligt. Mit Ausnahme der katalytisch wirksamen RNAs (Ribozyme) [1] handelt es sich bei diesen Enzymen¹ um Proteine. Im Vergleich zu nicht-katalysierten Reaktionen können Enzyme Reaktionen um die Faktoren 10^5 - 10^{21} [2, 3] beschleunigen. Enzyme katalysieren Reaktionen unter milden Reaktionsbedingungen in Bezug auf Temperatur, Lösungsmittelzusammensetzung, pH-Wert, Luftdruck und Umweltverträglichkeit. Dabei zeichnen sie sich durch eine enorme Vielfalt hinsichtlich ihrer Reaktions-, Regio- und Stereospezifität, sowie durch ein Höchstmaß an Edukt- und Produktdiskriminierung aus. Ferner sind enzymvermittelte katalytische Aktivitäten in biologischen Systemen komplex reguliert und kontrolliert.

Enzyme erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion durch das Absenken der freien Aktivierungsenthalpie dieser Reaktion, ohne dabei das Reaktionsgleichgewicht zu beeinflussen. Die Grundvoraussetzung dafür ist die Fähigkeit von Proteinen, andere Moleküle spezifisch zu binden. Die Substratbindung in das aktive Zentrum eines Enzyms führt oft dazu, dass im Vergleich zu einer unkatalysierten Reaktion, Substrate auf einem energetisch niedrigeren Weg den Übergangszustand erreichen. Die im Verlauf vieler enzymatischer Reaktionen auftretende „Entropieschuld“ (Erhöhung der Ordnung, besonders bei Mehrsubstratreaktionen) wird häufig durch die freigesetzte Energie während der Substratbindung im Voraus bezahlt. Enzyme sind oft für die Bindung des Übergangszustandes evolutiv optimiert.

Die Größe der aus Aminosäuren aufgebauten Enzyme variiert stark von 6,8 kDa beziehungsweise 62 Aminosäureeinheiten (AS) für die 2-Hydroxymuconat-Tautomerase aus *Pseudomonas putida* [4] (UniProtKB: Q01468; als Hexamer katalytisch aktiv) bis zu 273,3 kDa beziehungsweise 2510 AS für die humane Fettsäure-Synthase [5] (UniProtKB: P49327; 7 Katalysedomänen in einer Polypeptidkette). Im Vergleich zur Gesamtzahl sind meist nur wenige Aminosäurereste direkt an der Substraterkennung, -bindung und -umsetzung beteiligt. So können beispielsweise die Seitenketten von Serin, Threonin, Cystein und Tyrosin als Nukleophile in kovalenten Katalysen oder Histidin-, Asparaginsäure- und Glutaminsäureseitenketten als Protonendonatoren/-akzeptoren in Säure/Base-katalysierten Enzymreaktionen fungieren. Der bei weitem größte Anteil der Aminosäuren dient der

¹ Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Begriffe *Enzym* und *Enzyme* ausschließlich für Proteine verwendet.

Bildung und der Stabilisierung der dreidimensionalen Proteinstruktur einschließlich der Substratbindungstasche. Außerdem sind sie entscheidend für die Abgrenzung des Enzyms gegenüber dem umgebenden Milieu sowie für die An- oder Abwesenheit von Ionen und Wasser im Reaktionszentrum. In einer Vergleichsstudie zur Proteingrößenverteilung, in der aus vollständigen genomischen Sequenzen Proteinlängen abgeleitet wurden, kamen TIESSEN *et al.* 2012 [6] nach Auswertung zweier Datensätze mit insgesamt 7,3 Millionen Proteinsequenzen von 1442 Spezies zu dem Ergebnis, dass die durchschnittliche Proteinlänge in Archaeen 283 AS, in Bakterien 319 AS und in Eukaryoten 472 AS beträgt. Laut dieser Studie benötigen Enzyme demnach ~200 AS zur Stabilisierung ihrer Raumstruktur, wohingegen die katalytischen Zentren durchschnittlich aus lediglich 3-5 Aminosäureresten bestehen. Genannt sei die Cysteinprotease Papain aus *Carica papaya* (UniProtKB: P00784 [134-345]), von deren 211 AS nur Cys²⁵ und His¹⁵⁹ direkt an der Katalysereaktion beteiligt sind (Asn¹⁷⁵ [vermutlich Stabilisierung der His¹⁵⁹-Imidazolform] und Gln¹⁹ [Ausbildung des Oxyanion-Lochs] wird nur eine indirekte Beteiligung am Katalysemechanismus zugeschrieben) [7, 8]. Zur Stabilisierung ihrer Struktur bilden vor allem kleinere Enzyme häufig aus Di-, Tetra- oder Dekameren zusammengesetzte Quartärstrukturen [9]. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Parvulin 10 (Par10) aus *Escherichia coli* stellt mit 92 AS eines der kleinsten, zudem als Monomer katalytisch aktiven Enzyme dar (Abschnitt 1.3).

1.2 Prolylbindungen und Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Zu den von Enzymen katalysierten Reaktionen gehört neben den Redoxreaktionen (Oxidoreduktasen), der Übertragung funktioneller Gruppen von einem Donator auf einen Akzeptor (Transferasen), der hydrolytischen und nicht-hydrolytischen Bindungsspaltung (Hydrolasen und Lyasen) und der kovalenten Bindungsknüpfung (Ligasen), auch die Umwandlung von Molekülen in isomere Strukturen (Isomerasen). Beispiele für die enzymkatalysierte Überführung zweier Konformationsisomere² sind die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolylbindungen und die *cis/trans*-Isomerisierung von sekundären amidischen Peptidbindungen. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPlasen),

² Die **Konformation** eines Moleküls beschreibt dessen räumliche Atom- und Bindungsanordnung bei gegebener Konstitution (Art, Anzahl, Verknüpfungsart der Atome im Molekül ohne Berücksichtigung der räumlichen Bindungsanordnung) und Konfiguration (berücksichtigt zusätzlich die räumliche Bindungsanordnung ohne Berücksichtigung der freien Drehbarkeit um Einfachbindungen). Bei der Konformation werden unterschiedliche räumliche Bindungsanordnungen, die durch die freie Drehbarkeit um Einfachbindungen entstehen können, berücksichtigt. **Konformationsisomere** lassen sich durch Rotation um Einfachbindungen ohne Bindungslösung ineinander überführen. Diese freie Rotation ist aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters einer Peptidbindung stark eingeschränkt.

und die in dieser Arbeit nicht näher betrachteten Sekundär-Amid-Peptidbindungs-spezifischen-*cis/trans*-Isomerasen (APIasen), katalysieren solche, das Peptidrückgrat betreffende, Reaktionen.

Das Rückgrat einer Polypeptidkette besteht aus einer Abfolge von sich wiederholenden Peptidbindungen. Diese werden durch eine kovalente Bindung zwischen dem Carboxy-C-Atom einer α -Aminosäure und dem *N*-terminalen Stickstoffatom einer zweiten α -Aminosäure gebildet. Peptidbindungen zweier miteinander verbundener Aminosäuren (Xaa-Yaa-Bindungen) werden genauer als sekundäre Amidbindungen (auch Säureamidbindung) bezeichnet. In Abgrenzung zu diesen, spricht man von tertiären Amidbindungen, respektive Imid- oder Prolylbindungen³, wenn die Aminofunktion der α -Iminosäure Prolin eine Bindung mit der Carboxyfunktion einer vorangehenden Amino- (oder Imino)säure eingeht (Xaa-Pro-Bindung).

Die Verschiebung des delokalisierten π -Elektronenpaares des Amidstickstoffes über die gesamte Amidbindung bewirkt einen partiellen Doppelbindungscharakter von etwa 40 % und führt zu einer verkürzten C-N-Bindung, einer starken Einschränkung der freien Drehbarkeit und zur planaren Anordnung der an der Amidbindung beteiligten Atome. In der Folge kann der Wert des Torsionswinkels ω (C_{α} -C(=O)-NH- $C_{\alpha+1}$) einer Amidbindung nur $0^{\circ} \pm 5^{\circ}$ (*cis*-Isomer) oder $180^{\circ} \pm 5^{\circ}$ (*trans*-Isomer) betragen (Abb. 1-1, A) [10]. Aufgrund der größeren sterischen Hinderung zwischen den C_{α} -Atomen und den Seitenketten miteinander verbundener Aminosäuren in der *cis*-Konformation, liegen sekundäre Amidbindungen in Proteinen annähernd vollständig (~99 %) in der energetisch günstigeren *trans*-Konformation vor [11, 12]. In kurzen Peptiden ohne stabile Tertiärstruktur können die *cis*-Anteile sequenzabhängig 6-38 % betragen [13].

Wegen einer größeren Einschränkung der freien Drehbarkeit um die Säureamidbindung durch den Ringschluss des Prolin-Stickstoffatoms mit dem C_{δ} -Atom seiner Seitenkette (freie Rotationsbarriere = $85 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ verglichen mit $75\text{-}80 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ für Peptidbindungen [14]) ist der Anteil von *cis*-Prolylbindungen in gefalteten Proteinen mit 5-6 % wesentlich größer verglichen mit *cis*-Peptidbindungen mit deutlich unter 1 % [11, 15, 16]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das *trans*-Konformer einer Prolylbindung nur um $2\text{-}6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [17, 18] gegenüber der *cis*-Form favorisiert ist. Bei sekundären Amidbindungen beträgt diese Differenz in Abhängigkeit von der Seitenkette $10\text{-}16 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [11, 16]. Die *cis*→*trans*-Isomerisierung einer Peptidbindung benötigt nahezu keine Aktivierungsenergie im Gegensatz zur Konformationsänderung einer *cis*-Prolylbindung in die *trans*-Form. Aus diesem Grund sind *cis*→*trans*-Isomerisierungen von Prolylbindungen häufig die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte während der Faltung von Proteinen in ihre nativen Raumstrukturen oder bei der Rückfaltung von Proteinen aus entfalteten Zuständen (vorausgesetzt,

³ Peptidbindungen der Form Xaa-Pro werden im Folgenden als **Prolylbindungen** bezeichnet, Bindungen der Art Xaa-Yaa als **Peptidbindungen** oder nicht-Prolylbindung.

das *trans*-Isomer entspricht dem nativen Zustand) [19-21]. Die von FISCHER *et al.* 1984 erstmals charakterisierten Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen, EC-Nummer: 5.2.1.8) [22] können solche Prozesse als Faltungshelferenzyme (neben Protein-Disulfid-Isomerasen, Hitzeschockproteinen und Chaperonen) katalysieren (Abb. 1-1 B) [23].

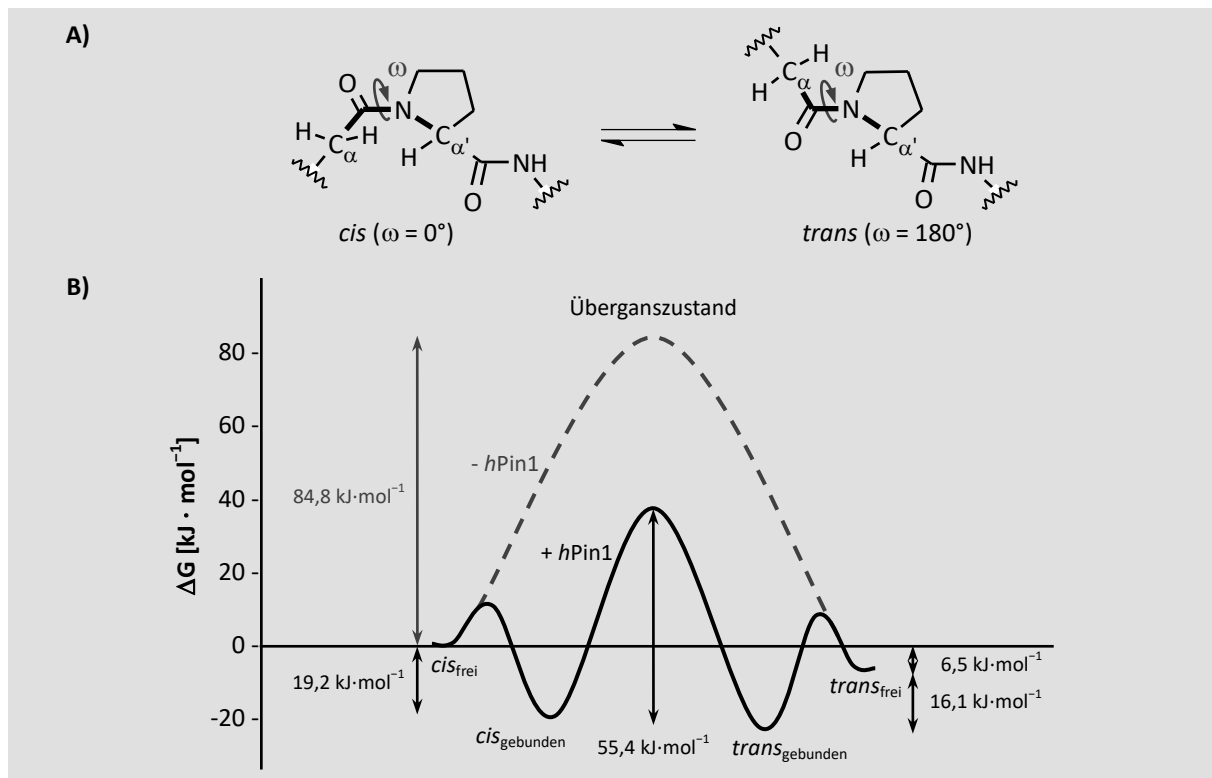


Abb. 1-1. *Cis/trans*-Isomerisierung. **A)** *cis*- und *trans*-Konformationsisomere einer Prolylbindung. Fett hervorgehobene Bindungen zeigen am Torsionswinkel ω beteiligte Atombindungen. **B)** Reaktionsschema und freie Energien der PPIase-katalysierten und unkatalysierten Reaktion der *cis/trans*-Isomerisierung der *pThr*⁶⁶⁸-*Pro*⁶⁶⁹-Prolylbindung des Amyloid-Vorläuferprotein-Peptids APP (659-682) durch die *humane* PPIase Pin1 (*hPin1*). APP = *amyloid precursor protein*. Abbildung verändert nach [18].

In nahezu allen untersuchten Organismen lassen sich die evolutionär hochkonservierten PPIasen nachweisen. Verschiedene Zellkompartimente und Gewebe komplexer Organismen weisen spezifische PPIase-Verteilungsmuster auf. Gegenwärtig lassen sich PPIasen aufgrund von Aminosäuresequenzhomologien in drei eigenständige PPIase-Familien einteilen: Cyclophiline (Cyp) [24], FK506-bindende Proteine (FKBP) [25] und Parvuline (Par) [26], welche durch jeweils spezifische Inhibitoren (Cyclosporin A, FK506 und Juglon) inaktiviert werden können. Die jeweils einfachsten Vertreter der PPIase-Familien, *humanes* Cyclophilin 18, *humanes* FKBP12 und *E. coli* Parvulin 10, enthalten nur eine PPIase-Domäne und besitzen Molekülmassen von 18 kDa, 12 kDa beziehungsweise 10 kDa. Einige PPIasen verfügen über mehrere katalytische Domänen oder werden durch Signalsequenzen (Cyps, FKBP), WW-Domänen (eine nach zwei invarianten Tryptophanseitenketten benannte Proteindomäne, welche spezifisch *pSer*-/*pThr*-Pro-Motive erkennt, z. B. beim *hPin1* [27]), DNA- (*hPar14*) oder Ribosomenbindungsdomänen (Trigger-Faktor) ergänzt und können unabhängig

von der PPlase-Aktivität noch weitere Funktionen in sich vereinen [28-31]. So scheint interessanterweise die Isomerase-unabhängige Chaperonaktivität des *E. coli* Parvulins SurA für das Überleben der Bakterienzelle wichtiger als dessen PPlase-Aktivität [32].

Die meisten PPlasen zeigen *in vitro* eine breite Substratazeptanz: von kurzen Oligopeptiden, über unstrukturierte Polypeptidketten bis hin zu teilgefalteten und nativen Proteinen [33, 34]. Die unter Abschnitt 1.3 näher beschriebenen phosphatspezifischen Parvuline stellen hierbei eine Ausnahme dar. Die Spezifitätskonstanten $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1}$ einiger Cyclophiline und Parvuline für Oligopeptidsubstrate können Werte $>10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ erreichen und lassen eine durch Diffusionsprozesse limitierte Katalyse vermuten. Für FKBP52 liegt die katalytische Effizienz um circa eine Größenordnung niedriger [35].

In vivo beeinflussen PPlasen physiologische Prozesse, wie die Proteinfaltung, Signaltransduktion, Ionenkanalfunktion und die Zellzyklusregulierung [30]. Seit ihrer Entdeckung stehen PPlasen auch im Fokus intensiver Studien im Zusammenhang mit der Entstehung und Diagnose von Krankheiten wie AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), Hepatitis C, einigen Krebsarten (z. B. nicht-kleinzelliger Lungenkrebs [36]) und neurodegenerativen Erkrankungen. So scheint FKBP52 durch die Bindung an das Tau-Protein dessen Hyperphosphorylierung und damit Pathogenität zu verringern und somit vor einer ALZHEIMER-Erkrankung zu schützen [37].

CypA wird nach der Bindung an das Hüllprotein Gag (Position: Gly⁸⁹-Pro⁹⁰) des *humanen* Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) im Virion verpackt und ist für die Replikation und die Infektiosität des HI-Virus essentiell [38, 39]. Mit Debio 025/Alisporivir, NIM-811 (beide Novartis) und SCY-635 (Scynexis Inc.) befinden sich momentan drei nicht-immunsuppressive Cyclophilinhibitoren als Medikamente für die Hepatitis-C Virus- sowie HI-Virussuppression in der klinischen Erprobung [40-42] und lassen damit das pharmakologische Potential der *humanen* PPlasen erkennen.

Obwohl lange vor den Parvulinen entdeckt, sind die genauen zellulären Bindungspartner der Cyclophiline und FKBP52 und die molekularen Mechanismen ihrer Isomeraseaktivität bisher weitgehend unbekannt.

1.3 Parvulin 10 und die Familie der Parvuline

Im Gegensatz zu den Cyps und FKBP52 sind für die 1994 erstmals beschriebene dritte PPlase-Familie der Parvuline [26], zu der das im Zytoplasma von *E. coli* vorkommende Par10 gehört, zahlreiche Beteiligungen an Stoffwechsel- und Signalwegen identifiziert worden. Insbesondere für das essentielle *hPin1* [43], das *humane* Homologe zum Par10, sind über zwei Dutzend Proteinfunktionen beschrieben, die direkt oder indirekt unter *hPin1*-Kontrolle stehen. Genannt seien die Interaktionen zwischen dem im Zellkern lokalisierten *hPin1* und den zellzyklusassoziierten Proteinen NIMA, Cdc25 und KRMP1 oder die Bindungen der *hPin1*-WW-Domäne (eine nach zwei invarianten Tryptophanseitenketten benannte Proteindomäne, welche spezifisch *pSer*-/*pThr*-Pro-Motive erkennt und diese

nach Bindung mit der C-terminalen PPlase-Domäne isomerisiert [27]) an das phosphorylierte Strukturprotein Tau, sowie die Wechselwirkung des *hPin1* mit dem integralen Membranprotein APP (*amyloid-precursor-protein*). *hPin1* wird durch MLK-3 (*mixed-lineage kinase 3*), eine MAP3-Kinase (*mitogen-activated protein 3-Kinase*), am Ser¹³⁸ phosphoryliert und damit für einige seiner Zellzyklusfunktionen aktiviert [44]. So besitzt *hPin1* eine regulatorische Bedeutung beim G2/M-Übergang während der Mitose in eukaryotischen Zellen, indem es nach der Bindung an *pThr*⁴⁸-Pro und *pThr*⁶⁷-Pro von Cdc25c (*cdc = cell division cycle*) erst eine Konformations- und in Folge eine Aktivitätsänderung von Cdc25c bewirkt [45, 46].

In gesunden Zellen ist das *hpin1*-Expressionslevel gering, viele Krebsarten (u. a. kleinzelliger Lungenkrebs, Her2-positiver Brustkrebs und Prostatakrebs) zeigen dagegen ein erhöhtes Expressionslevel des *hpin1*-Gens [47-49]. Studien zeigen, dass eine Inhibierung von *hPin1* das Wachstum von Krebszellen hemmt, indem die verringerte *pSer(pThr)*-Pro-spezifische Isomerisierung zur Arretierung des mitotischen Zellzykluses oder zum programmierten Zelltod der Krebszellen führt [50, 51]. Eosinophile Granulozyten von Patienten mit allergischem Asthma weisen eine erhöhte *hPin1*-Aktivität auf, welche vermutlich im direkten Zusammenhang mit der Anreicherung von aktivierten Eosinophilen und einer erhöhten Zytokinsekretion im Lungengewebe einhergeht und die Symptome des allergischen Asthmas auslöst. *hPin1* scheint dabei in einem Ribonukleoproteinkomplex GM-CSF Transkripte zu stabilisieren und damit die Lebensdauer der Eosinophilen zu verlängern [52].

In Nervenzellen ist eine zu geringe *hPin1*-Konzentration zellschädigend und viele Neuropathien, darunter *Morbus ALZHEIMER* und *Morbus PICK* (frontotemporale Demenz), werden durch eine verringerte *hPin1*-Aktivität maßgeblich begünstigt. Beide Erkrankungen gehören zu den Tauopathien, bei denen eine Hyperphosphorylierung und anschließende Aggregation von Tau-Proteinen („Mikrotubuliregulatoren“) und ein gestörter Abbau des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) mit nachfolgender Akkumulation von Amyloid- β -Peptiden ($A\beta$ -Plaques) die Neuronen absterben lassen. *hPin1* katalysiert eine *cis* \rightarrow *trans*-Konformationsänderung in phosphorylierten Tau-Proteinen und beschleunigt damit die anschließende Dephosphorylierung von Tau [53-55]. Außerdem verhindert *hPin1* die Bildung von $A\beta$ -Plaques, indem es die Spaltung des APP auf physiologischem, nicht-amyloidogenem Weg begünstigt und damit den pathogenen amyloidogenen APP-Abbau verhindert [56, 57]. Die APP-Spaltprodukte aus dem physiologischen Weg weisen neuroprotektive Eigenschaften auf. Neuronen von ALZHEIMER-Patienten, die eine hohe Konzentration an *hPin1* aufweisen, zeigen eine stark verminderte bis keine Zusammenlagerung der Tau-Proteine zu neurofibrillären Bündeln [58].

Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Situation in Nervenzellen kann eine hohe *hPin1*-Konzentration im Gehirngewebe krankheitserzeugend wirken. Im Gehirngewebe von *Morbus PARKINSON*-Patienten konnten in den für diese Krankheit typischen zytoplasmatischen Einschlüssen (LEWY-Körperchen) deutlich erhöhte *hPin1*-Konzentrationen nachgewiesen werden. Über die Bindung an Synphilin-1 beschleunigt *hPin1* indirekt die Entstehung krankheitserzeugender Proteinab-

lagerungen, die vor allem das synaptische Protein α -Synuclein enthalten, das unter anderem die Dopaminausschüttung durch Neuronen reguliert [59]. Bei dieser Krankheit scheint eine erhöhte hPin1-Konzentration ein entscheidender pathogener Faktor zu sein.

Tab. 1-1. Ausgewählte Mitglieder der Parvulinfamilie. Die Tabelle listet ausgewählte Parvuline auf, auf die in verschiedenen Kapiteln dieser Arbeit näher eingegangen wird.

Parvulin (UniProtKB)	Organismus	kDa	Zell-kompartiment	Funktion	Referenz
Par10/PpiC (POA9L5)	<i>E. coli</i>	10,1	Zytoplasma	stressinduzierte Proteinfaltung und Proteinstabilisierung	[26]
SurA/Par47 (POABZ6)	<i>E. coli</i>	47,0	Periplasma	Faltung von OMPs (<i>outer membrane proteins</i>)	[60, 61]
PpiD (POADY1)	<i>E. coli</i>	70,0	Zytoplasmamembran/ Periplasma	Faltung von OMPs (<i>outer membrane proteins</i>)	[62]
PrsA (P24327)	<i>B. subtilis</i>	32,5	Zytoplasmamembran/ Zytoplasma	Proteinsekretion, Proteinfaltung extrazellulärer Proteine	[63, 64]
PrsA (W8TV96)	<i>S. aureus</i>	35,6	Zytoplasmamembran/ Zytoplasma	Proteinsekretion, Proteinfaltung extrazellulärer Proteine	[65]
Ess1/Ptf1 (P22696)	<i>S. cerevisiae</i>	19,9	Zellkern	RNA-Polymerase II-Interaktion (Transkriptionselongation), prä-mRNA-Reifung	[66, 67]
Pin1At (Q9SL42)	<i>A. thaliana</i>	15,2	Zellmembran	Beeinflussung der Blütezeit durch Bindung der phosphorylierten Transkriptionsfaktoren SOC1, AGL24	[68, 69]
Dodo (P54353)	<i>D. melanogaster</i>	18,4	Zellkern	MAP-Kinase Signalweg	[70, 71]
hPin1/Par18 (Q13526)	<i>H. sapiens</i>	18,3	Zellkern	Kontrollfunktion im mitotischen Zellzyklus	[72]
hPin4/Par14 Isoform 1 (Q9Y237)	<i>H. sapiens</i>	14,0	Zellkern	Bindung an dsDNA, Beeinflussung von Chromatinstrukturen, Regulierung der Gentranskription	[73, 74]
hPin4/Par17 Isoform 2 (Q9Y237)	<i>H. sapiens</i>	16,6	Mitochondrium	Bindung an dsDNA, Mikrotubulibildung	[75, 76]

Humanes Pin1 zeigt wie die Sequenzhomologen Ess1 aus *Saccharomyces cerevisiae* [66] und Pin1At aus *Arabidopsis thaliana* [77] eine hohe Substratspezifität für phospho-Seryl-/phospho-Threonyl-Prolyl-Motive (*pSer/pThr-Pro-Motive*) und zählt damit zu den phosphatspezifischen Parvulinen. Interessanterweise wird diese Präferenz bei Ess1 und Pin1At durch eine N-terminal zur PPlase-Domäne gelegene WW-Domäne vermittelt, die allen übrigen pflanzlichen, phosphatspezifischen Parvulinen fehlt. Ess1 ist essentiell für Hefezellen und führt bei Deletionsmutanten zu keinem lebens-

fähigen Phänotyp [78]. Ess1 ist für die prä-mRNA-Reifung (Prozessierung des 3'-Endes) und für die Beendigung der Transkription notwendig. *hPin1* und Dodo aus *Drosophila melanogaster* können in *ess1*⁻-Hefestämmen die verlorengegangenen Funktionen wieder herstellen [72, 79]. Der gemeinsame *knock-down* der acht Cyps und vier FKBP's in Hefe führt dagegen zu keinem erkennbaren Phänotyp [80].

Neben den erwähnten Parvulinen aus Eukaryonten sind auch entsprechende Homologe in prokaryotischen Organismen, wie *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* bekannt. PrsA aus *S. aureus* und *S. pneumoniae* sind membranassoziierte Lipoproteine, welche über eine Parvulindomäne verfügen und für die korrekte Faltung von sezernierten und für Menschen teilweise toxischen Proteinen unverzichtbar sind [65, 81, 82] (Tab. 1-1). PrsA ist mit seinem N-terminalen Cysteinrest über einen 1,2-Diacylglycerinanker in der Bakterienmembran fixiert. Als Methicillin- und multiresistente grampositive Bakterienstämme können *S. aureus* und *S. pneumoniae* zum lebensbedrohlichen Wundbrand (Sepsis) beziehungsweise zu Infektionen der Atemwege beim Menschen führen [83-85]. Die Entwicklung neuartiger Inhibitoren gegen essentielle Parvuline von resistenten Krankheitserregern könnte damit zukünftig, neben der *hPin1*-Inhibitor-entwicklung [86-88], an Bedeutung gewinnen.

E. coli SurA verfügt neben zwei PPIase-Domänen über eine weitere strukturgebende N-terminale und eine kurze C-terminale Domäne. SurA ist für das Überleben einer *E. coli*-Zelle in der stationären Phase entscheidend [61], besitzt aber keine PPIase-Aktivität, sondern eine ATP-unabhängige Chaperonaktivität und unterstützt die Faltung membranständiger Proteine [60]. Ferner ist SurA für die Pilibildung pathogener *E. coli*-Stämme notwendig [89]. SurA-Moleküle, denen beide PPIase-Domänen fehlen und die ausschließlich aus ihren fusionierten N- und C-Domänen bestehen, behalten ihre biologische *in vivo* Funktion nahezu vollständig [32]. Außer SurA und dem im Folgenden näher beschriebenen Par10 besitzt *E. coli* weitere PPIasen, darunter auch PPIasen des Cyclophilin-(CypA, CypB) [90, 91] und FKBP-Typs (SlyD, FkpA) [92, 93]. Der ribosomenassoziierte Triggerfaktor besitzt eine katalytisch aktive PPIase-Domäne, die allerdings für seine *in vivo* Funktion als Chaperon für naszierende Polypeptidketten nicht erforderlich ist [94, 95].

Das für die Parvulinfamilie prototypische *E. coli* Parvulin 10 (vom lateinischen *parvulus* = sehr klein) selbst ist ein aus 92 AS bestehendes, als Monomer aktives, Zytoplasmprotein [26, 96]. Als nicht-phosphatspezifisches Parvulin, dessen dreidimensionale NMR-Struktur 2004 gelöst wurde [97], verfügt es nur über eine einzelne PPIase-Domäne ohne zusätzliche N- beziehungsweise C-terminale Erweiterungen oder Domänen. Demnach besteht Par10, wie in Abb. 1-2 gezeigt, aus vier β -Strängen, die allseitig von drei α -Helices und einer 3_{10} -Helix umgeben sind. Die β -Stränge 1 und 4 bilden ein im Proteinzentrum gelegenes, stark gekrümmtes antiparalleles β -Faltblatt, welches auch für andere Parvuline, wie *hPin1* und *hPar14*, charakteristisch ist ($\beta\alpha\alpha\beta\alpha\beta\beta$ -Parvulinfaltung). Dieses β -Faltblatt bildet zusammen mit den gegenüberliegenden und über eine Schlaufe miteinander verbundenen α -

Helices 2 und 3 eine Furche, welche von zum Teil hoch konservierten, vorrangig hydrophoben AS ausgekleidet wird (Leu¹⁰, Leu⁴⁹, Met⁵⁷, Val⁵⁸, Phe⁸¹, Ile⁸⁶) und eine potenzielle Substratbindungstasche darstellt. Eine Besonderheit der Par10-Struktur ist die Existenz der *cis*Gly⁷⁵-Pro⁷⁶-Bindung, auf die die autokatalytische Faltung des Par10 zurückgeführt wird [98].

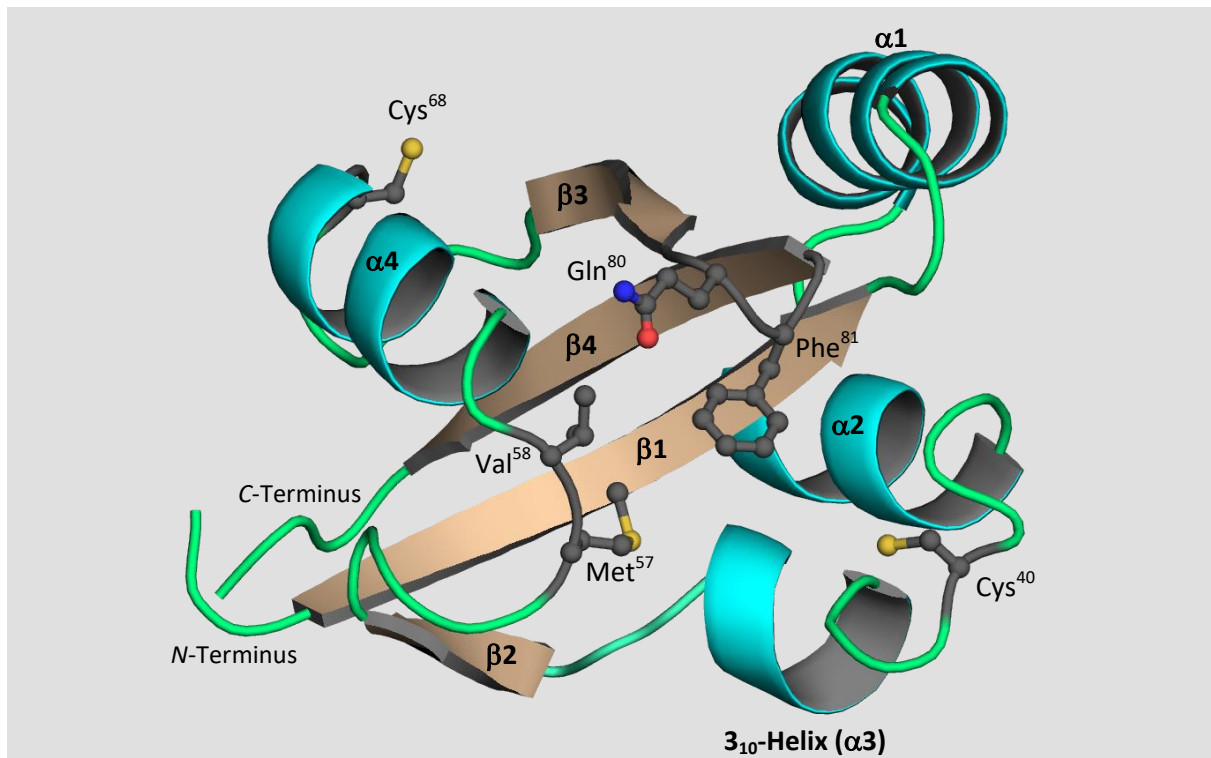


Abb. 1-2. NMR-Struktur des *E. coli* Parvulin 10. Bändermodell des Par10 bestehend aus einer 3_{10} -Helix (in Datenbanken auch als α_3 hinterlegt) und drei α -Helices (Cyan), vier β -Strängen (Ocker) und Schleifen (Hellgrün). In Kugel-Stab-Darstellung sind die in der vorliegenden Arbeit durch die Fluoreszenzsonde Dap(Abz) ausgetauschten Aminosäuren Met⁵⁷, Val⁵⁸, Gln⁸⁰ und Phe⁸¹ und die beiden im wtPar10 vorkommenden Cysteine Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸ gezeigt (Dunkelgrau = C-Atome, Blau = N-Atome, Rot = O-Atome, Gelb = S-Atome; PDB-ID: 1JNT, Darstellung: PyMol 1.4.1).

Die PPlase-Aktivität von Par10 lässt sich nicht wie bei den als Immunophile zusammengefassten Cyps und FKBP durch die Immunsuppressiva Cyclosporin A beziehungsweise FK506 inhibieren. Als erster irreversibler Par10-Inhibitor wurde Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon) beschrieben [99]. Juglon modifiziert in einer MICHAEL-Additionsreaktion die in Par10 und *h*Pin1 vorhandenen Cysteinseitenketten kovalent und induziert eine (teilweise) Entfaltung und den nachfolgenden Abbau dieser Parvulin-Juglon-Addukte innerhalb der Zelle. Wegen der unspezifischen Reaktion mit allen erreichbaren freien Cysteinen wird Juglon auch als Inaktivator bezeichnet. Juglon wirkt zytotoxisch, da es unter anderem die RNA-Polymerase II direkt inhibiert, und ist damit für eine therapeutische Anwendung bei Parvulin-assoziierten Erkrankungen ungeeignet [100]. Weitere synthetische *h*Pin1-, Par14- und Ess1-Inhibitoren sind meist vom Juglon abgeleitete polycyclische Verbindungen [101] sowie Peptidmimetika [102-104] oder Arylindanylketone [105], welche als vielversprechende Krebstherapeutika oder Antifungizide von hohem pharmazeutischen Interesse sind.

Der molekulare Mechanismus der parvulinkatalysierten PPIase-Reaktion ist weitgehend unverstanden. Die bereits an Parvulinen durchgeführten Mutationsexperimente, spektroskopischen Untersuchungen und Inhibitorstudien lieferten zwar Hinweise auf für die Katalyse essentielle Aminosäureseitenketten, ermöglichten dabei aber keine Formulierung eines überzeugenden, allgemein anerkannten Modells für den Katalysemechanismus. RANGANATHAN und Kollegen schlugen einen ersten Mechanismus vor, als es ihnen gelang, *hPin1* mit einem Ala-Pro-Dipeptid zu kristallisieren und die Raumstruktur zu lösen. Für die Autoren bildeten die Seitenketten von His⁵⁹, Cys¹¹³, Ser¹⁵⁴ und His¹⁵⁷ in *hPin1* ein funktionelles Cluster. Sie postulierten einen nukleophilen Angriff der Sulfhydrylseitenkette des Cys¹¹³ und eine kovalente Bindung von Cys¹¹³ an das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats. Die dabei entstehende negative Ladung am vormals Carbonyl-Sauerstoffatom sollte demnach über elektrostatische Wechselwirkungen mit der protonierten Seitenketten von His¹⁵⁷ stabilisiert werden. Allerdings besitzen einige Parvuline, darunter *hPar14*, eine Asparaginsäure anstelle der Cysteinseitenkette und damit ein weitaus schlechteres Nukleophil [106]. In *Pin1At* aus *Arabidopsis thaliana* zeigt die Cys⁷⁰-Seitenkette (entspricht Cys¹¹³ in *hPin1*) von der Substratbindungstasche und damit vom vermuteten katalytischen Zentrum weg [77]. Möglicherweise könnte hier eine in die hydrophobe Bindungstasche reichende Serinseitenkette (Ser⁷¹) die entsprechende Funktion von Cys¹¹³ in *hPin1* beziehungsweise Cys⁷⁰ in *Pin1At* übernehmen. In NMR-Titrationsexperimenten zeigen Ser⁷¹-Signale während der Zugabe eines Peptidliganden deutliche chemische Verschiebungsänderungen [77].

Ein Modell für eine nicht-kovalente Katalyse schlugen BEHRIN *et al.* vor, bei dem die negative Ladung einer deprotonierten Cystein- oder Asparaginsäureseitenkette den N-C-Doppelbindungscharakter einer Prolylbindung destabilisiert [107]. Durch die erhöhte negative Ladung in der Umgebung des partiell negativ geladenen Carbonyl-Sauerstoffatoms werden die delokalisierten Elektronen des Amidstickstoffes weniger stark zum Carbonylsauerstoff „gezogen“, dadurch eine Schwächung der energetischen Rotationsbarriere erreicht und damit die *cis/trans*-Isomerisierung einer Prolylbindung begünstigt.

Trotz intensiver Forschung sind die genauen molekularen Mechanismen der Isomerisierung von Xaa-Pro-Bindungen durch Parvuline weiterhin unzureichend verstanden. Es ist daher sinnvoll, sich dem prototypischen Par10 und einem vermuteten Par10-Bindungspartner zu widmen. Da Par10 nur eine katalytische Domäne besitzt, welche in anderen Parvulinen strukturell konserviert ist, und keinerlei Kofaktoren für die Substratumsetzung benötigt, eignet es sich als Modellenzym für komplexere Parvulinvertreter. Als bis *dato* einziger zellulärer Interaktionspartner von *E. coli* Par10 konnte die kleine Untereinheit C der Alkylhydroperoxid-Reduktase unter Verwendung eines GST-Par10-Fusionsproteins identifiziert werden [108]. Die Untersuchung dieser Par10-AhpC-Wechselwirkung war daher ein Hauptteil dieser Arbeit.

1.4 Alkylhydroperoxid-Reduktase Untereinheit C

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, welche sich unter dem Begriff Oxidantien zusammenfassen lassen, können Proteine, Lipide sowie DNA- und RNA-Moleküle in Zellen oft irreversibel schädigen und damit Alterungsprozesse und Krankheitsentstehungen beschleunigen [109-111]. Alle bekannten Organismen haben Enzymsysteme evolviert, um sich vor Oxidantien wie beispielsweise dem Hydroperoxid-Anion (-O_2^-), dem Hydroxyl-Radikal ($\text{HO}\cdot$) oder dem Peroxinitrit (NO_3^-) zu schützen. Zu diesen Enzymen gehören unter anderen die Katalase, die Superoxid-Dismutase und die Glutathionperoxidase.

Die Alkylhydroperoxid-Reduktase Untereinheit C (AhpC, UniProtKB: P0AE08) gehört als Oxidoreduktase (Enzymklasse) und Peroxidase (Enzym-Unterklasse) zur Enzymfamilie der ubiquitär in allen taxonomischen Domänen vorkommenden Peroxireduktasen⁴ (auch Peroxiredoxine [Prx], Thio-redoxin-Peroxidasen [TrxPx], EC-Nummer: 1.11.1.15), welche sich in typische und atypische 2-Cys- und 1-Cys-Peroxiredoxine und in weitere Subklassen unterteilen lassen [112, 113]. AhpC ist, wie Par10 auch, ein zytosolisches Protein, das in Bakterien- und Säugetierzellen in hoher Konzentration vorkommt (bis zu 5 μM [114, 115] bzw. 1 % der löslichen Proteinfraction [116]).

Die AhpC katalysiert unter anderem die Reduktion von Hydrogenperoxid, Alkylhydroperoxiden und Peroxinitriten (IUPAC: Hydrogen Oxoperoxonitrate) in die entsprechenden Alkohole beziehungsweise Stickstoffdioxid und Wasser. Damit reguliert AhpC das Redoxpotential von Zellen und schützt diese vor oxidativer Schädigung durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies [116, 117]. Ferner sind eukaryotische AhpC-Homologe zum Beispiel in Säugerzellen an Zytokin-induzierten Signalweiterleitungswegen [118] und an Apoptoseprozessen beteiligt [119].

Zwei identische AhpC-Monomere bilden in einer Kopf-Schwanz-Anordnung ein katalytisch aktives Homodimer, mit dem katalytischen Zentrum an der Interaktionsfläche beider Monomere. In Abhängigkeit zahlreicher Faktoren wie der AhpC-Konzentration oder des pH-Wertes, der Ionenstärke und des Redoxpotentials des Lösungsmittelsystems, schließen sich fünf dieser Dimere zu einem ringförmigen dekameren Komplex ($[\alpha_2]_5$) zusammen [115, 120, 121]. Eine Oxidation der AhpC-Moleküle durch hohe Peroxidkonzentrationen führt über die Bildung von Cysteinsulfin- ($\text{Cys-SO}_2\text{H}$) und Cysteinsulfonsäuren ($\text{Cys-SO}_3\text{H}$) ebenfalls ausschließlich zu dekameren AhpC-Formen und wird von manchen Wissenschaftlern als initialer Schritt bei der oxidativen Stressantwort in Zellen verstanden. Jedoch weisen einige Autoren einerseits darauf hin, dass die dafür notwendigen hohen Peroxidkonzentrationen in Zellen nicht erreicht werden könnten, ohne diese irreparabel zu schädigen

⁴ Die katalytische Aktivität der Peroxireduktasen (Peroxiredoxine) wird in dieser Arbeit, wie in der Fachliteratur, als Peroxidaseaktivität und nicht als Peroxireduktaseaktivität bezeichnet. Im Zusammenhang mit dem regenerierenden Katalyseschritt wird auch der Begriff ‚Disulfidreduktaseaktivität‘ verwendet.

[122]. Andererseits reparieren oder regenerieren spezielle Cysteinsulfinsäure-Reduktasen wie Sulfiredoxine (Srx) und Sestrine unter ATP-Verbrauch und in Anwesenheit von Mg^{2+} -Kationen die „überoxidierte Form“ typischer 2-Cys-Peroxiredoxine in vielen Organismen [123].

AhpC bildet zusammen mit der dimeren Alkylhydroperoxid-Reduktase Untereinheit F (AhpF, UniProtKB: C5W0U2) den Alkylhydroperoxid-Reduktase-Komplex (AhpR-Komplex). Je Monomer enthält AhpC als typisches 2-Cys-Peroxiredoxin einen *N*-terminal gelegenen peroxidaseaktiven (*peroxidatic*) Cysteinrest C_p (Cys⁴⁶) und einen regenerierenden (*resolving*) Cysteinrest am *C*-Terminus C_r (Cys¹⁶⁵, Abb. 3-2). Im Initialschritt reagiert das Schwefelatom der C_p -Seitenkette kovalent mit einem Substratmolekül zu S-Hydroxycystein (auch Cysteinsulfensäure, -Cys-S-OH). Die notwendige Thiolatform der C_p -Seitenkette wird durch einen Arginin- und Threoninrest stabilisiert. Durch den Angriff des Schwefels der C_r -Seitenkette einer zweiten Untereinheit entsteht eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen zwei AhpC-Monomeren. Dabei kommt es zu einer temporären lokalen Entfaltung der AhpC-Sekundärstruktur im Bereich des Katalysezentrums um Cys⁴⁶. Die Disulfidbrücke wird durch die FAD-abhängige Disulfidreduktase AhpF wieder gelöst, deren Regenerierung (Reduzierung) erfolgt durch die Oxidation von NAD(P)H+H⁺ zu NAD(P)⁺ und schließt den katalytischen Kreislauf.

Interessanterweise ist die zuvor genannte Par10-AhpC-Interaktion (Abschnitt 1.3) nicht die einzige in der Literatur beschriebene funktionale Wechselwirkung zwischen einem Peroxiredoxin und einer PPlase. In einem Peroxiredoxin VI (Prx VI) *protein overlay assay* konnten LEE und Mitarbeiter *humanes* Cyclophilin A (*hCypA*) als Bindungspartner für Prx VI ausmachen [124]. Nähere Untersuchungen ergaben, dass *hCypA* die antioxidierende Katalyseaktivität vom Prx VI erhöht. Ferner kann *hCypA* als allgemeiner Elektronendonator für die Peroxidasekatalyse aller bekannten *humanen* Prx-Isoformen (Prx I-VI) dienen.

Die Antioxidansfunktion der AhpC-Proteine und die durch oxidativen und hitzeinduzierten Stress hochregulierte Expression des *ahpC*-Gens [125] lassen eine mögliche AhpC-Par10-Interaktion und eine Par10-Beteiligung an der zellulären Stressantwort in Bakterienzellen vermuten [126]. In der Tat ergaben Untersuchungen an *ppiC*-defizienten *E. coli*-Stämmen (*ppiC* = wtPar10 codierender Genabschnitt) unter zusätzlichem Temperaturstress eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid [108]. Mit Hilfe eines neu entwickelten IANUS-Peptid-Microarray-Verfahrens⁵ (IANUS = *induced organization of structure by matrix-assisted togetherness*), konnten drei mit Par10

⁵ Der IANUS-Peptidarray erlaubt als Mikro-SPOT-Methode die Identifizierung von intermolekularen Kontaktstellen zweier Proteine aufgrund von detektierbaren Peptid-Peptid-Wechselwirkungen. Dazu wird ein trifunktionaler Linker auf einer Zellulosemembran immobilisiert und jeweils die Teilpeptidsequenz eines der beiden interagierenden Proteine daran in einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie geknüpft (z. B. überlappende 12mere). Die Peptide werden *N*-terminal mit unterschiedlichen Fluoreszenzsonden versehen, um in FRET-Experimenten interagierende Peptidpaare zu identifizieren.

interagierende AhpC-Sequenzabschnitte genauer identifiziert werden [126, 127]. Diese Studien waren unter anderen ein Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

1.5 Gewinnung und Modifizierung von Proteinen

Für die Beantwortung biologischer, biochemischer und biophysikalischer Fragestellungen müssen die hierfür relevanten Makromoleküle (z. B. Peptide, Proteine) in ausreichender Menge und Reinheit bereitgestellt werden, um Informationen zur Funktion, Struktur, Dynamik, Lokalisation oder zu Interaktionspartnern zu erhalten. Die meisten der heute verwendeten molekularbiologischen, chemischen und physikalischen Untersuchungsmethoden setzen eine selektive Markierung des Zielproteins für die eigentlichen *in vitro* oder *in vivo* durchgeführten Experimente voraus. Oftmals lassen sich die gewünschten Informationen erst durch den ortsspezifischen Einbau biophysikalischer Sonden, wie zum Beispiel Fluorophore, ESR-Sonden, Quervernetzungslinker oder NMR-aktive Isotope, erhalten.

Polypeptide und Proteine lassen sich aus natürlichen Quellen ribosomal, nicht-ribosomal oder chemisch gewinnen. Je nach Bedarf werden die homo- und heterologe *in vivo*-Genexpression in pro- und eukaryotischen Zellsystemen, die zellfreie *in vitro*-Translation und chemischen Syntheseverfahren genutzt [128-134]. Trotz einer steigenden Zahl direkter *in vivo* und *in vitro* Untersuchungsmethoden, welche die Proteine unverändert lassen, benötigt man häufig artifizielle Proteinmodifikationen oder -erweiterungen, um wissenschaftliche Fragestellungen beantworten zu können. Beispielhaft genannt seien die Substitution von Aminosäuren durch ortsgerechte Mutagenesen und die Einführung unnatürlicher Aminosäuren durch den Einsatz von chemisch modifizierten Aminoacyl-tRNAs (Stoppcodonunterdrückung) [135] oder ihren Einbau durch einen erhöhten Selektionsdruck (*selective pressure incorporation*) [136]. Des Weiteren sind die Manipulation von Seitenketten trifunktionaler Aminosäuren (Phosphorylierungen, Glykosylierungen, PEGylierung, etc.), das Einführen von Fluoreszenz- und ESR-Sonden, die Verwendung von Affinitätstags oder Fusionsproteinen, die Modifizierung des Peptidrückgrats und das Quervernetzen chemischer Gruppen innerhalb einer Proteinsequenz durch photoaktivierbare *cross-linker* etabliert [137-139]. All diese Techniken können helfen, die Wirkungsweise von Enzymen zu erforschen, Protein-Ligand-Interaktionen zu verstehen oder Proteine hinsichtlich gewünschter Eigenschaften zu optimieren. Unerwünschte Auswirkungen auf die chemischen, physikalischen und funktionellen Eigenschaften durch angewendete Proteinmodifizierungen müssen dabei stets berücksichtigt werden und können den Verlust der Raumstruktur und/oder der katalytischen Aktivität eines Enzyms zur Folge haben.

Die Kombination einzelner Methoden ermöglicht eine zusätzliche Erweiterung der Synthese- und Manipulationsmöglichkeiten von Peptiden und Proteinen. Die Verknüpfung von rekombinant erhaltenen mit chemisch synthetisierten Peptiden wird als Semisyntese bezeichnet [140] und wurde

in der vorliegenden Arbeit angewendet. Da die Verknüpfung mehrerer Einzelsegmente oft sequenziell durch chemische und enzymatische Ligationsmethoden erfolgt, spricht man auch von chemoenzymatischer Peptid-/Proteinsynthese. Mit der Anwendung einer Semisynthesestrategie lassen sich einzelne Nachteile der verschiedenen Proteinherstellungsverfahren oft überwinden.

Während die ribosomale Proteinbiosynthese Vorteile bei der Länge der zu synthetisierenden Proteine bietet, bleibt sie auf die 20 (23 mit Selenocystein, Pyrrolysin, Formylmethionin) proteinogenen Aminosäuren beschränkt. Demgegenüber lassen sich mit der Festphasenpeptidsynthese artifizielle Aminosäurederivate und eine nahezu unbegrenzte Anzahl von natürlichen und unnatürlichen Modifikationen in ein Peptid/Protein einbauen. So können beispielsweise einzelne nichtkanonische Aminosäuren in ein Protein eingefügt oder ganze Proteine aus D-Aminosäuren dargestellt werden, wie sie in der Natur nicht vorkommen. Mit der Festphasenpeptidsynthese (SPPS, *solid phase peptide synthesis*, Abb. A 4-1 [141, 142]) lassen sich gegenwärtig routinemäßig Peptide mit einer Gesamtlänge von bis zu 50 Aminosäurebausteinen schrittweise, halb- oder vollautomatisch in ausreichender Menge und Reinheit synthetisieren [143]. Nur unter Verwendung von Segmentligationsverfahren lassen sich deutlich größere funktionsfähige Proteine erhalten [144, 145].

Die derzeit am häufigsten verwendete Ligationsmethode ist die Natürlich Chemische Ligation (NCL, Abb. A 5-1 im Anhang) [146], die sich durch die vergleichsweise leichte Verfügbarkeit der Ausgangssegmente, durch milde Reaktionsbedingungen und durch die hohe Ausbeute von anderen Ligationsverfahren hervorhebt. Neben der NCL haben sich weitere Segmentligationsverfahren wie die enzymkatalysierte Ligation [147], die inteinvermittelte Ligation [148, 149], die „spurenlose“ STAUDINGER-Ligation [150] und Arten der Click-Chemie [151] (z. B. DIELS-ALDER-Konjugation [152] und MICHAEL-Additionen [153]) als Methoden zur Erzeugung von Peptiden bis hin zu kleineren Proteinen etabliert. Die genannten Methoden erlauben sowohl die Bildung der für Proteine natürlichen Peptidbindungen (Amidbindungen) als auch für Proteine unnatürliche Bindungstypen (z. B. Oxim- [154], Thioether-, Thioesterbindungen, [155]) und bieten darüber hinaus eine enorme Vielzahl an strukturellen und funktionellen Manipulationen von Peptiden und Proteinen.

Eine bedeutende Erweiterung des Spektrums an Ligationstechniken gelang durch die Verwendung enzymkatalysierter Verknüpfungen von Peptidsequenzen auf Basis der Umkehrbarkeit proteolytischer Reaktionen (reverse Proteolyse) und eines kinetisch kontrollierten Reaktionsverlaufs [147, 156, 157]. Hierfür wird ein Peptid in Form eines Acyldonator(thio)esters (Carboxykomponente, z.B. Peptidyl-4-guanidinophenylester) eingesetzt, welches unter Abspaltung der Esterfunktion und Bildung eines temporären Acyl-Enzym-Intermediats auf ein zweites Peptid (Aminokomponente) übertragen wird (Abb. A 6-1 im Anhang) [158]. Viele ursprüngliche Einschränkungen der enzymatischen Peptid- und Proteinsynthese, wie die geringe Substratspezifität und die unerwünschte proteolytische Aktivität (Sekundärhydrolyse), konnten mittlerweile überwunden werden. Vor allem die Kombination der Substratmimetikum vermittelten Proteinsynthese (*substrate engineering*) mit

speziell entwickelten Proteasen (*enzyme engineering*) ist für den Erfolg dieser Synthesestrategie verantwortlich, wie zahlreiche Anwendungsbeispiele belegen.

So wurde Subtiligase, eine S221C/P225A-Doppelmutante der Serinprotease Subtilisin BPN^I, zur Synthese einer 124 AS langen, vollständig aktiven RNase A verwendet. Neben der Darstellung der RNase A aus sechs kurzen Peptidsegmenten (12-30mere) gelang auch der Einbau des unnatürlichen Aminosäurederivates 4-Fluorhistidin anstelle zweier katalytischer Histidinseitenketten (His¹², His¹¹⁹) [159, 160]. Die Synthese eines Carboxyfluorescein-markierten 69merigen Prohormonderivates von Neuropeptid Y gelang mit der Glu/Asp-spezifische V8-Protease aus *Staphylococcus aureus* [133]. Die universelle Einsetzbarkeit der Substratmimetikumstrategie konnte bei der Synthese von Dekapeptiden und Undekapeptiden gezeigt werden. Hierbei wurden in Trypsin-, α -Chymotrypsin- und V8 Protease-katalysierten Segmentkondensationen N ^{α} -Boc-geschützte Peptide mit C-terminalen 4-Guanidinophenyl-, Phenyl- oder Mercaptopropionsäureesterfunktionen erfolgreich als Acyldonatoren eingesetzt [161]. 2014 gelang SCHMOHL und SCHWARZER in einer chemoenzymatischen Semisynthese die Darstellung eines 84 kDa großen Proteins aus drei Segmenten unter Verwendung der Transpeptidase Sortase A aus *S. aureus* mit einer gleichzeitigen Inkorporation synthetischer Peptide in das Aktivitätszentrum [145].

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die von Parvulinen und anderen Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen katalysierten Reaktionen sind an vielen lebensnotwendigen biologischen Prozessen beteiligt. Trotz intensiver Forschung sind die natürlichen Substrate (bis auf wenige Ausnahmen) und die genauen Katalysemechanismen der drei heute bekannten PPlasen-Familien noch unverstanden beziehungsweise Gegenstand anhaltender wissenschaftlicher Diskussionen. Insbesondere für die Familie der Parvuline wäre ein genaues Wissen um den Katalyse- und Wirkmechanismus von herausragender Bedeutung, da *humane* Parvuline (*hPin1*, *hPar14*, *hPar17*) mit schwerwiegenden Erkrankungen wie *Morbus ALZHEIMER*, *Morbus PARKINSON* und verschiedenen Krebsarten assoziiert sind.

Zudem ist bekannt, dass viele bakterielle Parvuline für ihre jeweiligen Organismen essentiell sind. Darunter befinden sich antibiotikaresistente Bakterienstämme (*S. aureus*, *S. pneumoniae*), welche beim Menschen Sepsen, septische Schocks und akute Lungenentzündungen auslösen können. Die Entwicklung wirksamer Parvulininhibitoren steht deshalb zunehmend im Mittelpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten. Ein tieferes Verständnis der Parvulinaktivität ist deshalb von hoher diagnostischer und therapeutischer Bedeutung für den Menschen.

In der vorliegenden Arbeit diente der prototypische Vertreter der Parvulinfamilie Par10 aus *E. coli* als Untersuchungsobjekt. Die zentralen Vorhaben dieser Arbeit waren die vermutete Substratbindungsstelle von Par10 anhand spektroskopischer und enzymkinetischer Untersuchungen näher zu studieren und neue modifizierte Par10-Varianten für zukünftige, tiefergehende Studien bereitzustellen und damit einen Beitrag zum Verständnis des *cis/trans*-Isomerisierungsmechanismus der nicht-phosphatspezifischen Parvuline zu leisten. Hierfür wurden die drei folgenden Schwerpunkte festgelegt und bearbeitet:

1. Es sollte die von BIRTE SCHELBERT beschriebene Interaktion zwischen Par10 und AhpC [108] mithilfe der NMR-Spektroskopie untersucht werden. Dazu sollten die genauen Strukturbereiche der Kontaktstellen der beiden Proteine bestimmt, miteinander wechselwirkende Aminosäureseitenketten identifiziert und ihre Wechselbeziehungen quantifiziert werden. Zu diesem Zweck sollten jeweils unmarkierte, ¹⁵N-markierte beziehungsweise ¹³C/¹⁵N-markierte Par10- und AhpC-Varianten für NMR-spektroskopische Untersuchungen bereitgestellt werden.

2. Ein weiteres Vorhaben war die pK_S-Wertbestimmung der Sulfhydrylgruppe von Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸ und damit die erstmalige Einschätzung der Nukleophilie dieser in Parvulinen hochkonservierten Seitenkettenfunktionen. Die Überprüfung einer möglichen Abhängigkeit der pK_S-Werte von der Länge der Parvulinpeptide und eventuell einhergehende Sekundärstrukturausbildungen sollten

ebenso untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollten zusätzliche Katalyse-, CD- und NMR-Studien helfen, die strukturelle und funktionelle Bedeutung von Cys⁴⁰ für Par10 besser zu verstehen.

3. Neben den strukturellen Untersuchungen von Par10 sollten auch katalytisch aktive Par10-Varianten erzeugt werden, welche am Rand ihrer vermuteten Substratbindungstasche Fluoreszenzmoleküle als biochemische Sonden enthalten sollten. Die Darstellung fluoreszenzmarkierter Parvuline sollte unter Anwendung einer Semisyntese-strategie mittels verschiedener Ligationsverfahren erfolgen und die erhaltenen Erkenntnisse hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf weitere, bakterielle und *humane* Parvulinvertreter diskutiert werden.

Hierfür war das aus 92 AS bestehende Par10 in drei Segmente zu unterteilen, welche rekombinant und chemisch herzustellen sowie chemisch (Natürlich Chemische Ligation) und enzymatisch (proteasekatalysiert) zu ligieren waren. Die Erzeugung der erforderlichen langkettigen Substratmimetika sollte durch eine Umesterung der durch die inteinvermittelten Synthesen bereitgestellten Ausgangsester erfolgen. Für die chemisch darzustellenden Segmente war beabsichtigt, die Fmoc-Festphasenpeptidsynthese einzusetzen. Dabei war auf eine Beibehaltung des natürlichen Peptidrückgrats und der Primärsequenz (mit Ausnahme der auszutauschenden Aminosäure) der PPIase zu achten. Es galt, die generelle Eignung dieser Synthesestrategie und die katalytische Aktivität der markierten Par10-Varianten zu zeigen.

Nach Bearbeitung all dieser Fragenkomplexe sollten die Ergebnisse dieser Arbeit zum besseren Verständnis der Protein-Protein-Interaktion zwischen Par10 und AhpC beitragen und Rückschlüsse auf *humane* Parvuline zulassen. Erfolgreich fluoreszenzmarkierte Parvulinderivate wären als „*active-site*“ Varianten neuartige Untersuchungsobjekte und für weiterführende Studien einsetzbar.

3 Materialien und Methoden

3.1 Liste der Hersteller und Zulieferer

Accelrys Inc.	San Diego, US
Advanced Chemistry Development Germany GmbH	Frankfurt, DE
AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
Applied Biosystems Deutschland GmbH	Darmstadt, DE
Applied Photophysics, Ltd	Leatherhead, GB
Beckman Coulter GmbH	Krefeld, DE
Biometra GmbH	Göttingen, DE
Bio-Rad Laboratories GmbH	München, DE
BMG Labtech GmbH	Ortenberg, DE
Bruker Bio-Spin GmbH	Rheinstetten, DE
Campro Scientific GmbH	Berlin, DE
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, DE
Clemens GmbH	Waldbüttelbrunn, DE
Deutsche METROHM GmbH & Co. KG	Filderstadt, DE
Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel	Leipzig, DE
Eppendorf AG	Hamburg, DE
Eurofins MWG GmbH	Ebersberg, DE
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, DE
Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
GE Healthcare GmbH	München, DE
Gilson Inc.	Middleton, US
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, DE
Hellma GmbH & Co. KG	Müllheim, DE
HMC-Europe GmbH	Tüssling, DE
Heraeus Sepatech GmbH	Osterode, DE
IKA-Werke GmbH und Co. KG	Staufen, DE
Implen GmbH	München, DE
Infors GmbH	Einsbach, DE
Iris Biotech GmbH	Marktredwitz, DE
Jasco Labor- und Datentechnik GmbH	Gross-Umstadt, DE
Kern & Sohn GmbH	Balingen, DE
Life Technologies GmbH	Darmstadt, DE
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren, DE
Magnus Manske	Köln, DE
Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Osterode, DE
Merck KGaA	Darmstadt, DE
Mettler-Toledo GmbH	Gießen, DE
MicroCal, LLC	Northampton, US
Microsoft Deutschland	Unterschleißheim, DE
Multi SynTech GmbH	Witten, DE

neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	Heidelberg, DE
New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, DE
OriginLab Corporation	Northampton, US
Orpegen Peptide Chemicals GmbH	Heidelberg, DE
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, DE
Perkin Elmer LAS GmbH	Rodgau, DE
Pharmacia LKB Biotechnology	Uppsala, SW
Phenomenex Ltd. Deutschland	Aschaffenburg, DE
Qiagen GmbH	Hilden, DE
Raytest GmbH	Straubenhardt, DE
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, DE
Schrödinger, LLC	New York, US
Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, DE
Shigemi Inc.	Allison Park, US
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, DE
SyStat Software GmbH	Wuppertal, DE
Thermo Electron LED GmbH	Niederelbert, DE
Thomson Reuters Corporation	Philadelphia, US
Tosoh Bioscience GmbH	Stuttgart, DE
Waters GmbH	Eschborn, DE
W. R. Grace & Co.-Conn.	Deerfield, US

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren, wenn nicht anders angegeben, kommerziell erhältlich und entsprachen dem Reinheitsgrad „*pro analysis*“ oder „*peptide synthesis grade*“. Sie wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den folgenden Firmen bezogen: AppliChem, Carl Roth, Fisher Scientific, Iris Biotech, Merck, Orpegen Peptide Chemicals, Serva Electrophoresis, Sigma-Aldrich.

Für die Festphasenpeptidsynthese wurden folgende Aminosäurederivate und polymere Träger verwendet: Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Val-OH (alle Orpegen Peptide Chemicals), Fmoc-L-Dap-OH, Boc-2-Abz-OH (Sigma-Aldrich), Boc-L-Lys(Boc)-OSu (Merck) sowie H-L-Ser(*t*Bu)-2-ClTrt-Harz (Harzbeladung: $0,49 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), H-L-Asn(Trt)-2-ClTrt-Harz (Harzbeladung: $0,48 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), Rink-Amid-Harz (MBHA-Harz, Substitution: $0,59 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) und 2-Chlortritylchlorid-Harz (unbeladen, 50-100 mesh, 1 % DVB, $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$; alle Harze von Iris Biotech).

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Greiner <i>Cellstar</i> 96-well Mikrotiterplatten	Sigma-Aldrich
Kryoröhrchen	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel
Konzentratoren Amicon Ultra-15 (3K und 10K)	Merck
Microcon Zentrifugen-Filtrierungseinheiten	
Ultracel YM-3	Sigma-Aldrich
Nitrocellulose-Filter MicronSep, 0,45 µm	Fisher Scientific
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel
Rotilabo-UV-Einmalküvetten, Halb-Mikro, 1,6 mL	Carl Roth
Pipettenspitzen	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel
Spritzenfilter, 0,45 µm, pyrogenfrei	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel
Syro-Reaktoren mit Teflonfritten	Multi SynTech
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel

3.2.3 PCR-Primer, Plasmide und *E. coli*-Stämme

Tab. 3-1. Primersequenzen für ortsgerichtete Mutagenesen, Einführung von Restriktionsschnittstellen und Sequenzierungen. Einfach unterstrichene Buchstaben kennzeichnen mutierte Codons, zweifach unterstrichene eingeführte Restriktionsschnittstellen.

Funktion	Primer ¹	Nukleotidsequenz (5' → 3')	GC-Gehalt	T _s ²
Parvulin 10 Cys ⁴⁰ Ala	vorwärts rückwärts	CGAAGAAACACTCCATT <u>GCCCC</u> ATCAGGCAAACGCGGC GCCGCGTTTGCTGATGGGG <u>CAAT</u> GGAGTGTTCCTCG	58 % 58 %	76 °C 76 °C
Parvulin 10 Cys ⁶⁸ Ala	vorwärts rückwärts	GTGGTTTTCTCTG <u>CTCC</u> GGTACTGGAGCC GGCTCCAGTACCGGAGCAGAGAAAACCAC	59 % 59 %	71 °C 71 °C
AhpC spaltbarer His-tag	vorwärts rückwärts	GG <u>CCATG</u> GGATCCTTGATTAACACCAAATTAACC TTA <u>AAGCTT</u> AGATTTTACCAACCAGGTCCAGAGACGGAGCC	42 % 48 %	68 °C 72 °C
AhpC verkürzter C-Terminus	vorwärts rückwärts	GG <u>CCATG</u> GGATCCTTGATTAACACCAAATTAACC TTA <u>AAGCTT</u> ATGCTTCACCTTCTTCCATTTAGCCGGGC	42 % 45 %	68 °C 70 °C
AhpC Thr ⁷⁷ Asp	vorwärts rückwärts	CCGATACTCACTT <u>CGACC</u> ACAAAGCATGGC GCCATGCTTTGTG <u>GTC</u> GAAAGTGAGTATCGG	53 % 53 %	70 °C 70 °C
Sequenz- ierung	T7-pro T7-ter	TAATACGACTCACTATAGGG GCTAGTTATTGCTCAGCGG	40 % 53 %	56 °C 60 °C
Sequenz- ierung	pQE-pro pQE-ter	GTTATTGTGCTGTCTCATC TCGATCTCAGTGGTATTTGTG	42 % 43 %	56 °C 59 °C

¹Eurofins MWG; ²Die Berechnung der Schmelztemperatur (T_s) erfolgte nach Gleichung (3-1) der Firma Eurofins MWG für Oligonukleotide zwischen 20 und 100 Nukleotideinheiten und einer Natrium-Kationenkonzentration zwischen 0,01 und 1,0 M.

$$T_s \text{ (}^\circ\text{C)} = 81,5 + 16,6 \cdot \log[\text{Na}^+] + \frac{41 \cdot (\text{G} + \text{C})}{\text{Gesamtlänge}} - \frac{500}{\text{Gesamtlänge}} \quad \text{Gleichung (3-1)}$$

Tab. 3-2. Übersicht der verwendeten Plasmide, eingefügten Genabschnitte und Expressionsstämme. Die durch Sequenzierungen bestätigten Nukleotidsequenzen der Inserts sind im Anhang A 1 aufgeführt.

Plasmid	Genname des Inserts	Schnittstellen	<i>E. coli</i> -Stamm	erhaltenes Protein	Herkunft
pTWIN2 ¹	<i>ppiC</i>	<i>NdeI</i> , <i>SapI</i>	ER2566 ¹	<i>E. coli</i> Par10 H-1-35-Intein	hausteigene Stammsammlung
pTWIN2 ¹	<i>ppiC</i>	<i>NdeI</i> , <i>SapI</i>	ER2566 ¹	<i>E. coli</i> Par10 1-67-Intein	hausteigene Stammsammlung
pQE60 ²	<i>ppiC</i>	<i>NcoI</i> , <i>BamHI</i>	M15 [pREP4] ²	<i>E. coli</i> Par10	MPF für Enzymologie der Proteinfaltung
pET28a(+) ³	<i>ppiC</i> (mutiert)	<i>NcoI</i> , <i>BamHI</i>	BL21 (DE3) ³	<i>E. coli</i> Par10 Cys ⁴⁰ Ala	vorliegende Arbeit
pET28a(+) ³	<i>ppiC</i> (mutiert)	<i>NcoI</i> , <i>BamHI</i>	BL21 (DE3) ³	<i>E. coli</i> Par10 Cys ⁶⁸ Ala	vorliegende Arbeit
pQE30 ²	<i>ahpC</i>	<i>BamHI</i> , <i>SacI</i>	M15 [pREP4] ²	<i>E. coli</i> 6xHis-tag-AhpC	MPF für Enzymologie der Proteinfaltung
pET30a(+) ³	<i>ahpC</i> (verkürzt)	<i>NcoI</i> , <i>HindIII</i>	BL21 (DE3) ³	<i>E. coli</i> 6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz mit spaltbarem N-term. 6xHis-tag u. verkürztem C-Terminus	vorliegende Arbeit
pQE30 ²	<i>ahpC</i> (mutiert)	<i>BamHI</i> , <i>SacI</i>	M15 [pREP4] ²	<i>E. coli</i> 6xHis-tag-AhpC T77D (Thr ⁷⁷ Asp-Mutante)	vorliegende Arbeit
pET30a(+) ³	<i>ahpC</i> (verkürzt, mutiert)	<i>NcoI</i> , <i>HindIII</i>	BL21 (DE3) ³	<i>E. coli</i> 6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz T77D mit spaltbarem N-term. 6xHis-tag, verkürztem C-Terminus und Thr ⁷⁷ Asp-Mutation	vorliegende Arbeit

¹New England Biolabs; ²Qiagen; ³Novagen/Merck

E. coli-Stamm

Genotyp

DH5α [162]	supE44 DlacU169 (f80 lac ZDM15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi relA1
ER2566 (NEB)	F ⁻ λ ⁻ <i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr) 114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]</i>
M15 [pREP4] [163]	<i>RecA</i> ⁺ <i>nal</i> ^s <i>str</i> ^s <i>rif</i> ^s <i>lac</i> - <i>Ara</i> ⁻ <i>gal</i> ⁻ <i>Mt</i> ⁻ <i>F</i> <i>Uvr</i> ⁺ <i>Lon</i> ⁺ <i>kan</i> ^r
BL21(DE3) [164]	<i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal dcm (λclts857 ind1 Sam7 min5 lacUV5-T7 gene1)</i>

3.2.4 Enzyme

Pfu DNA Polymerase	Fermentas
Phusion Hot Start High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
Taq-LC DNA Polymerase (rekombinant)	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas
BamH1, HindIII, NcoI und SacI	Fermentas
DpnI, NdeI und SapI	New England Biolabs
Enteropeptidase/Enterokinase (aus Kälberdarm)	Roche Diagnostics

Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich
Trypsin, rekombinant (aus Schweinepankreas)	Roche Diagnostics

3.2.5 Nährmedien, Stammlösungen und Puffer

DNA-Probenpuffer:	6X DNA Loading Dye (Fisher Scientific)
Farbstoff für Agarosegele:	SYBR Safe DNA gel stain (Life Technologies)
Laufpuffer für Agarosegele (TAE-Puffer):	40 mM Tris/HCl (pH 8), 20 mM Essigsäure, 4 mM EDTA
LB-Vollmedium [165]:	10 g·l ⁻¹ Pepton, 10 g·l ⁻¹ NaCl, 5 g·l ⁻¹ Hefeextrakt in H ₂ O, autoklaviert
LA-Agarplatten [165]:	LB-Vollmedium + 15 g·l ⁻¹ Agar, autoklaviert
M9-Minimalmedium: (verändert nach [166])	40 mM Na ₂ HPO ₄ , 22 mM KH ₂ PO ₄ , (pH 7,4), 18 mM NaCl, 18 mM ¹⁵ NH ₄ Cl (Campro Scientific), 2 mM MgSO ₄ , 100 μM CaCl ₂ , 80 μM Na ₂ EDTA, 100 μM FeCl ₃ , 10 μM CuSO ₄ , 10 μM MnSO ₄ , 1,5 μM ZnSO ₄ , 2 μM CoCl ₂ , autoklaviert + steril filtrierte MEM-Vitaminlösung (Endkonzentration: 1x), + steril filtrierte ¹³ C-D-Glukose-Lösung (Endkonzentration: 2 g·l ⁻¹ , Campro Scientific), + steril filtrierte Kanamycin-Stammlösung (1:1000 zugesetzt), alles in ddH ₂ O
Ampicillin-Stammlösung:	100 mg·ml ⁻¹ in ddH ₂ O, steril filtriert, im Verhältnis 1:1000 zugesetzt
Kanamycin-Stammlösung:	10 mg·ml ⁻¹ in ddH ₂ O, steril filtriert, im Verhältnis 1:1000 zugesetzt
IPTG-Stammlösung:	1 M in ddH ₂ O, steril filtriert, im Verhältnis 1:1000 zugesetzt
3x-SDS-Probenpuffer:	450 mM TRIS/HCl (pH 6,8), 12 % (v/v) Glycerin, 7,5 % (w/v) SDS, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 1,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-PAGE:	25 mM TRIS/HCl (pH 8,3), 0,2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
Laufpuffer für Tris-Tricine-PAGE:	100 mM Tris/100 mM Tricine (pH 8,3), 1 % (w/v) SDS
Rotiphorese Gel30:	gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 30%ige Lösung aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1)
Trenngelpuffer:	1,8 M TRIS/HCl (pH 8,8)
Sammelgelpuffer:	1,25 M TRIS/HCl (pH 6,8)
SDS-Stammlösung:	10 % (w/v) in ddH ₂ O
APS-Stammlösung:	10 % (w/v) in ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung:	0,2 % (w/v) Coomassie R250, 0,05 % (w/v) Coomassie G250, 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol, 17,5 % (v/v) Ethanol in ddH ₂ O
Entfärbelösung:	45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O

3.2.6 Standards und Reagenzienzusammenstellungen

GenRuler 100 bp DNA Ladder 100-1000 bp	Fisher Scientific
GenRuler 1 kb DNA Ladder 250-10000 bp	Fisher Scientific
PageRuler Prestained Protein Ladder 10-170 kDa	Fisher Scientific

High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics
High Pure PCR Cleanup Micro Kit	Roche Diagnostics

3.2.7 Säulenmaterialien

Umkehrphasenmaterial für Perfusions- und Hochleistungsflüssigkeitchromatografie:

POROS R2 (Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer) Standard C8 und C18 Phasen (<i>endcapped</i> Octyl- bzw. Octadecyl-modifizierte Kieselgelphasen	Applied Biosystems Grace, Macherey-Nagel, Phenomenex
--	---

Anionen- und Kationenaustauschmaterial:

DEAE-Sepharose Fast Flow	Sigma-Aldrich
Toyopearl SP650M	Tosoh Bioscience

Säulenmaterial für Affinitätschromatografie:

Chitin Beads (acetyliertes Chitosan)	New England Biolabs
HisTrap Fast Flow Crude (Nickel-Sepharose)	GE Healthcare

Säulenmaterial für Größenausschlusschromatografie:

Superdex 75 Prep Grade (Agarose-Dextran- Copolymer)	GE Healthcare
--	---------------

3.2.8 Allgemeine Geräte

Agarose-Gelelektrophorese BI0105 LVD	Biometra
Analysenwaage Excellence Plus XP56	Mettler-Toledo
Autoklav Hiclave HV-110 L	HMC-Europe
Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 2-4 LOC 1m	Martin Christ
Inkubationsschüttler Minitron	Infors
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Fisher Scientific
Küvettenschleuder KS 8 CE	Jasco Labor- und Datentechnik
Laborwaage Kern Emb 200-2	Kern & Sohn
Laborzentrifuge Allegra X-15R (SX4750A Rotor)	Beckman Coulter
Magnetrührer big-squid star	IKA-Werke
NanoPhotometer P300	Implen
PAGE-System Mini-Protean-Tetra-Cell	Bio-Rad Laboratories
Spannungsgerät Power Pac Basic für PAGE-System	Bio-Rad Laboratories
pH-Meter 713 pH	Deutsche METROHM
Präzisionswaage Kern PLS 360-3	Kern & Sohn
Reinstwassersystem TKA MicroPure	Thermo Electron LED
Rotationsverdampfer Laborata 4000 efficient	Heidolph Instruments
Sicherheitswerkbank Herasafe	Fisher Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Tischzentrifuge Centrifuge 5702	Eppendorf AG
Transilluminator IDA UVT-20M	Raytest
Ultrazentrifuge Optima L-90K (70Ti Rotor)	Beckman Coulter

UV/Vis Spektrophotometer S-3100
 Vortexmischer MS1 Minishaker
 Wipptisch Shaker DRS-12

Jasco Labor- und Datentechnik
 IKA-Werke
 neoLab Migge Laborbedarf

3.2.9 Computerprogramme und Datenbanken

Tab. 3-3. Übersicht der verwendeten Computerprogramme.

Name, Version	Hersteller	Verwendung
ACD/ChemSketch Freeware 11.02	Advanced Chemistry Development	Strukturzeichenprogramm
Breeze Software V 3.30	Waters	Analytische HPLC
CDNN CD Spectra Deconvolution Software 2.1	Applied Photophysics (Dr. GERALD BÖHM)	Analyse von CD-Spektren
FELIX 2000	Accelrys	NMR-Spektroskopie
EndNote X2	Thomson Reuters	Literaturverwaltungsprogramm
Gentle V 1.9.4	Magnus Manske	Betrachten von Nukleotidsequenzen
HT-Manager Version 1.2	Clemens	Programmierung des PCR-Systems
MassLynx 4.0 Software	Waters	Massenspektrometrische Analyse
MS Office 2007	Microsoft Deutschland	Text- und Grafikverarbeitung
Peptide Companion Version 1.24	CSPS Pharmaceuticals	Vorhersage schwierig zu synthetisierender Peptide
PyMOL Molecular Graphics System 1.4.1	Schrödinger	3D Grafikprogramm zum Betrachten von Biomolekülen
SigmaPlot 11.0.0.75	SyStat Software	Datenanalyse, Datenpräsentation
Synthesis Software for Syro Version 2.0.71	MultiSynTech	Steuerung des Syro II-Synthesizers
PrimeView 5.0	Amersham Biosciences	Bedienung Größenausschlusschromatografie
XWINNMR Version 3.5	Bruker Bio-Spin	NMR-Spektroskopie

Tab. 3-4. Übersicht der verwendeten Datenbanken und Internetseiten. Auf komplette *link*-Wiedergaben wurde verzichtet, da fortlaufende Aktualisierungen der Datenbanken erfolgen.

Internetadresse	Verwendung
web.www.expasy.org/protparam	Ermittlung von Proteineigenschaften [167]
web.www.expasy.org/peptide_cutter	Ermittlung von Trypsinspaltstellen [167]
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Datenbankabfragen mit BLAST [168]
http://pondr.com/cgi-bin/PONDR/pondr.cgi	Ermittlung von unstrukturierten Proteinbereichen
http://sparks-lab.org/SPINE-D/	Ermittlung von unstrukturierten Proteinbereichen
www.uniprot.org	bioinformatische Datenbank für Proteine
http://protcalc.sourceforge.net/	Protein Calculator v3.4, Berechnung theoretischer Molekülmassen isotopenmarkierter Proteine

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Polymerasekettenreaktion

Etablierte Standardprotokolle der Polymerasekettenreaktion (PCR) [169] fanden Anwendung bei der Amplifikation ausgewählter Bereiche genomischer DNA, der ortsgerichteten Mutagenese, der gezielten Einführung von Restriktionsschnittstellen für nachfolgende Klonierungen, dem Verkürzen von codierenden DNA-Abschnitten und bei der Kontrolle der Integration von DNA-Segmenten in die Plasmide (analytische PCR). Eine Übersicht der verwendeten Primer und Plasmide geben Tab. 3-1 und Tab. 3-2 wieder. Als Polymerasen kamen Pfu DNA Polymerase, Phusion Hot Start High Fidelity DNA Polymerase und Taq-LC DNA Polymerase zum Einsatz, welche zusammen mit von den Herstellern bereitgestellten Puffern eingesetzt wurden. Alle Reaktionen wurden in einem Thermozykler Primus HT4 der Firma Clemens durchgeführt, bei einer Denaturierungstemperatur von 95 °C, einer Elongationstemperatur von 72 °C und einer Zyklenanzahl von 25-35 Wiederholungen. Die Temperatur für die Primerhybridisierung wurde durch Abzug von 5-10 °C von der Schmelztemperatur (Gleichung (3-1)) des niedriger schmelzenden Primers erhalten.

3.3.2 Enzymatische Modifizierung von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau) zur Plasmid- und Insertpräparation erfolgte für 4 h mit anschließender Hitzeinaktivierung für 20 min. Für alle Enzyme wurden die von den Herstellern empfohlenen Puffer, Reaktions- und Inaktivierungstemperaturen verwendet.

Die Insertion von Genfragmenten in die korrespondierenden Plasmide erfolgte über Ligationsreaktionen mit der T4-DNA-Ligase für 4 h bei Raumtemperatur und anschließender Inaktivierung bei 80 °C für 20 min. Hierauf erfolgte die Transformation in chemokompetente *E. coli*-Zellen (Abschnitt 3.3.4).

Um parentale, methylierte (*template*)-DNA nach erfolgter ortsgerichteter Mutagenese abzubauen, wurden die Reaktionsansätze für 1 h bei 37 °C mit dem Enzym DpnI behandelt und danach in *E. coli*-Zellen, wie unter Abschnitt 3.3.4 erläutert, transformiert.

3.3.3 Auftrennung, Isolierung und Reinigung von DNA

Für die Auftrennung von DNA wurden 0,8-1%ige (w/v) Agarosegele (peqGOLD Universal-Agarose, Peqlab) verwendet, welche zur DNA-Visualisierung *SYBR Safe DNA gel stain* (Life Technologies) enthielten. Zu den DNA-Lösungen wurden 6xDNA *Loading Dye*-Probenpuffer (Fisher Scientific) zuge-

geben. Die Agarosegelelektrophoresen wurden unter Mitführung von DNA-Größenstandards bei einer Spannung von 80 V in TAE-Puffer durchgeführt.

Zur Isolierung ganzer Plasmide wurde ein *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) gemäß den Herstellervorgaben verwendet. Mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente oder durch Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA-Fragmente wurden entweder direkt aus den Reaktionsansätzen oder nach elektrophoretischer Auftrennung und Ausschneiden aus einem Agarosegel mit einem *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* oder *High Pure PCR Product Purification Kit* nach Anleitung des Herstellers Roche extrahiert.

3.3.4 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Für eine Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen entsprechend Tab. 3-2 verwendet [162]. Die bei -80 °C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gelagerten Zellen wurden 30 min auf Eis belassen und nach Zugabe von $50\text{-}100\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ Plasmid-DNA für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein 90 s dauernder Hitzeschock bei 42 °C , eine zweiminütige Erholungsphase auf Eis und die Zugabe von 500 μl LB-Medium zum Ansatz. Die Zellen wurden dann für 1 h bei 37 °C und 650 rpm geschüttelt und danach auf LA-Amp⁺-, LA-Kan⁺- oder LA-Amp⁺/LA-Kan⁺-Platten ausgestrichen. Es folgte die Inkubation für 12 h bei 37 °C .

3.3.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma Eurofins und diente der Bestätigung erfolgreicher Mutagenese- und Klonierungsarbeiten. Hierfür wurden jeweils 2 μg Plasmid-DNA und entsprechende Sequenzierprimer (Tab. 3-1) verwendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Gentle V 1.9.4 (MAGNUS MANSKE) analysiert.

3.3.6 Anlegen von Glycerinkryokulturen

Von nach 12 h vermehrten *E. coli*-Zellen wurden Einzelkolonien von den LA-Platten aufgenommen und in 5 ml Antibiotika enthaltendes LB-Medium inokuliert. Nach 12-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden davon 920 μl zu 80 μl 99%iges Glycerin in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Lagerung der Glycerinkryokulturen erfolgte bei -80 °C .

3.3.7 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen und Genexpression

Die Anzucht der *E. coli*-Zellen erfolgte in sterilen, Antibiotika enthaltenden LB-Medien bei 37 °C und 140 rpm in Schikanekolben in einem Minitron Inkubationsschüttler (Infors). Für Übernachtskulturen

wurden 30 ml LB-Medium mit Zellen einer Glycerinkryokultur inokuliert und bis zum nächsten Morgen inkubiert. Mit den erhaltenen Vorkulturen wurden die Hauptkulturen (Litermaßstab) in einem Volumenverhältnis von 1:100 inokuliert und bis zu einer $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$ wachsen gelassen. Die Genexpression zur Produktion rekombinanter Proteine wurde durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Induktion wurden die Kulturen für 4-6 h bei 37 °C beziehungsweise 20 °C (ER2566 Kulturen) geschüttelt, anschließend für 15 min 5000 x g (Allegra X-15R Laborzentrifuge, Beckman Coulter) bei 4 °C zentrifugiert und die erhaltenen Zellpellets bis zum Zellaufschluss bei -80 °C in Zentrifugenröhrchen gelagert.

Zur Anreicherung von ^{15}N - beziehungsweise $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Proteinen wurde anstelle des LB-Vollmediums M9-Minimalmedium verwendet, welches nur $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als einzige verfügbare Stickstoffquelle oder ^{13}C -D-Glukose als ausschließliche Kohlenstoffquelle und $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ enthielt.

3.4 Präparative Methoden

3.4.1 Zellaufschluss, Proteinreinigung und Proteinkonzentrierung

Die bei -80 °C gelagerten Zellpellets wurden im jeweiligen Reinigungspuffer resuspendiert (Tab. 3-5). Der Zellaufschluss erfolgte durch Lysozymzugabe in einer Endkonzentration von $0,1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ und einer 15 min Inkubationsphase, der sich ein Ultraschallaufschluss durch einen Branson Digital Sonifier W-250 D (2 min, 20 s mit Amplitude 40 %, 30 s Pause, Durchmesser der Metallspitze = 4,8 mm) anschloss. Durch Zentrifugation bei 90000 g für 45 min (Optima L-90K, Rotor 70Ti, Beckman Coulter) konnten die Überstände, welche die löslichen Proteine enthielten, von dem sedimentierten, festen Zellmaterial getrennt werden.

Die Separation und Reinigung der (Fusions)proteine wurde an FPLC-Anlagen der Firma Pharmacia, bestehend aus einer LKB Pump P-1 Peristaltikpumpe, einem LKB Uvicord SII Detektor (220 nm), LKB Rec 1 Messschreiber, einer BioCAD 700E Perfusion Chromatography Workstation (Applied Biosystems) und einem Äkta Prime Plus System (GE Healthcare) bei 8 °C durchgeführt. Es wurden etablierte Reinigungsmethoden eingesetzt [26, 170-172], welche zum Teil miteinander kombiniert wurden. Die einzelnen Reinigungsschritte sowie die Bedingungen für die Spaltung der Fusionsproteine sind in Tab. 3-5 zusammengefasst. Angaben zu den verwendeten Säulenmaterialien finden sich in Abschnitt 3.2.7.

Tab. 3-5. Übersicht über die in der Arbeit gereinigten rekombinanten Proteine und Peptidthioester.

rekombinates (Fusions)protein	1. Reinigungsschritt, Säulenmaterial	Puffer für 1. Reinigungsschritt	Spalt-/Elutionsschritt	Spalt-/Elutionspuffer	2. Reinigungsschritt, Säulenmaterial	Laufmittelsystem /Puffer für 2. Reinigungsschritt	gereinigte Proteine/Peptidthioester
Par10 H-1-35- <i>Mth</i> RIR1-CBD,	Affinitätschromatografie, Chitinsäule, <i>chitin beads</i>	<u>Intein-Puffer 1</u> 20 mM Tris/HCl, pH 7, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA	Thiol induzierte Spaltung mit MESNa	<u>Intein-Puffer 2</u> 20 mM Tris/HCl, pH 8,5, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM MESNa	Perfusionschromatografie, RP-Material Poros R2	<u>RP-Puffer</u> ddH ₂ O/ACN+0,1 % (v/v), Elution durch Gradienten steigender ACN-konzentration	Par10 H-1-35-MESNa Par10 H-1-67-MESNa (beide lyophilisiert)
Par10 wt, Par10 Cys ⁴⁰ -Ala, Par10 Cys ⁶⁸ -Ala	Ionenaustauschchromatografie, DEAE-Sepharose Fast Flow und Toyopearl SP650M kombiniert	<u>IEX-Puffer 1</u> 20 mM Tricine, pH 8, 2 mM DTT	Elution durch Gradienten steigender NaCl-konzentration	<u>IEX-Puffer 2</u> 20 mM Tricine, pH 8, 2 mM DTT, 500 mM NaCl	Größenausschlusschromatografie, HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade	<u>SEC-Puffer</u> 10 mM KP _i , pH 7,25, 100 mM KCl, 1 mM DTT	Par10 wt, Par10 Cys ⁴⁰ -Ala, Par10 Cys ⁶⁸ -Ala
6xHis-tag-AhpC, 6xHis-tag-AhpC Thr ⁷⁷ Asp	Metallchelataffinitätschromatografie, Ni ²⁺ -Sepharose, HisTrap Fast Flow Crude	<u>IMAC-Puffer 1</u> 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 2 mM DTT	Elution durch Gradienten steigender Imidazol-konzentration	<u>IMAC-Puffer 2</u> 20 mM Hepes, pH 7,4, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 2 mM DTT	Größenausschlusschromatografie, HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade	<u>SEC-Puffer</u> 10 mM KP _i , pH 7,25, 100 mM KCl, 1 mM DTT	6xHis-tag-AhpC, 6xHis-tag-AhpC Thr ⁷⁷ Asp
6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz, 6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz Thr ⁷⁷ Asp	Metallchelataffinitätschromatografie, Ni ²⁺ -Sepharose, HisTrap Fast Flow Crude	<u>IMAC-Puffer 1</u> 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 2 mM DTT	Elution (siehe oben) und anschließende 6xHis-tag Abspaltung durch Enteropeptidase	<u>IMAC-Puffer 2</u> (siehe oben) und <u>EP-Puffer</u> 50 mM Tris/HCl, pH 7,8	Größenausschlusschromatografie, HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade	<u>SEC-Puffer</u> 10 mM KP _i , pH 7,25, 100 mM KCl, 1 mM DTT	AhpC_kurz, AhpC_kurz Thr ⁷⁷ Asp

Verdünnte Proteinlösungen wurden durch Ultrafiltration mit Amicon Ultra-15 Filtrationseinheiten (NMWL: 3000 Da, 10000 Da, Merck) bis zur gewünschten Proteinkonzentration konzentriert, indem die Proteinlösungen bei 4 °C und 3000 g in einer Megafuge 1.0 mit Ausschwingrotor (Heraeus Sepatech) zentrifugiert wurden. Für Pufferwechsel wurden die Proteinlösungen gegen die neuen Puffer analog der Proteinkonzentrierung dialysiert.

Die nach Thiol-induzierter Spaltung erhaltenen Fraktionen, welche die Peptidthioester Par10 H-1-35-MESNa beziehungsweise Par10 H-1-67-MESNa (Abschnitt 3.4.2) enthielten, wurden lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Um Par10 H-1-35-MESNa als Substratmimetikum zusammen mit entsprechenden Nukleophilen für die Enzymatische Ligation (Abschnitt 3.5.2) einsetzen zu können, wurde der Peptidethansulfonsäurethioester (1 mM im Ansatz) in 2 M GdmCl, 50 mM NaP_i, pH 7,8 und 2 % (v/v) Benzylmercaptan bei Raumtemperatur zum Thiobenzylester umgeestert und anschließend semipräparativ über eine HPLC gereinigt.

3.4.2 Intein-vermittelte Peptidthioestersynthese

Die Par10 Segmente Par10 1-35 und Par10 1-67 wurden durch Intein-vermittelte Synthesen in Form rekombinanter, C-terminaler Peptid- α -thioester hergestellt. Die Firma New England Biolabs bietet hierfür ein IMPACT-TWIN (*Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-Binding Tag-Two Intein*) genanntes System [149] an, welches über einem pTWIN2 (*two intein*)-Vektor verfügt und auf dem Prinzip des natürlichen Proteinspleißens aufbaut [173]. Der pTWIN2-Vektor enthält neben einem T7 Promotor und einer multiplen Klonierungsstelle auch proteinkodierende DNA-Sequenzen zweier Inteine (*Ssp* DnaB und *Mth* RIR1) sowie zweier Chitin-Bindedomänen aus *Bacillus circulans* zur Affinitätsreinigung rekombinant erzeugter Fusionsproteine. Die erforderlichen Klonierungsschritte (durchgeführt von Dr. SANDRA LIEBSCHER) und die Peptidreinigungsstrategie sind in Abb. 3-1 dargestellt und erläutert, die verwendeten Puffer und Bedingungen sind in Tab. 3-5 zusammengefasst.

Durch eine N134A-Mutation am C-Terminus des verwendeten Intein 2 ist die selbständige Spleißaktivität aufgehoben. Trotzdem bleiben die N-S-Acylumlagerung am N-Terminus des Intein 2 sowie die Bildung einer Thioesterbindung zwischen dem C-Terminus des Zielproteins und dem N-terminalen Cystein des Inteins erhalten. Diese Thioesterbindung kann erst durch Zugabe exogener Thiole wie MESNa über einen Thiol-Thioester-Austausch gespalten werden.

Der für die meisten Inteine zutreffende allgemeine Mechanismus des Proteinspleißens beinhaltet eine Abfolge von vier nukleophilen Umlagerungsschritten, in deren Verlauf zwei Peptidbindungen gespalten werden und eine neue Peptidbindung geknüpft wird, und ist in den zitierten Übersichtsartikeln beschrieben [173, 174].

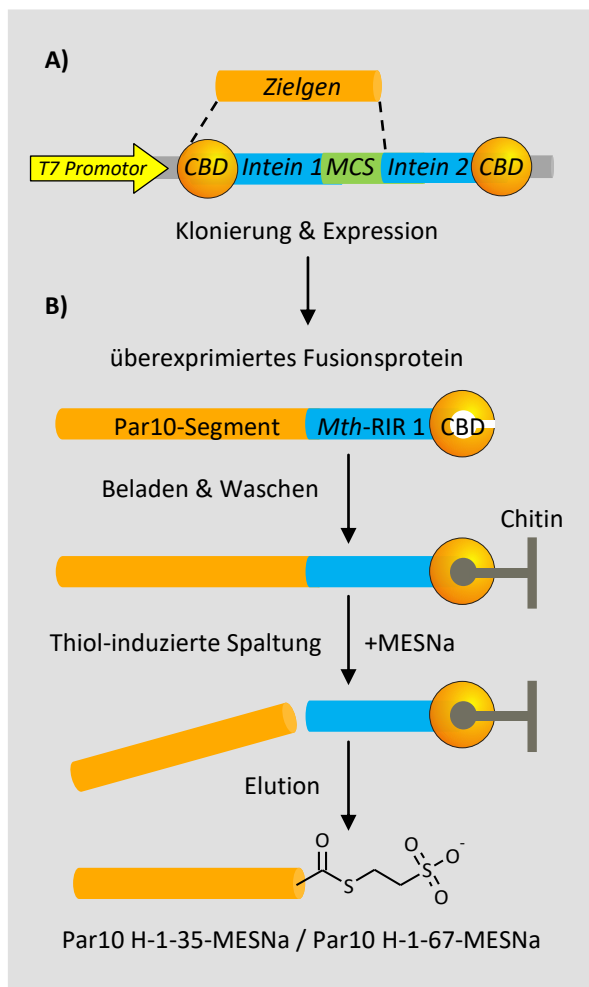


Abb. 3-1. Das IMPACT-TWIN-System. Das System dient unter anderem der Erzeugung rekombinanter C-terminaler Peptid- α -thioester. Abbildungen verändert nach [175].

A) Ausschnitt aus dem pTWIN2-Vektor. Um zum Peptid- α -thioester zu gelangen wird der Peptidcodierende Genabschnitt an das N-terminale Ende des 2. Inteins in den pTWIN2-Vektor einkloniert. Nach erfolgter Transkription und Translation ist das Zielpeptid am C-Terminus um ein Intein-tag, bestehend aus Intein 2 und Chitinbindedomäne, erweitert.

B) Affinitätsreinigung. Die Chitinbindedomäne ermöglicht die spezifische Bindung der Fusionsproteine an eine Chitosan-enthaltende Affinitätsmatrix [176]. Nachdem unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen wurden, lassen sich die Fusionsproteine durch Zugabe von 2-Mercaptoethansulfonsäure zielgenau spalten, als Peptid- α -thioester eluieren und final reinigen. (CBD: Chitinbindedomäne, MCS: multiple Klonierungsstelle, *Mth*: RIR 1-Intein der *Ribonucleoside-diphosphate-reductase α -subunit* aus *M. thermoautotrophicum*, MESNa: 2-Mercaptoethansulfonsäure Natriumsalz).

3.4.3 Festphasenpeptidsynthese

Die Peptide beziehungsweise Peptidthioester 2 bis 8 (Tab. 4-1) für die Herstellung fluoreszenzmarkierter Par10-Varianten wurden mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese und der Fmoc/*t*Butyl-Schutzgruppenstrategie [177-179] mit den unter Abschnitt 3.2.1 angegebenen Aminosäurederivaten und polymeren Trägern an einem Syro II Peptid-Synthesizer der Firma Multi SynTech hergestellt. Die Ansatzgrößen betragen 125 μ mol und es wurden 4 Äq. HCTU, 4 Äq. HOBt (Kupplungsreagenzien) in DMF, 10 Äq. DIPEA (Aktivatorbase) in NMP und 4 Äq. der entsprechenden Aminosäurederivate in DMF/NMP für Doppelkupplungsschritte (2 x 30 min) eingesetzt.

Die in verschiedenen Positionen eingebrachte Fluoreszenzsonde Dap(Abz) wurde als Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH aus den kommerziell erhältlichen Vorstufen Fmoc-L-Dap-OH*HCl (1 Äq.) und Boc-2-Abz-OH (2 Äq.) synthetisiert und analog zu den übrigen Fmoc-Aminosäurederivaten eingesetzt. Der 2,3-Diaminopropionsäurerest (Dap) bildete dabei das natürliche Peptidrückgrat nach und der 2-Aminobenzoylrest sollte sich als Fluorophor bei einer Wellenlänge von 320 nm anregen lassen und bei 420 nm Licht emittieren. Für die Synthese wurde 1 Äq. Boc-2-Abz-OH in wasserfreiem DCM gelöst und mit 1 Äq. *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1,1 Äq. HOBt für 30 min auf Eis aktiviert und anschließend langsam zu einem Gemisch aus 1 Äq. Fmoc-L-Dap-OH und 2 Äq. DIPEA (beides gelöst in wasserfreiem DCM) getropft. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatografisch verfolgt (DC-

Material: TLC silica gel 60, Merck, Laufmittelsystem: Essigsäureethylester/Methanol/Essigsäure = 9:1:0,1, Detektion: 254 nm). Nach 4 h erfolgte die wässrig-saure Aufarbeitung im Scheidetrichter. Der Ansatz wurde hierzu zweimal mit 1 N HCl-Lösung und dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, die organische Phase mittels Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeengt. Die finale Reinigung des Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH erfolgte über eine präparative Kieselgelsäule (Kieselgel 60, Korngröße: 0,04-0,063 mm, Merck; Laufmittel: Essigsäureethylester/ Methanol/Essigsäure = 9:1:0,1).

Ein Gemisch aus 2 % (v/v) Piperidin und 2 % (v/v) DBU in DMF diente bei allen Festphasenpeptidsynthesen als Fmoc-Abspaltlösung (3 x 5 min). Ein TFA/TIS/ddH₂O-Gemisch (18:1:1) wurde für die Schutzgruppenabspaltung der vollständig synthetisierten Peptide mit freien *N*- und *C*-Termini (Par10 H-68-92-OH-Peptide) und für die Freisetzung dieser Peptide vom polymeren Träger benutzt. Nach dem Abdampfen der Trifluoressigsäure und Etherfällungs- und Etherwaschschritten, wurden die Rohprodukte bei -20 °C bis zur Reinigung gelagert (Abschnitt 3.4.4).

Für die Generierung der Peptidthioester 3 bis 5 (Tab. 4-1) wurde im letzten Kupplungsschritt (Aminosäureposition 36) ein *N*-terminal Boc-geschütztes Lysinderivat verwendet. Die Peptide wurden anschließend mit HFIP/DCM (3:7) vollgeschützt vom polymeren Träger abgespalten [180], mit Isopropanol gewaschen, vollständig eingeengt, getrocknet und nachfolgend mit 30 Äq. MESNa und 5 Äq. DIC in wasserfreiem DCM unter basischen Bedingungen (mit DIPEA titriert) für 4 h bei Raumtemperatur verestert (modifiziert nach [181]). Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer folgten die Schutzgruppenabspaltung, das Abdampfen der Trifluoressigsäure, Etherfällungen und die Aufbewahrung der Rohprodukte bei -20 °C bis zur Reinigung (Abschnitt 3.4.4).

Für die Synthese von AhpC¹⁻¹⁶ und AhpC¹¹⁵⁻¹³², welche für die Kompetitionsbindungsstudien eingesetzt wurden, wurde anstelle der 2-Chlortritylchlorid-Harze ein Rink-Amid-Harz (MBHA-Harz, Substitution: 0,59 mmol·g⁻¹) verwendet und im letzten automatisierten Syntheseschritt der freie *N*-Terminus von AhpC¹⁻¹⁶ und AhpC¹¹⁵⁻¹³² dreimal mit einer Essigsäureanhydrid/DIPEA/DMF-Lösung (1:1:8) acetyliert. Die Freisetzung dieser Peptide von den polymeren Trägern und ihre Reinigung erfolgten wie für die Par10 H-68-92-OH-Peptide beschrieben (dieser Abschnitt und Abschnitt 3.4.4).

AhpC¹¹⁵⁻¹³² für die kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen der Par10-AhpC-Wechselwirkung (Abschnitt 4.2.2) wurde freundlicherweise von Dr. GÜNTHER JAHREIS (MPF) zur Verfügung gestellt.

Die Peptide Par10 Ac-29-43-NH₂ und Par10 Ac-29-48-NH₂ für die p*K*_S-Wertbestimmung der Sulfhydrylgruppe von Cys⁴⁰ wurden dankenswerterweise von Dr. BIANKA HARTRODT synthetisiert und in Titrationsversuchen eingesetzt (Abschnitt 4.7).

3.4.4 Peptid- und Peptidthioesterreinigung

Die Rohprodukte der Peptid- und Peptidthioestersynthesen sowie der Fluoreszenzbaustein Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH (Abschnitt 3.4.3) und Quencher 2-Iod-*N*-(4-nitrophenyl)acetamid (2-INPA) wurden präparativ an einem Gilson RP-HPLC-System folgender Spezifikation gereinigt: Gilson 118 UV/VIS Detector, Gilson 305 Pump (ddH₂O +0,1 % TFA), Gilson 306 Pump (Acetonitril +0,1 % TFA), Gilson 811C Dynamic Mixer, Gilson 806 Manometric Module. Es wurden folgende Säulen abhängig von der zu reinigenden Rohproduktmenge und den Peptideigenschaften verwendet: SP Nucleosil C8, 250 x 10 mm, 7 µm; SP Nucleosil C18, 250 x 10 mm, 7 µm; SP Nucleosil C8, 250 x 21 mm, 7 µm (alle Macherey-Nagel) und Hibar Pre-Packed LiChrosorp Column, RP-8, 250 x 25 mm, 7 µm (Merck).

Die Produkt-enthaltenden Fraktionen mit der korrekten Molekülmasse $[M+H]^+$ (bestimmt mittels ESI-MS) und einer Reinheit >95 % (analytische HPLC) wurden vereint, lyophilisiert (Christ Alpha 2-4 LOC 1m) und bei -20 °C gelagert.

3.5 Segmentkondensationen

Um zu vollständigen Par10 Proteinen zu gelangen, welche durch die Einführung einer Fluoreszenzsonde im putativen Substratbindungsbereich modifiziert waren, wurden Segmentligationen der einzelnen Par10-Peptidsegmente (Abschnitte 3.4.2, 3.4.3 und Tab. 4-1) durchgeführt. Es kamen hierbei die Natürlich Chemische Ligation⁶ (NCL, Abb. A 5-1 im Anhang [146]), die Ligation Exprimierter Proteine (EPL, [148]) und eine Enzymatische Ligation (EL, Abb. A 6-1 im Anhang [182]) mit einer in der Arbeitsgruppe entwickelten Trypsinvariante [183] zur Anwendung (Abb. 4-8).

3.5.1 Natürlich Chemische Ligation

Die Natürlich Chemische Ligation (NCL) kann zur Verknüpfung eines Peptid- α -thioesters mit einem *N*-terminal Cystein-enthaltenden Peptid unter Ausbildung einer nativen Peptidbindung zu längeren Peptiden oder Proteinen genutzt werden (Abb. A 5-1 im Anhang) [146].

Die eigenen NCL-Ansätze wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 4 M GdmCl, 50 mM NaPi, pH 8, 1 % (v/v) Thiophenol (PhSH) und 1 mM TCEP bei 25 °C durchgeführt und dienten der Verknüpfung

⁶ Von **Natürlich Chemischer Ligation (NCL)** spricht man streng genommen nur, wenn Carboxykomponente (*C*-terminaler Peptidthioester) und Aminokomponente (meist ein *N*-terminales Cys-Peptid), welche kovalent verknüpft werden, chemisch synthetisiert wurden. Wird hingegen mindestens eine Komponente rekombinant erzeugt (wie in dieser Arbeit geschehen), spricht man genauer von der **Ligation Exprimierter Proteine (EPL, Expressed Protein Ligation)**. Da die eigenen chemischen Ligationen unter denaturierenden Bedingungen und zwischen Peptiden/Peptidthioestern durchgeführt wurden, wird der besseren Lesbarkeit halber nur der Überbegriff NCL verwendet.

des N-terminalen Par10-Segments H-1-67-MESNa (Par10-Peptid 2 als Carboxykomponente) beziehungsweise der mittleren Segmente (Par10-Peptide 3, 4 und 5 als Carboxykomponenten) und den C-terminalen Segmenten (Par10-Peptide 6,7, und 8 als Aminokomponenten). Die Anfangskonzentrationen der zu verknüpfenden Peptidsegmente betragen je 2 mM. Das in den Ansätzen enthaltene GdmCl diente der besseren Löslichkeit der bei hohen Konzentrationen in wässrigen Puffersystemen schwer löslichen Peptide und das hinzugegebene Thiophenol erlaubte eine *in situ* Umesterung der eingesetzten Peptidylalkylthioester zu den reaktiveren Peptidylarylthioestern [184]. Nach 2 h wurden die Reaktionen mit einer 50%igen (v/v) Essigsäurelösung abgestoppt und das Produkt semipräparativ mittels RP-HPLC (3.6.3) isoliert, lyophilisiert und für die Enzymatische Ligation zugänglich gemacht.

3.5.2 Enzymatische Ligation

Unter Verwendung Enzymatischer Ligationen wurden Par10 H-1-35-SBn-Segmente mit den mittels einer NCL entstandenen fluoreszenzmarkierten Par10 H-36-92-OH Peptiden verknüpft. Die Ligationen erfolgten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Puffer aus 100 mM HEPES (pH 7,8), 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 20 µM und ZnCl₂ bei 25 °C mit einer als Trypsiligase⁷ bezeichneten Trypsinvariante als Biokatalysator. Bei diesem Enzym handelte es sich um eine in der Arbeitsgruppe entwickelte Vierfachmutante des anionischen Rattentrypsin 2 (Tn K60E/N143H/E151H/D189K) aus *Rattus norvegicus* [183]. Die Trypsiligase verfügt über die Substraterkennungssequenz Tyr-Arg-His, welche in natürlichen Proteinsequenzen zu nur circa 0,5 % vorkommt. Folglich besitzt dieses Enzym eine sehr restriktive proteolytische Aktivität und kann unter Verwendung eines Substratmimetikums in einem kinetisch kontrollierten Ansatz zur enzymkatalysierten Ligation eingesetzt werden („reverse Proteolyse“). Da sich die spezifitätsvermittelnde chemische Funktion in der Esterabgangsgruppe des Mimetikums befindet, ist die Erkennungsstelle der Trypsiligase im Ligationsprodukt nicht mehr vorhanden und eine Sekundärhydrolyse der gebildeten Produkte ausgeschlossen [185] (Abb. A 6-1, Anhang).

Die Ausgangssegmente wurden im Reaktionspuffer mit 5 % DMSO (v/v), 2 M GdmCl und 3 mM TCEP gelöst und in einer Endkonzentration von 1 mM für den Thiobenzylester (Carboxykomponente/Acyldonator/Substratmimetikum) und 3 mM für das Nukleophil (Aminokomponente/Acylakzeptor) eingesetzt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe des Enzyms ($c_{\text{End}} = 10 \mu\text{M}$). Nach 1 h wurden die Reaktionsansätze mit einer 50%igen (v/v) Essigsäurelösung abgestoppt. Die

⁷ Bei der **Trypsiligase** genannten Trypsin-Vierfach-Variante handelt es sich um eine Hydrolase. Der Name Trypsiligase ist in Anlehnung an die Hydrolase (genauer Peptidase) Subtiligase gewählt wurden, welche ebenfalls für die Semisynthese von Proteinen eingesetzt wird [158].

Produkte wurden von den Edukten mittels RP-HPLC (3.6.3) getrennt, anschließend gefriergetrocknet und für die späteren Charakterisierungen bei -20 °C gelagert.

3.5.3 Synthese des Quenchers 2-INPA

2-Iod-*N*-(4-nitrophenyl)acetamid (2-INPA) wurde als sulfhydrylreaktive Verbindung (aufgrund der Iodacetylfunktion) für die kovalente Modifizierung der fluorophoren Par10-Varianten eingesetzt und sollte zusammen mit den in die Par10-Varianten eingebrachten Fluoreszenzsonden (Dap(Abz), Abschnitt 3.4.3) Fluorophor-Quencher-Paare bilden (Abschnitt 3.6.8).

Für die 2-INPA-Synthese reagierte unter Lichtausschluss 1 Äq. Iodacetylchlorid mit 2 Äq. 4-Nitroanilin in THF bei 0 °C. Der Reaktionsansatz wurde nach 1 h je zweimal mit 10%iger (w/v) Na₂S₂O₃-Lösung und im Anschluss mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wurde nach dem Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum an einem Rotationsverdampfer mittels einer präparativen HPLC gereinigt (Abschnitt 3.4.4) und das Endprodukt anhand massenspektrometrischer Untersuchungen nachgewiesen (Abschnitt 4.8).

Bei den Modifizierungsreaktionen von Par10 mit 2-INPA wurden je 5 µM Parvulin mit 5, 10 und 15 µM 2-INPA bei 25 °C unter Lichtausschluss in 10 mM KP_i (pH 7,25) und 100 mM KCl für 10 min umgesetzt. Die Reaktionen wurden mit 50%iger (v/v) Essigsäure abgestoppt und mittels Massenspektrometrie analysiert (Abb. 4-19 C).

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 Nukleinsäure-, Peptid- und Proteinquantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung gereinigter Nukleinsäuren und Proteine erfolgte spektrophotometrisch unter Verwendung des NanoPhotometers und zweier angepasster LAMBERT-BEER'schen Gleichungen:

$$[\text{Nukleinsäure}] (\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}) = A_{260 \text{ nm}} \cdot F_{\text{dsDNA}} \cdot F_{\text{lid}} \cdot F_{\text{Verd.}} \quad \text{Gleichung (3-2)}$$

$A_{260 \text{ nm}}$ = Absorption bei 260 nm in AU

F_{dsDNA} = 50 ng·µl⁻¹ (Faktor für dsDNA)

F_{lid} = 10 (gerätspezifischer Faktor)

$F_{\text{Verd.}}$ = Verdünnungsfaktor

$$[\text{Protein}] (\text{M}) = \frac{A_{280 \text{ nm}}}{\epsilon_{280 \text{ nm}}(\text{Protein}) \cdot d} \cdot F_{\text{Verd.}} \quad \text{Gleichung (3-3)}$$

$\epsilon_{280 \text{ nm}}$ = molarer dekadischer Extinktionkoeffizient in M⁻¹ · cm⁻¹

$A_{280 \text{ nm}}$ = Absorption bei 280 nm in AU

d = Schichtdicke in cm

$\epsilon_{280 \text{ nm}}(\text{Par10}) = 2980 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$\epsilon_{280 \text{ nm}}(\text{AhpC}) = 23950 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$F_{\text{Verd.}}$ = Verdünnungsfaktor

Die molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten der untersuchten Proteine wurden anhand der primären Aminosäuresequenzen mit dem Programm *ProtParam* (ExPASy) [167] berechnet. Die Konzentrationen der Peptid- und Peptidthioesterlösungen wurden über die Einwaage lyophilisierter Aliquots erhalten.

3.6.2 Denaturierende und native Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur qualitativen Überprüfung wurden die Peptide und Proteine elektrophoretisch mittels diskontinuierlicher, denaturierender 17,5%iger SDS-PAGE nach LAEMMLI [186] getrennt und analysiert. Proben wurden für 5 min bei 95 °C in Probenpuffer reduziert und denaturiert und anschließend zusammen mit einem Proteingrößenstandard bei einer Stromstärke von 25 mA in SDS-Laufpuffer getrennt. Der Nachweis der getrennten Peptide und Proteine erfolgte mittels Coomassie-Blau-Färbung [187] und anschließender selektiver Entfärbung oder einer Silberfärbung nach NESTERENKO *et al.* [188].

Für die Auftrennung kleiner Parvulinsegmente (<7 kDa) und für die Kontrolle der Segmentkondensationen eigneten sich besonders 18%ige Tris-Tricine-Gelelektrophoresen mit einem Acrylamidquervernetzungsgrad von 5 % (verändert nach [189]). Bei nativen, nicht-denaturierenden Gelelektrophoresen wurde auf reduzierende Reagenzien (2-Mercaptoethanol, DTT) und denaturierende Bedingungen (SDS-Zugabe, Erhitzen auf 95 °C) verzichtet. Gelelektrophoresen unter nativen Bedingungen dienten der Untersuchung von Oligomerisierungszuständen einzelner AhpC-Präparationen in Vorbereitung auf die kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen und für Quervernetzungsstudien zwischen AhpC und Parvulin.

3.6.3 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Die analytische Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (RP-HPLC) diente der Reinheitskontrolle und Charakterisierung der synthetisierten Peptide und gereinigten Proteine. HPLC-Analysen wurden an einem Waters HPLC-System, bestehend aus einem *717 plus Autosampler*, einer *1525 Binary HPLC Pump*, und einem *2487 Dual λ Absorbance Detector*, durchgeführt. Als Laufmittelsystem diente ddH₂O (+0,05 % (v/v) TFA)/Acetonitril (+0,05 % (v/v) TFA). Die Trennungen erfolgten über eine C18-Säule des Herstellers Grace (Grace Vydac Protein + Peptide C18, 300 Å, 4,6 x 250 mm, 5 μ m) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml·min⁻¹ und verschiedenen Gradienten. Die Detektion erfolgte immer bei 220 nm und probenabhängig zusätzlich bei 254, 280, oder 320 nm. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten semipräparativen Trennungen (Abschnitt 3.5) geschahen ebenfalls unter diesen Bedingungen.

3.6.4 Massenspektrometrische Untersuchungen

Massenspektrometrische Analysen dienen der Überprüfung des Fortschreitens der Peptidsynthesen und zur Charakterisierung der gereinigten und modifizierten Peptide/Proteine. Hierfür wurde ein RP-HPLC-ESI-MS-System (Waters) bestehend aus einer HPLC-Anlage (2767 Sample Manager, 1525 Binary HPLC Pump, 2487 Dual λ Absorbance Detector, Säule: XTERRA MS C18 2,1 x 50 mm, 3,5 μ m) und einem *micromass*Z_Q-Gerät (Ionenquelle: Elektrospray-Ionisierung im Positivmodus, Massenanalysator: Single Quadrupol, Detektor: Photomultiplier) verwendet, in welchem die Massen der Peptid- und Proteinproben und der ligierten Segmente bestimmt wurden [190]. Über die Verknüpfung von RP-HPLC und ESI-MS ließen sich den einzelnen Peaks im HPLC-Chromatogramm die korrespondierenden Molekülmassen über den Gesamtionenstrom (TIC, *Total Ion Current*) zuordnen.

Bei einer Flussgeschwindigkeit von 300-500 μ l·min⁻¹ wurden je 30-50 Einzelmessungen akkumuliert (Kapillarspannung = 3,5 kV, Konusspannung = 28 V, *source*-Temperatur = 120 °C, *desolvation*-Temperatur = 250 °C) und daraus mit Hilfe der MassLynx 4.0 Software (Waters) die entsprechenden Masse/Ladungsverhältnisse (*m/z*) beziehungsweise unter Verwendung des MaxEnt-Algorithmus [191] die Molekülmassen in Da ($[M+H]^+$) errechnet.

3.6.5 Limitierte Proteolyse

Mittels zeitabhängiger limitierter Proteolyse wurden wtPar10, Par10 C40A und Par10 C68A hinsichtlich ihrer Stabilität aufgrund möglicher lokaler Änderungen der Proteinstruktur untersucht. Diese Ansätze wurden in 300 μ l Puffervolumen (100 mM Tris [pH 8,45], 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) durchgeführt und enthielten je 250 μ M Protein, 0,03 mg·ml⁻¹ Trypsin (rekombinant, aus Schweinepankreas, Roche), 2 μ M Benzoessäure als internen Standard und wurden bei 30 °C inkubiert und mit 50%iger Essigsäurelösung (v/v) abgestoppt. Hitze-denaturiertes wtPar10 (5 min bei 80 °C) diente als Referenz für den (teil)entfalteten Zustand. Der proteolytische Abbau wurde mittels HPLC-Analyse bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt, indem die Abnahme von intakter Parvulinfraktion über die entsprechende Peakfläche des HPLC-Chromatogramms quantifiziert wurde.

3.6.6 Fern-UV CD-Spektroskopie

Fern-UV CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 190-250 nm dienen der Analyse der Sekundärstrukturelemente der verschiedenen Par10- und AhpC-Spezies sowie einzelner Parvulinsegmente [192, 193]. Alle Spektren wurden unter einem permanenten Stickstoffstrom an einem Jasco J-810 CD-Spectropolarimeter (Jasco) bei einer Temperatur von 20 °C in einer 1 mm Quarzküvette (Hellma) unter Verwendung eines steril filtrierten und entgasten 5 mM KP_i-Puffers (pH 7,25) aufgenommen. Die Protein- beziehungsweise Peptidkonzentrationen betragen 3-10 μ M. Jedes Spektrum wurde aus

30 Einzelmessungen mit einer Bandenweite von 1 nm, einer Scangeschwindigkeit von 50 nm·min⁻¹ und einer Antwortzeit von 1 s, akkumuliert. Es wurde bei allen Messungen darauf geachtet, dass die Hochspannungs-Voltzahl (HT-Signal) über den gesamten Wellenlängenbereich unterhalb 600 V lag. Hintergrundspektren (Nullspektren ohne Protein) wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen und vom Signal der Probenspektren abgezogen. Um die aufgenommenen CD-Spektren untereinander vergleichen zu können, wurden die ursprünglichen absoluten Messsignale in mdeg unter Anwendung der Gleichung (3-4) in ein Aminosäureeinheiten- unabhängiges Maß überführt [194].

$$[\theta] = \frac{100 \cdot (\text{CD-Signal})}{c \cdot n \cdot d} \quad \text{Gleichung (3-4)}$$

$[\theta]$ = mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest in Grad·cm²·dmol⁻¹

CD-Signal = Ausgabeeinheit des CD-Spektrometers bei der jeweiligen Wellenlänge in mdeg

100 = Umrechnungsfaktor von mmol in dmol

c = Protein- oder Peptidkonzentration in mM

n = Anzahl der Aminosäurereste des Proteins oder Peptids

d = optische Weglänge der Messküvette in cm

Für die Berechnung der Sekundärstrukturanteile der Proteine wurde das Programm CDNN in der Version 2.1 verwendet [195]. Die von der CDNN Software benötigten Rohdaten wurden in der Einheit mdeg und einem Datenintervall von 1 nm unter Angabe messspezifischer Parameter in das Programm geladen. Dieses ermittelt die prozentuale Verteilung von α -helikalen, β -Faltblatt- und ungeordneten Strukturen (Knäuelstrukturen) in Proteinen anhand der aufgenommenen Circular-dichroismusspektren und einer Datenbank, bestehend aus 33 CD-Spektren von Modellpeptiden/-proteinen mit bekannter Konformation, durch mathematische Transformation (Dekonvolution).

3.6.7 pK_S-Wertbestimmung freier Cysteine

Die pK_S-Werte der Seitenketten der freien Par10 Cysteine Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸ wurden zum einen direkt spektroskopisch bestimmt und zum anderen über die Verfolgung der Reaktion von ELLMAN's Reagenz (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), DTNB) mit den freien Sulfhydrylgruppen der Cysteine ermittelt. Für die pK_S-Wertbestimmung wurden wtPar10, Par10 C40A, Par10 C68A und kurze Par10-Segmente eingesetzt.

Die erste Methode nutzt die pH-Wert-abhängige Protonierung der Sulfhydrylgruppe, welche direkt bei einer Wellenlänge von 240 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 4000 M⁻¹·cm⁻¹ für einen einzelnen vollständig deprotonierten Thiolatrest an einem S-3100 Spektrophotometer (Jasco) verfolgt werden konnte [196-199]. Die Extinktionskoeffizienten bei unterschiedlichen pH-Werten wurden nach Gleichung (3-5) erhalten. Das Verhältnis der Absorption bei 240 nm zur Absorption bei 280 nm (Referenzwellenlänge) diente der Normalisierung der Parvulin-konzentration in der Messküvette.

$$\epsilon_{240}^{\text{obs}} = \epsilon_{280}^{\text{Par10}} \cdot \frac{A_{240}}{A_{280}} \quad \text{Gleichung (3-5)}$$

$\epsilon_{240}^{\text{obs}}(\text{pH})$ = beobachteter Extinktionskoeffizient bei 240 nm als Funktion des pH-Wertes

$\epsilon_{280}^{\text{Par10}}$ = Extinktionskoeffizient bei 280 nm für Par10 = 2980 M⁻¹ · cm⁻¹

A_{240} = Absorption bei 240 nm

A_{280} = Absorption bei 280 nm

Die gemessene Änderung des Extinktionskoeffizienten bei 240 nm als eine Funktion des pH-Wertes wurde nach folgender HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung (3-6) ausgewertet.

$$\epsilon_{240}^{\text{obs}}(\text{pH}) = \epsilon_{240}^{\text{SH}} + \frac{\epsilon_{240}^{\text{S}^-} - \epsilon_{240}^{\text{SH}}}{1 + 10^{(\text{pK}_s - \text{pH})}} \quad \text{Gleichung (3-6)}$$

$\epsilon_{240}^{\text{obs}}(\text{pH})$ = beobachteter Extinktionskoeffizient bei 240 nm als Funktion des pH-Wertes

$\epsilon_{240}^{\text{SH}}$ = Extinktionskoeffizient bei 240 nm für vollständig protonierte Thiolatfunktion

$\epsilon_{240}^{\text{S}^-}$ = Extinktionskoeffizient bei 240 nm für vollständig deprotonierte Thiolatfunktion

Bei der zweiten verwendeten Methode reagiert DTNB mit ionisierten (freien) Sulfhydrylgruppen zu einem gemischten Disulfid und 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (NTB) [200]. Das freigesetzte NTB kann bei 412 nm ($\epsilon_{412} = 14150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [201]) detektiert werden. Die Absorptionsänderung bei 412 nm mit der Zeit wurde nach einer nicht-linearen Regression mit Hilfe des Programms Sigma Plot Version 11.0 (Systat Software) ausgewertet.

Alle Messungen wurden an einem S-3100 Spektrophotometer (Jasco) bei 25 °C in einem Universalpuffersystem (pH-Bereich 2,6-9,8), bestehend aus 10 mM Zitronensäure, 10 mM Na₂HPO₄ und 10 mM Bis-Tris-Propan, durchgeführt. Die Gesamtionenstärke betrug 150 mM und wurde durch Zugabe von NaCl zum Puffersystem sichergestellt. Bei den Proteinproben, welche nach der Größenausschlusschromatografie DTT enthielten (Abschnitt 3.4.1), wurde ein Pufferwechsel unter Verwendung von Microcon Zentrifugen-Filtrationseinheiten Ultracel YM-3 (NMWL = 3000 Da, Sigma-Aldrich) zu 5 mM KP_i (pH 7,25) mit 50 mM KCl vorgenommen, um die Messungen beeinflussendes DTT zu entfernen. Die lyophilisierten Par10-Peptide H-1-67-OH, H-29-43-OH und H-29-48-OH wurden als 1 mM Stammlösungen in dem zuvor erwähnten KP_i-Puffer gelöst und der pH-Wert mittels NaOH auf pH 7,25 titriert. Das Gesamtvolumen pro Messansatz betrug 1,5 ml in einer Quartzglasküvette (Hellma) mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Endkonzentration der Proteine beziehungsweise Peptide im Ansatz betrug 30 µM. Pufferspektren ohne Protein oder Peptid wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen und von den Probenspektren abgezogen. Eine Reihe von im Messpuffer gelösten L-Cystein-Hydrochlorid Standards diente als Positivkontrolle für beide Untersuchungsmethoden.

3.6.8 Fluoreszenzspektroskopische Bindungsstudien

Die Bindung unterschiedlicher Liganden an die fluoreszenzmarkierten Par10-Varianten wurde anhand von Fluoreszenztitrationen analysiert. Die Ligandenanlagerung führte dabei zu veränderten Fluoreszenzeigenschaften der in verschiedenen Positionen eingeführten 2-Abz-Sonde. Die Messungen wurden an einem Perkin Elmer Luminescence Spectrophotometer LS 50B (Absorptions- und Emissionsspektren) und an einem Novostar Fluoreszenz-Mikrotiterplattenleser der Firma BMG Labtech (Titrations-Bindungsstudien) in Hellma Quarzglas Präzisionsküvetten (Suprasil, 10 mm) beziehungsweise in Greiner *Cellstar* 96-well Mikrotiterplatten (Sigma) durchgeführt. Die Messungen erfolgten in 10 mM KP_i -Puffer (pH 7,25) mit 100 mM KCl bei 25 °C. Für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurden jeweils fünf Einzelspektren ($\lambda_{An} = 320$ nm) akkumuliert.

Für 2-Abz/pNA-Quenchesperimente wurde in den fluorophore Par10-Varianten enthaltenden Ansätzen ($[Par10] = 3 \mu M$) die Konzentration der fluoreszenzlöschenden Verbindungen schrittweise erhöht und nach jedem Titrationsschritt die Fluoreszenzabnahme verfolgt. Dazu wurde nach fünfminütiger Inkubation die Fluoreszenzintensität der Emissionswellenlänge bei 420 nm nach Anregung bei 320 nm ermittelt. Die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit einer fluoreszenzlöschenden Verbindung wurde 100 % gesetzt und alle darauf bezogenen Messwerte in Anwesenheit eines quencheden Moleküls ergaben die relativen Fluoreszenzintensitäten in %. Nach Auftragung der relativen Fluoreszenzintensität gegen die Quencherkonzentration wurden aus den so erhaltenen hyperbolen Sättigungskurven apparente Bindungskonstanten (K_{D_app}) für die einzelnen Par10-Ligand-Bindungen nach einer einfachen, bimolekularen Reaktion nach Gleichung (3-7) bestimmt und untereinander verglichen. Einzelne K_{D_app} -Werte setzten sich aus der Summe der spezifischen und unspezifischen Par10-Ligand-Wechselwirkungen zusammen.

$$F = \frac{F_{max} \cdot [Ligand]}{K_{D_app} + [Ligand]} \quad \text{Gleichung (3-7)}$$

F = relative Fluoreszenzintensität

F_{max} = maximale relative Fluoreszenzintensität

K_{D_app} = apparente Dissoziationskonstante von Par10 und Ligand

[Ligand] = Ligandenkonzentration

Kompetitionsbindungsstudien an den modifizierten Par10-Varianten mit AhpC¹⁻¹⁶ (Ac-SLINTKIKPFKN-QAFK-NH₂) respektive AhpC¹¹⁵⁻¹³² (Ac-GLADRATFVVD PQGIIQA-NH₂) erfolgten in ähnlicher Weise zu den zuvor beschriebenen Sättigungsexperimenten. Die beiden AhpC-Peptide dienten jeweils als Kompetitor des im Ansatz enthaltenen Suc-AAPF-pNA-Substrats. Die AhpC¹⁻¹⁶-Sequenz wurde im IANUS-Peptidassay (Abschnitt 1.4) als ein nicht mit der Substratbindungsstelle von Par10 interagierender AhpC-Abschnitt identifiziert und diente als Negativkontrolle. Die semi-logarithmischen Auftragungen der zunehmenden relativen Fluoreszenzintensität gegen die Kompetitorkonzentration er-

gaben Verdrängungskurven (Abschnitt 4.8.3), welche nach einem Model für eine einfache, kompetitive Verdrängung an einer einzelnen Bindungsposition ausgewertet wurden (Gleichung (3-8)).

$$F = \frac{F_{\max} - F_{\min}}{1 + 10^{[\text{Kompetitor}] - \log(KC_{50})}} \quad \text{Gleichung (3-8)}$$

F = relative Fluoreszenzintensität F_{\max} = maximale relative Fluoreszenzintensität
 F_{\min} = minimale relative Fluoreszenzintensität [Kompetitor] = Kompetitorkonzentration
 KC_{50} = Konzentration des Kompetitors bei 50%iger Verdrängung des Liganden aus der Par10-Bindungsstelle

Der KC_{50} -Wert aus dem Verdrängungsexperiment und der K_{D_app} -Wert aus dem Sättigungsexperiment gingen in eine Gleichung nach CHENG und PRUSSOFF [202] ein, mit der die Konstante K_{K_app} berechnet werden konnte (Gleichung (3-9)).

$$K_{K_app} = \frac{KC_{50}}{1 + \frac{[\text{Ligand}]_{\text{frei}}}{K_{D_app}}} \quad \text{Gleichung (3-9)}$$

K_{K_app} = apparente Dissoziationskonstante von Kompetitor und Par10
 KC_{50} = Konzentration des Kompetitors bei 50%iger Verdrängung des Liganden aus der Par10-Bindungsstelle
 $[\text{Ligand}]_{\text{frei}}$ = Konzentration an freiem Ligand
 K_{D_app} = apparente Dissoziationskonstante von Par10 und Ligand

3.6.9 Kernspinresonanzspektroskopie

Die NMR-Messungen wurden an einem Bruker DRX 500 Spektrometer mit einer Protonenresonanzfrequenz von 500,13 MHz und eingebautem 5 mm TXI Probenkopf mit XYZ-Gradientenspule durchgeführt. Aufgenommen und verarbeitet wurden die NMR-Spektren an Silicon Graphics Computern unter Verwendung der Programme XWINNMR Version 3.5 (Bruker Bio-Spin) und FELIX 2000 (Accelrys). Die Referenzierung der ^1H -NMR-Signale erfolgte auf externe 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) [203]. Die ^{13}C - und ^{15}N -chemischen Verschiebungen wurden indirekt auf die ^1H -Signale referenziert. Zur Unterdrückung des Lösungsmittelsignals diente das WATERGATE-Pulssequenzverfahren (*water suppression by gradient-tailored excitation*) [204]. Die Aufnahme und Prozessierung der NMR-Spektren, das Erfassen chemischer Verschiebungen, die Konturplotterstellungen und die Resonanzzuordnungen erfolgten durch Dr. CHRISTIAN LÜCKE unter Mitarbeit von MONIKA SEIDEL (MPF, Halle (Saale)).

Alle NMR-Proben enthielten entweder unmarkiertes, ^{15}N -markiertes oder $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -doppelmarkiertes Protein in Konzentrationen von 0,6 bis 2 mM gelöst in 10 mM KPi -Puffer (pH 7,25), 100 mM KCl, 1 mM DTT und 5 % D_2O . Die Proteinlösungen wurden in $\varnothing = 4,2$ mm Shigemi-Probenröhrchen (Shigemi) überführt und gemessen. Das ^{15}N -markierte wtPar10 wurde von Dr. ANGELA PÖHLMANN (MPF, Halle (Saale)) bereitgestellt. Die ^{15}N -markierte Par10 C40A-Mutante und das $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierte wtAhpC wurden, wie in den Abschnitten 3.3.7 und 3.4.1 beschrieben, erhalten und

gereinigt. Zur selektiven Anreicherung von ^{15}N - beziehungsweise $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Aminosäuren in den Proteinen wurde anstelle des LB-Vollmediums M9-Minimalmedium verwendet, welches $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ oder ^{13}C -D-Glukose und $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ enthielt (Abschnitt 3.2.4).

$1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ -Experimente dienen der Überprüfung der Faltungszustände verschiedener AhpC-Varianten, welche für nachfolgende Interaktionsstudien mit Par10 eingesetzt werden sollten. In diesen Versuchen erlaubten die ermittelten chemischen Verschiebungen der Peptidrückgratamidprotonen eingeschränkte Aussagen über den Faltungszustand der untersuchten Proteine.

Um die Bindung von AhpC an Par10 zu untersuchen und mögliche Aminosäurereste, die an der Interaktion beteiligt sind zu identifizieren, wurde die Methode der chemischen Verschiebungsänderung (CSP = *chemical shift perturbation*) angewandt. Dazu wurden charakteristische „Protein-Fingerabdruckspektren“ (zweidimensionale $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren) von ^{15}N -markierten wtPar10 in Ab- und Anwesenheit verschiedener AhpC-Varianten aufgenommen und analysiert. Für die Ermittlung der chemischen Verschiebungsänderungen innerhalb der Parvulinsequenz während der AhpC-Bindung wurde zum ^{15}N -markierten wtPar10 ein zweifacher Überschuss an AhpC¹¹⁵⁻¹³² (IANUS-Peptide) und ein dreifacher Überschuss an 6xHis-tag-AhpC und AhpC_kurz titriert und die Signale der Stickstoffatome des Peptidrückgrats unter Verwendung des Programms FELIX 2000 (Accelrys Inc., San Diego) ermittelt. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen und Stickstoffatome wurden nach Gleichung (3-10) in einen gewichteten Vektorbetrag umgerechnet [205]. Zweidimensionale $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des freien ungebundenen ^{15}N -wtPar10 dienen als Referenz (BMRB-ID: 5225).

$$\Delta\delta_{\text{komb.}} = \sqrt{(\Delta\delta_{1\text{H}^{\text{N}}})^2 + (R_S \cdot \Delta\delta_{15\text{N}})^2} \quad \text{Gleichung (3-10)}$$

$\Delta\delta_{\text{komb.}}$ = Änderung der kombinierten chemischen Verschiebung der $^1\text{H}^{\text{N}}$ -, ^{15}N -Einzelverschiebungen

$\Delta\delta_{1\text{H}^{\text{N}}}$ = Änderung der chemischen Verschiebung der Amidprotonen

$\Delta\delta_{15\text{N}}$ = Änderung der chemischen Verschiebung der Amidstickstoffatome

R_S = Skalierungsfaktor der chemischen Verschiebung = 6,5; ergibt sich aus: $R_S = \frac{(\sigma_\delta)_{\text{H}^{\text{N}}}}{(\sigma_\delta)_{\text{N}}} = \frac{0,66 (\pm 0,07)}{4,30 (\pm 0,55)}$ mit

$(\sigma_\delta)_{\text{H}^{\text{N}}}$ = Streuung der chemischen Verschiebung der Amidprotonen

$(\sigma_\delta)_{\text{N}}$ = Streuung der chemischen Verschiebung der Amidstickstoffatome

3.7 Enzymaktivitätstests

Die Enzymaktivitäten wurden unter der Annahme des Vorliegens eines dynamischen Fließgleichgewichtes (*steady state*) nach BROWN und HENRY [206] und einer nach MICHAELIS-MENTEN-Kinetik verlaufender Enzymreaktion ermittelt [207]. Weiter galt, dass die Isomerisierungsreaktion einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung mit $[\text{Substrat}] \ll K_M$, $[\text{Enzym-Substrat-Komplex}] = \text{konstant}$, $[\text{Substrat}] \gg [\text{Enzym}]$, $[\text{freies Substrat}] \approx \text{konstant}$, folgt und die Produktbildung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

3.7.1 PPlase-Aktivitätstests und pH-Abhängigkeit der PPlase-Aktivität

Die PPlase-Aktivität von wtPar10, der Par10 Mutanten Par10 Cys⁴⁰Ala, Par10 Cys⁶⁸Ala und einzelner Par10-Segmente erfolgte mittels eines proteasefreien, ungekoppelten Aktivitätstests [208] bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen unter Verwendung des doppelt markierten, in 0,47 M LiCl/TFE gelösten Peptidsubstrates 2-Abz-AAPF-pNA ($c = 25 \text{ mM}$) in Hellma Quarzglas Präzisionsküvetten (Suprasil, 10 mm). Die Messungen erfolgten bei 10 °C in einem 1 mM DTT enthaltenen 35 mM HEPES-Puffer (pH 7,8, steril filtriert, entgast) unter ständigen Rühren und wurden durch Zugabe des Peptidsubstrates ($c_{\text{End}} = 25 \text{ }\mu\text{M}$) gestartet. Die *cis/trans*-Isomerisierung war als Änderung der 2-Abz-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 420 nm (4 nm Spaltbreite) nach erfolgter Anregung bei 320 nm (3 nm Spaltbreite) als Funktion der Zeit und unter Verwendung eines Perkin Elmer *Luminescence Spectrophotometers* LS 50B detektierbar.

Die Progresskurven ließen sich nach einer Reaktion erster Ordnung auswerten und lieferten die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} , welche sich aus den katalysierten und unkatalysierten Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und Rückreaktion zusammensetzten. Eine Auftragung der einzelnen k_{obs} gegen die jeweiligen Parvulinkonzentrationen ergab die Spezifitätskonstante zweiter Ordnung $k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1}$.

Für Inhibierungsstudien an wtPar10 und Par10 Q80Dap(Abz) ($c_{\text{End}} = 2 \text{ nM}$) wurde die relative (Rest)-PPlase-Aktivität in Ab- und Anwesenheit der Peptide AhpC¹⁻¹⁶ und AhpC¹¹⁵⁻¹³² ($c_{\text{End}} = 400 \text{ }\mu\text{M}$) bestimmt. Die weiteren Messbedingungen entsprachen denen des zuvor beschriebenen proteasefreien ungekoppelten Aktivitätstests.

Für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der wtPar10-Aktivität wurde anstelle des HEPES-Puffers ein Universalpuffersystem in einem pH-Bereich von 2,6-9,8, bestehend aus 10 mM Zitronensäure, 10 mM Na₂HPO₄ und 10 mM Bis-Tris-Propan, verwendet. Durch NaCl-Zugabe wurde eine konstante Gesamtionenstärke von 150 mM gewahrt. Die bei unterschiedlichen Protonenkonzentrationen ermittelten $k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1}$ -Werte wurden gegen die entsprechenden pH-Werte aufgetragen und ergaben das Aktivitätsprofil. Einzelnen $k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1}$ Werten lagen k_{obs} -Bestimmungen bei vier unterschiedlichen Parvulinkonzentrationen (1-8 nM) zugrunde. Die Messpunkte des pH-Geschwindigkeitsprofils wurden nach Gleichung (3-11) mit dem Programm Sigma Plot 11.0 (Systat Software) gefittet.

$$\log \left(\frac{k_{\text{kat}}}{K_{\text{M}}} \right) = \log \left(\frac{\left(\frac{k_{\text{kat}}}{K_{\text{M}}} \right)_{\text{max}}}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{D}}}} \right) \quad \text{Gleichung (3-11)}$$

$k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1}$ = Spezifitätskonstante $[\text{H}^+]$ = Protonenkonzentration K_{D} = Dissoziationskonstante

3.7.2 AhpC-Aktivitätstest

Um die Peroxidaseaktivität der AhpC zu bestimmen, wurde ein DTT-abhängiger Enzymtest mit *tert.*-Butylhydroperoxid (*t*BHP, 2 mM im Ansatz) als Enzymsubstrat durchgeführt (Abb. 3-2) [209]. *t*BHP wird im Verlauf der Reaktion zu *tert.*-Butanol und Wasser umgesetzt, ohne dabei durch eine Überoxidation der peroxidaseaktiven Cysteinseitenkette die AhpC zu inaktivieren [116]. Die anschließende Oxidation des reduzierten DTTs (10 mM im Ansatz) zu einem Disulfid wurde bei 310 nm ($\epsilon_{(\text{DTT})310 \text{ nm}} = 110 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) an einem UV/Vis Spektrophotometer S-3100 (Jasco) detektiert [210].

Gemessen wurde in 10 mM KPi , pH 7,25, 100 mM KCl und 1 mM EDTA bei 25 °C in einer 2 ml Suprasil Quarzglasküvette (Hellma) für 10 min bei einer Wellenlänge von 310 nm. Als Maß der durch die AhpC katalysierten DTT-Oxidation wurde der Absorptionsanstieg der ersten 60 Sekunden durch lineare Regression bestimmt (Initialgeschwindigkeit der Reaktion). Die DTT-Oxidation durch das Substrat *t*BHP in Abwesenheit von 6xHis-*tag*-AhpC und die DTT-Oxidation in Abwesenheit von *t*BHP und 6xHis-*tag*-AhpC wurden ebenfalls bestimmt.

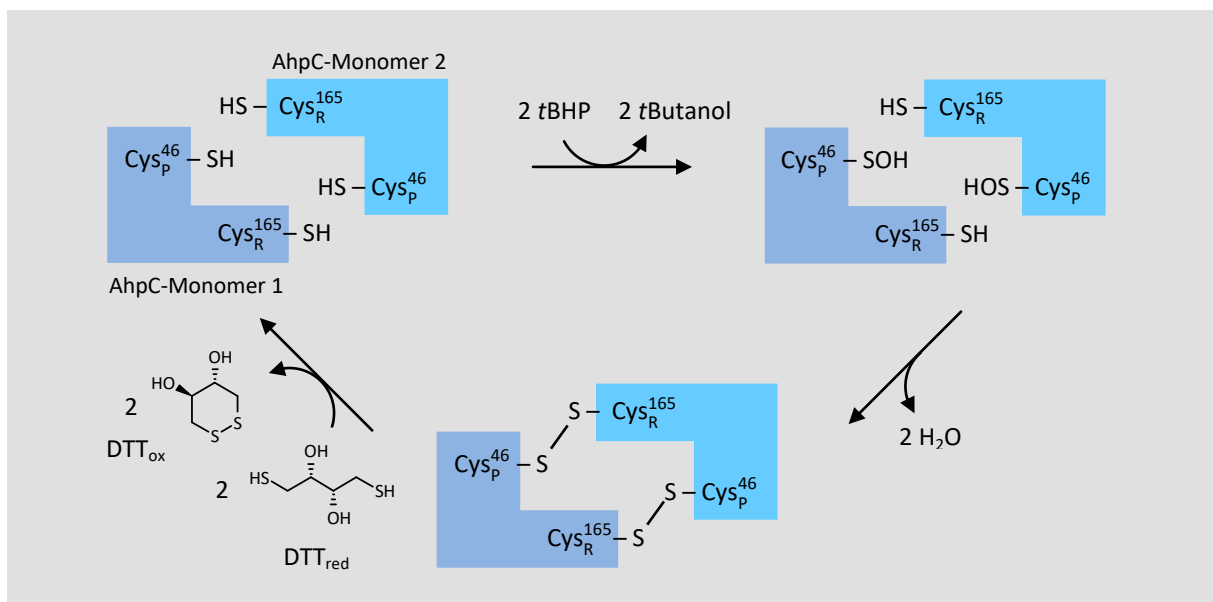


Abb. 3-2. DTT-Oxidationstest zur Bestimmung der AhpC-Enzymaktivität. Jedes AhpC-Monomer eines katalytisch aktiven AhpC-Dimers besitzt einen peroxidaseaktiven und einen regenerierenden (*resolving*) Cysteinylnrest (Cys⁴⁶_P bzw. Cys¹⁶⁵_R). Das Substrat *t*BHP wird durch Cys⁴⁶_P zum entsprechenden Alkohol *t*Butanol und Wasser unter Ausbildung intermolekularer Disulfide zwischen den AhpC-Monomeren reduziert. Intermediär auftretende Cysteinsulfensäuren (S-Hydroxycysteinyln) in Position 46 werden als Zwischenstufen angenommen. Durch Auflösung der Disulfidbrücken durch reduzierendes DTT wird das AhpC-Dimer wieder regeneriert. Die Oxidation des DTT führt zu einem Ringsystem mit intramolekularer Disulfidbrücke und ist spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 310 nm detektierbar. Abbildung verändert nach [209].

4 Ergebnisse

4.1 Rekombinant hergestellte Proteine und Proteinderivate

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Par10 mit der zunächst als potenziellem Bindungspartner geltenden AhpC dienten rekombinant erzeugte unmarkierte sowie ^{15}N - und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierte Proteine. Die in dieser Arbeit hergestellten Varianten von Par10 (Abschnitt 4.1.1) und AhpC (Abschnitt 4.1.2) unterschieden sich in der Länge ihrer *N*- und/oder *C*-Termini sowie eingefügten Punktmutationen verglichen mit den jeweiligen Wildtypformen. Für die gezielten Manipulationen des *ppiC*- und des *ahpC*-Gens durch ortsgerichtete Mutagenesen ging man von bereits vorhandenen, die entsprechenden Genabschnitte in Wildtypform enthaltenden Plasmiden aus. Die eingeführten Mutationen, Verkürzungen und Erweiterungen der Genabschnitte wurden per DNA-Sequenzierung überprüft (Anhang A 1). Alle Peptidthioester (Par10 H-1-35-MESNa und Par10 H-1-67-MESNa, Abschnitt 4.3.2) und Proteine rekombinanten Ursprungs ließen sich in löslicher Form in *E. coli*-Zellen synthetisieren und sind im Anhang in Tab. A 2-1 mit ihren berechneten und experimentell ermittelten Molekülmassen zusammengefasst.

Die initial verwendeten Ionenaustausch- und Affinitätschromatografien waren für die Isolierung und Reinigung der benötigten Proteine ebenso geeignet, wie die sich anschließenden Größenausschluss- beziehungsweise Perfusionschromatografien für die finalen Proteinreinigungen und notwendigen Pufferwechsel. Nach jedem Reinigungsschritt konnten Elutionsfraktionen zusammengefasst und konzentriert werden, die nach der SDS-PAGE-Analyse ausschließlich das jeweilige Zielprotein enthielten.

Gereinigte Peptidthioester und Proteine waren, wenn diese nicht unmittelbar nach ihrer Reinigung untersucht wurden, aliquotierbar und bei -22 °C lagerfähig. Die einzelnen Proteinvarianten und Par10-Segmente (Oligopeptide, Peptidthioester) wurden, wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben, physikochemisch, spektroskopisch und enzymatisch charakterisiert und experimentell erforscht.

4.1.1 Exprimierte Parvulin 10-Varianten

Die Parvulinvarianten wtPar10, Par10 C40A, Par10 C68A, ^{15}N -wtPar10 und ^{15}N -Par10 C40A ließen sich in *E. coli*-Zellen anreichern (Abschnitt 3.3.7) und über eine kombinierte Anionen-/Kationenaustauschchromatografie sowie anschließende Größenausschlusschromatografie (Abschnitt 3.4.1) von den übrigen *E. coli*-Proteinen abtrennen, welche sich nach dem Zellaufschluss und Ultrazentrifugierung im Überstand befanden. Der verwendete DEAE-Anionenaustauscher ermöglichte unter den ver-

wendeten pH-Bedingungen die Abtrennung negativ geladener Moleküle (Nukleinsäuren, Phospholipide, Proteine mit einem $pI < 7,2$). Die Kationenaustauschersäule trennte Proteine ab, deren isoelektrischer Punkt zwischen 7,2-8,2 lagen und ließ die Parvulinspezies mit einem theoretisch ermittelten isoelektrischen Punkt von 9,2 [167] erst bei höheren NaCl-Konzentrationen eluieren. Mittels Größenausschlusschromatografie konnten noch vorhandene größere Proteine (Molekülmasse > 40 kDa) von den Par10-Varianten abgetrennt werden, welche sich durch eine sehr geringe Molekülmasse und einen kleinen hydrodynamischen Radius (STOKES-Radius) auszeichneten. Die Ausbeuten für wtPar10 und Par10 C68A lagen mit je $14-18$ mg Protein \cdot l $^{-1}$ Kulturmedium deutlich höher als für die unmarkierte Par10 C40A und für die 15 N-markierte Par10 C40A mit ~ 4 mg \cdot l $^{-1}$ (jeweils aus 7 bis 8 g Feuchtbioasse). Während wtPar10 und Par10 C68A in einem Peak eluierten (bei 95 ml, Abb. 4-1), gab es bei beiden Par10 C40A-Varianten drei zu kleineren Elutionsvolumen verschobene Peaks (68 ml: Oligomerpeak, 75 ml: Dimerpeak und 87 ml: Monomerpeak). Es wurden nur die Fraktionen des ausschließlich Par10 C40A-Monomer enthaltenden dritten Peaks für die weiteren Untersuchungen verwendet.

4.1.2 Exprimierte AhpC 10-Varianten

Zu den in der vorliegenden Arbeit mittels Proteinbiosynthese hergestellten AhpC-Varianten gehörten 6xHis-tag-AhpC, 6xHis-tag-AhpC T77D, 6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz, 6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz T77D und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz (Tab. A 2-1). Die Isolierung der N-terminal 6xHis-tag-enthaltenden AhpC-Fusionsproteine aus den *E. coli*-Rohextrakten erfolgte im ersten Schritt selektiv durch Ni^{2+} -Sephrose-Säulen, gefolgt von Größenausschlusschromatografien. Von allen gewonnenen AhpC-Varianten betragen die Ausbeuten zwischen 18 und 25 mg \cdot l $^{-1}$ Kulturüberstand. Für AhpC-Varianten, die einen spaltbaren 6xHis-tag enthielten, schloss sich an die Enteropeptidasespaltung und erneute Konzentrierung eine zweite Größenausschlusschromatografie an. Vermutlich aufgrund von Sekundärstrukturausbildungen um den Bereich der Enteropeptidaseschnittstelle (DDDDK) und der damit korrelierenden schlechten Zugänglichkeit der Spaltstelle waren lange Reaktionszeiten für die Spaltung von bis zu 48 h notwendig. Eine zum erwarteten Spaltprodukt zusätzliche Proteinabbau- bande war nach 24 h sichtbar, konnte aber durch die anschließende Gelfiltration entfernt werden.

E. coli-Zellen, welche in M9-Minimalmedium mit ^{13}C -D-Glukose und ^{15}N -Ammoniumchlorid kultiviert wurden, synthetisierten die $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierte AhpC-Variante. Bei der Reinigung von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz wurde analog zu den unmarkierten AhpC-Varianten verfahren. Über alle Einzelschritte hinweg konnten keine Unterschiede zu den Reinigungen der unmarkierten AhpC-Spezies hinsichtlich Proteinausbeute oder Integrität festgestellt werden.

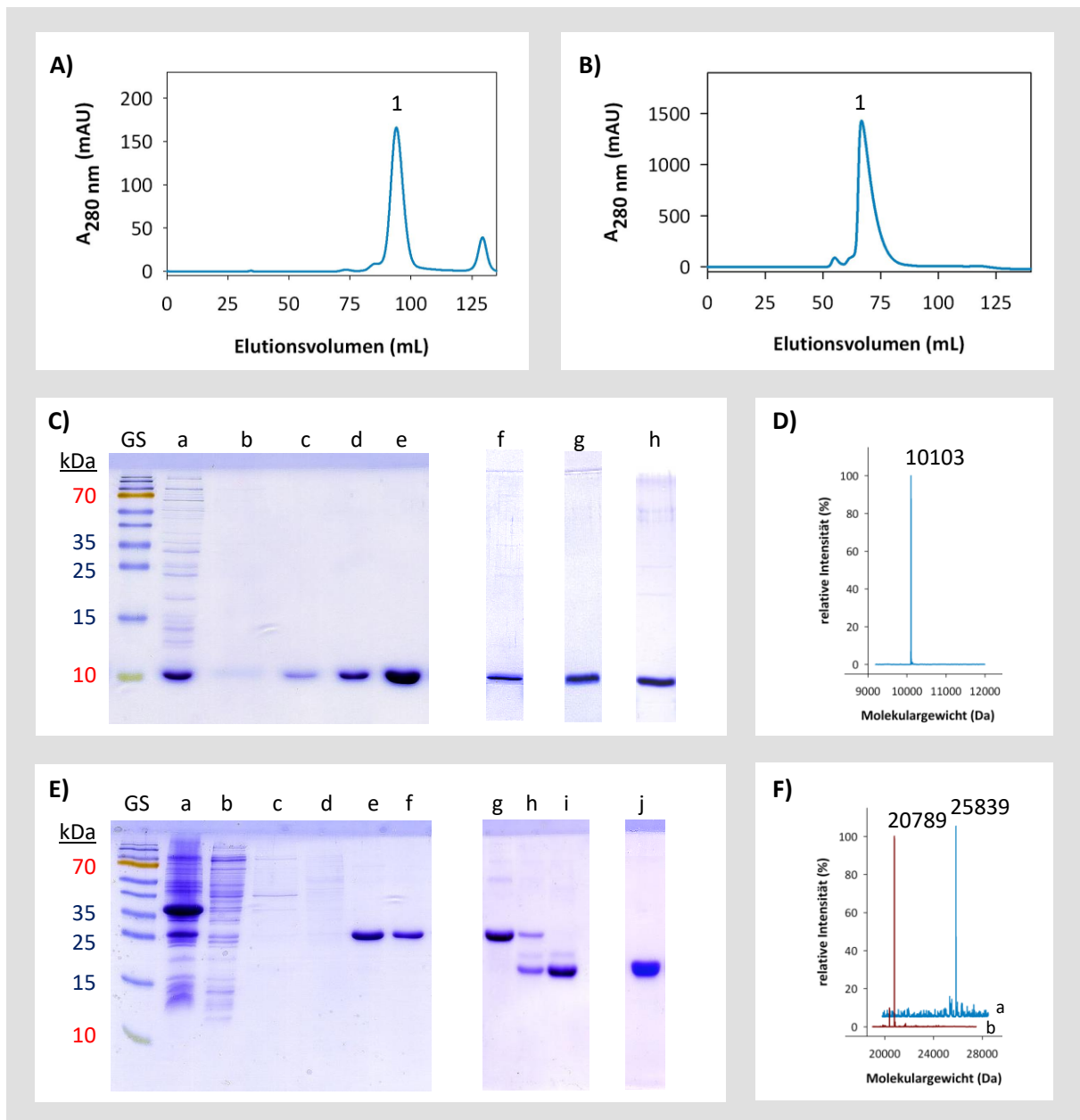


Abb. 4-1. Ausgewählte Ergebnisse der Reinigung von wtPar10, Par10 C40A, Par10 C68A und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -AhpC_kurz. **A)** Elutionsprofil der Größenausschlusschromatografie von wtPar10, das im Volumen zwischen 90 und 100 ml eluierte (1). **B)** Elutionsprofil der Größenausschlusschromatografie von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -AhpC_kurz, das im Volumen zwischen 60 und 75 ml eluierte (1). **C)** SDS-PAGE-Analytik der Reinigung verschiedener Par10-Varianten. Die jeweilige Par10-Proteinspezies migrierte auf Höhe von ~ 10 kDa. Proteingrößenstandard (GS), Durchlauf des aufgetragenen Zellextrakt (a), Waschritte (b+c) und Elutionsfraktionen der Anionen-/Kationenaustauschchromatografie von wtPar10 (d+e). Gereinigtes wtPar10 (f), Par10 C40A (g) und Par10 C68A (h) nach jeweiliger Größenausschlusschromatografie. **D)** ESI-MS-Spektrum des gereinigten wtPar10 mit der ermittelten Molekülmasse von 10103 $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 10100,8 Da. **E)** SDS-PAGE-Analytik der Reinigung von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -AhpC_kurz. Proteingrößenstandard (GS), Durchlauf des aufgetragenen Zellextrakt (a), Waschritte (b-d) und Elutionsfraktionen der Affinitätschromatografie von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz (e+f). Enteropeptidasespaltung nach 0, 24 und 48 h (g-i). Gereinigtes $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -AhpC_kurz (f) nach Größenausschlusschromatografie migriert auf Höhe von ~ 20 kDa. **F)** ESI-MS-Spektren vor (a) und nach der 6xHis-tag-Spaltung von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz durch Enteropeptidase (b); ermittelt: 25839 $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 25837,1 Da und 20789 $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 20786,9 Da.

4.2 Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen

Bevor mit den Par10-AhpC-Interaktionsstudien begonnen werden konnte, wurden geeignete NMR-Messbedingungen gesucht, um die in der Literatur beschriebene Oligomerisierung der AhpC bei den für NMR-Experimente notwendigen hohen Proteinkonzentrationen (1-2 mM) zu unterbinden. Initiale 1D-¹H-NMR-Experimente halfen, geeignete Bedingungen für die NMR-Interaktionsstudien zu ermitteln. Ausgangspunkt für die Pufferzusammensetzung (10 mM KP_i [pH 7,25], 100 mM KCl, 1 mM DTT, 5 % (v/v) D₂O als Locksubstanz) und die spezifischen Parameter des verwendeten 500 MHz-NMR-Spektrometers waren vorangegangene Messungen zur Strukturermittlung von ¹⁵N-markiertem wtPar10 in Lösung [97].

4.2.1 Vorversuche zur AhpC-NMR

Messungen mit 6xHis-tag-AhpC lieferten zunächst ungenügend aufgelöste NMR-Spektren und erforderten eine Optimierung der Messbedingungen. Besonders der flexible N-terminale 6xHis-tag und der in Kristallstrukturen erkennbar unstrukturierte AhpC-C-Terminus (Ala¹⁷⁴-Ile¹⁸⁶) führten zu Signalüberlagerungen und unzureichend aufgelösten Proteineinstrukturen in den 1D-¹H-Spektren. Zudem ist der vollständige C-Terminus laut Literaturangaben [121] ein wesentlicher Faktor bei der Dekamerbildung der AhpC, welche zu einem ringförmigen Proteinkomplex führt, dessen Molekülmasse von 210 kDa für gegenwärtige Standard-Lösungs-NMR zu groß ist.

Im Gegensatz zu 6xHis-tag-AhpC zeigte die 6xHis-tag-freie und C-terminal um zwölf Aminosäuren verkürzte AhpC_{kurz}-Variante deutlich verbesserte 1D-¹H-NMR-Spektren (Abb. 4-2 A). Es konnte eine signifikante Konturzunahme für die Signale der Seitenkettenprotonen der Asparagin- und Glutaminseitenketten (10-6 ppm), der Aromatenprotonen (7,5-6 ppm), der H^α-Protonen (5-3,5 ppm) und der Seitenkettenprotonen der aliphatischen Aminosäurereste (3-0 ppm) erzielt werden. Trotz dieser Verbesserung waren die Feinstrukturen nicht ausreichend aufgelöst, um die AhpC-Raumstruktur in Lösung zu bestimmen.

Die Dimerisierung der AhpC-Komplexe sollte durch die Zugabe verschiedener Detergenzien sowie durch Reduktions- und Oxidationsmittel zu den in KP_i-Puffer gelösten AhpC-Molekülen und durch Variierung der verschiedenen Messparameter erreicht werden. Eine Überoxidation der beiden redoxaktiven Cysteinseitenketten (Cys⁴⁶ und Cys¹⁶⁵) durch Wasserstoffperoxid beziehungsweise *tert.*-Butylhydroperoxid zu Cysteinsulfinsäuren (3-Sulfino-L-Alanyl-) und Cysteinsulfonsäuren (3-Sulfo-L-Alanyl-) führte zu keiner Verbesserung der 1D-¹H-NMR-Spektren. Das galt auch für die in hohen Überschüssen verwendeten Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol, DTT und TCEP sowie für die kovalente Modifizierung der Cysteinseitenketten der AhpC mit dem thiol-spezifischen Reagenz Maleimid, welche die beiden freien Cysteinseitenketten vollständig blockierte. Analysen zum Oligomeri-

sierungszustand der AhpC mittels nativer PAGE zeigten nach der Modifizierung AhpC-Monomere, allerdings nur bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen (Massenspektren und native PAGE nicht gezeigt).

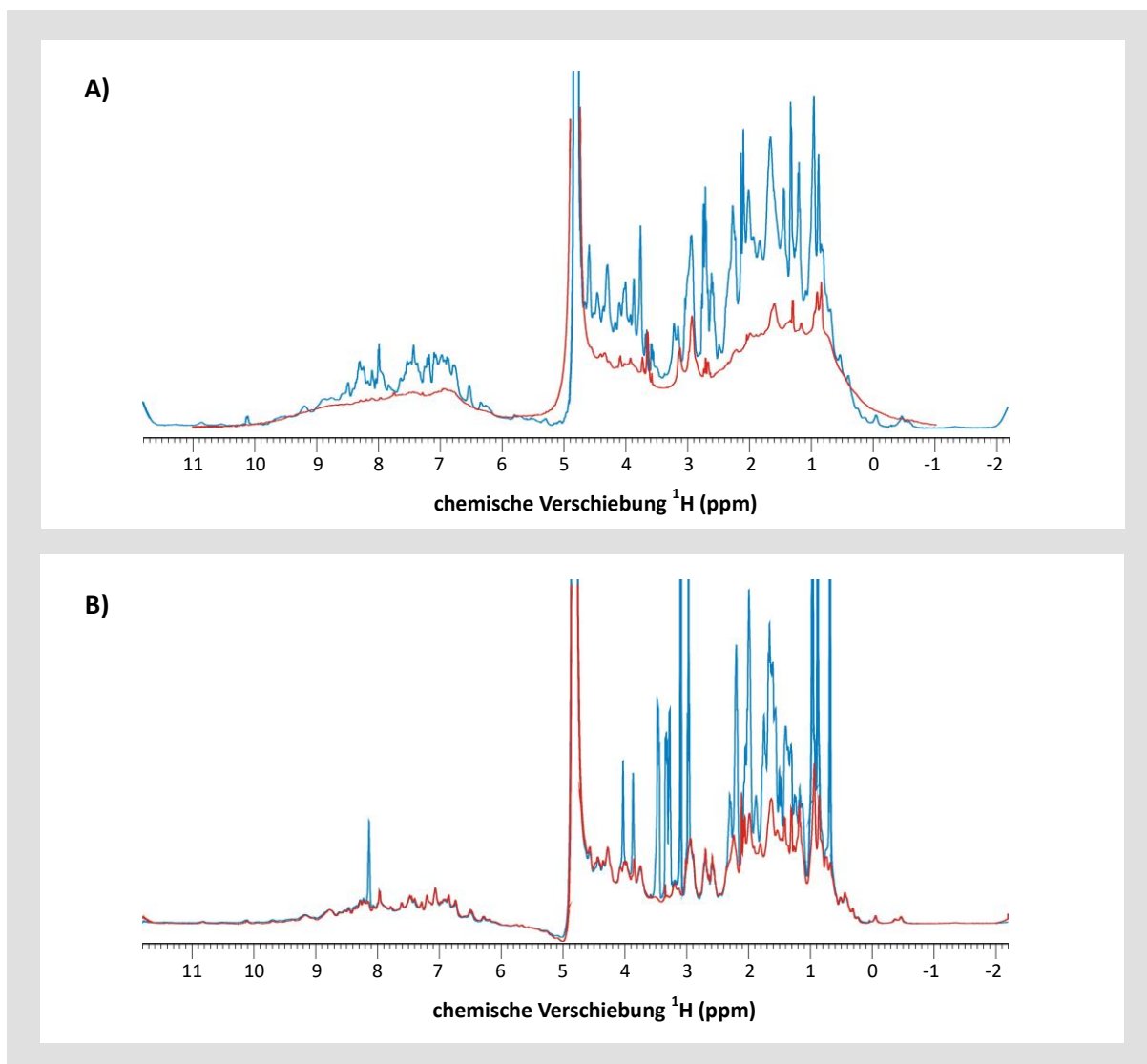


Abb. 4-2. 1D-¹H-NMR-Experimente an AhpC-Varianten. **A)** 1D-¹H-NMR-Spektren von 6xHis-tag AhpC (rot) und AhpC_kurz (blau). Die um den 6xHis-tag- und den freien unstrukturierten C-Terminus verkürzte AhpC_kurz-Variante zeigte ein signifikant besser aufgelöstes Spektrum. **B)** 1D-¹H-NMR-Spektren von AhpC_kurz ohne CHAPS (rot) und mit 12 mM CHAPS (blau). Die Zugabe von CHAPS führte neben einer Zunahme der Peakintensitäten von AhpC_kurz auch zu zusätzlich auftretenden Signalen von aliphatischen Protonen im Bereich von 3,5-1 ppm. Die beiden in A) gezeigten Spektren sind in zweifacher Vergrößerung zu den Spektren in B) dargestellt. Bedingungen: [AhpC] = 1,2 mM in 10 mM KP_i, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 5 % D₂O (v/v) bei 25 °C.

Auch die Verringerung der AhpC-Konzentration auf 0,6 mM, die Änderung der Ionenstärke des Messpuffers (durch Verwendung von 50-200 mM KCl im Messpuffer), pH-Wertveränderungen (pH 4-8) sowie die Erhöhung der Messtemperatur auf bis zu 60 °C erbrachten keine deutlichen Verbesserungen der Spektren.

Von den verwendeten Detergenzien Brij 35, Brij 58, Triton-X 100, Tween 20, Sulfobetain S 14, Natriumdodecylsulfat, Natriumdesoxychololat und CHAPS führte nur das zwitterionische Detergens

CHAPS zu einer leichten Verbesserung der Signalintensitäten der 1D- ^1H -NMR-Spektren (Abb. 4-2 B). Vor allem die Signale aliphatischer Protonen bei einer chemischen Verschiebung von 3,5-1 ppm traten deutlicher hervor, allerdings waren dazu hohe CHAPS-Konzentrationen von 6 bis 24 mM im Messansatz notwendig, welche ihrerseits zu zusätzlichen Signalen im Aliphatenprotonenbereich führten und vermutlich auch eine wtPar10-AhpC-Interaktion stark beeinflusst hätten. In weiteren Experimenten wurde im Ergebnis auf die Zugabe von Detergenzien verzichtet.

Die Einzelmutanten 6xHis-*tag*-AhpC T77D und AhpC_kurz T77D wurden ebenfalls kernresonanzspektroskopisch untersucht, da eine AhpC T77D Variante von PARSONAGE und Kollegen [120] als dekamerdestabilisierende Variante beschrieben wurde (für [AhpC T77D] = 2,5-100 μM). Die eigenen Messungen deuteten aber nicht auf eine verringerte Dekamerbildung bei den von uns verwendeten hohen AhpC-Konzentrationen von 0,6 bis 2 mM hin, weshalb mit diesen Varianten nicht weiter gearbeitet wurde.

Einzelne Messungen (HSQC- und TROSY-Experimente) wurden mit $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierter AhpC_kurz an einem Avance NMR-Spektrometer (Bruker) mit stärkerem Magnetfeld (800,23 MHz) und einem CP-TPI-Kryo-Probenkopf bei einer Temperatur von 60 °C wiederholt, ließen allerdings auch keine Strukturaufklärung der AhpC in Lösung zu. Durchgeführte Interaktionsstudien mit unmarkiertem wtPar10 zeigten Veränderungen der chemischen Verschiebung in den Signalen der $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -AhpC_kurz-Moleküle, ohne dabei aber deren genaue Lokalisierung bestimmen zu können. Eine präzise Bestimmung der AhpC-Bereiche, welche bei einer AhpC-Par10-Bindung mit Par10 wechselwirken, war nicht möglich. Umgekehrt ließen sich die Bindungsbereiche innerhalb der wtPar10-Sequenz ermitteln (Abschnitt 4.2.2).

4.2.2 NMR-Interaktionsstudien von Par10 und AhpC

Titrationsexperimente in Verbindung mit der Lösungs-NMR-Spektroskopie sind besonders geeignet, um Protein-Protein- oder Protein-Peptid-Interaktionen zu untersuchen. In $^1\text{H}^{\text{N}}$ - ^{15}N -HSQC-Spektren von uniform ^{15}N -markierten Proteinen können die durch Protein-Ligand-Wechselwirkungen auftretenden Signalveränderungen nachverfolgt und miteinander interagierende Proteinbereiche erkannt werden (*chemical shift mapping*) [211].

Heteronukleare $^1\text{H}^{\text{N}}$ - ^{15}N -HSQC-Titrationsexperimente mit ^{15}N -wtPar10 und den unmarkierten AhpC-Varianten 6xHis-*tag*-AhpC, AhpC_kurz sowie mit dem Peptid AhpC¹¹⁵⁻¹³² (Ac-GLADRATFV-VDPQGIIQA-NH₂, bereitgestellt von Dr. Günther Jahreis [MPF]) erlaubten es, die an der Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligten ^{15}N -wtPar10-Aminosäuren zu identifizieren. AhpC¹¹⁵⁻¹³² entsprach einem von drei durch MALEŠEVIĆ *et al.* [126] identifizierten AhpC-Segmenten, welches im IANUS-Peptidassay direkt mit dem bis zu diesem Zeitpunkt vermuteten Substratbindungsbereich von wtPar10 (Leu⁴⁹-Phe⁶¹) interagierte. Aufgrund der vorhandenen Prolylbindung zwischen Asp¹²⁵ und

Pro¹²⁶ wurde AhpC¹¹⁵⁻¹³² als potenzielles wtPar10-Substrat eingehender kernresonanzspektroskopisch untersucht (Abschnitt 4.2.3).

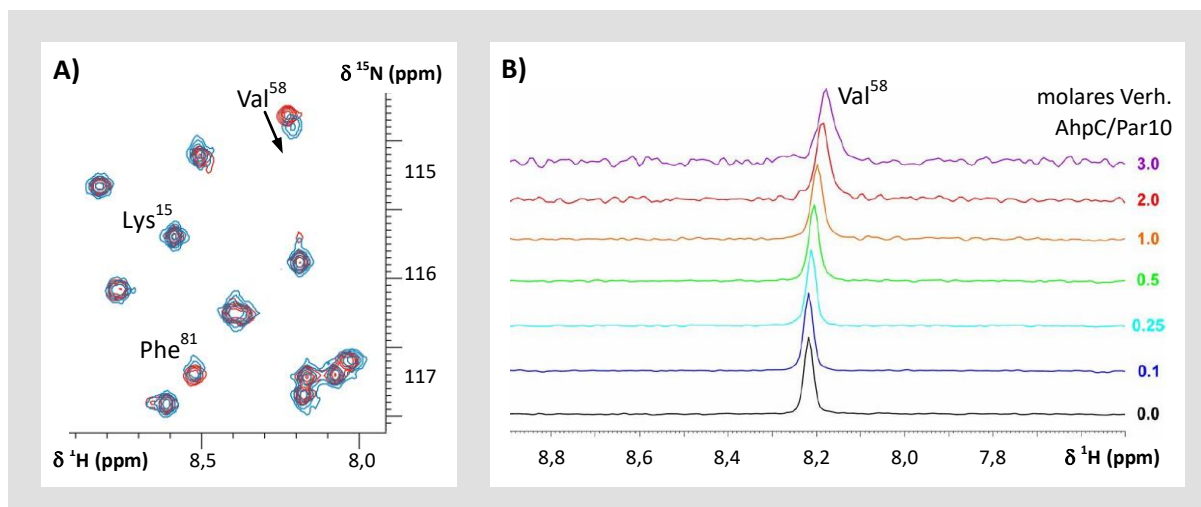


Abb. 4-3. Ausschnitt der $^1\text{H}^{\text{-}15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -wtPar10 und Val⁵⁸-Signalverfolgung. **A)** Ausschnitt der Überlagerung der $^1\text{H}^{\text{-}15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -wtPar10 vor (rote Höhenlinien) und nach Zugabe von unmarkierter AhpC_kurz (blaue Höhenlinien). Verhältnis ^{15}N -wtPar10:AhpC_kurz = 2:1. Die beschrifteten Signale zeigen Beispiele eines nicht verschobenen (Lys¹⁵), eines leicht verschobenen (Phe⁸¹) und eines stark verschobenen $^1\text{H}^{\text{-}15}\text{N}$ -wtPar10-Signals (Val⁵⁸) in Richtung des Pfeils. **B)** Val⁵⁸-Signalverfolgung in der ^1H -Dimension während der Titration von AhpC_kurz zu ^{15}N -markierten wtPar10. Mit Zunahme des molaren Verhältnisses (0-3,0) von AhpC zu ^{15}N -wtPar10 verschob und verbreiterte sich das Val⁵⁸-Signal und gab somit einen Hinweis auf die Bildung eines wtPar10-AhpC-Komplexes. Zur Linienverbreiterung kam es durch die langsamere Brownsche Molekularbewegung des neu gebildeten, größeren wtPar10-AhpC-Komplexes. Bedingungen der $^1\text{H}^{\text{-}15}\text{N}$ -HSQC-Titrationsexperimente: [^{15}N -wtPar10] = 0,5 mM, [AhpC_kurz] = 0 bis 1,5 mM in 10 mM KP_i, 100 mM, 1 mM DTT, 5 % D₂O (v/v), an einem 500 MHz-Spektrometer bei 25 °C aufgenommen.

Die AhpC- beziehungsweise AhpC¹¹⁵⁻¹³²-Peptidzugabe führte zu Änderungen der $^1\text{H}^{\text{-}15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen von Aminosäuren im Bindungstaschenbereich von Par10. Da sich die $^1\text{H}^{\text{-}15}\text{N}$ -Kreuzsignale mit Zunahme des molaren Verhältnisses von AhpC zu ^{15}N -wtPar10 signifikant verschoben und verbreiterten (Abb. 4-3), konnte in allen drei Experimenten von einer ^{15}N -wtPar10-AhpC-Komplexbildung ausgegangen werden. Die beobachteten Linienverbreiterungen kamen durch die vergrößerte Korrelationszeit τ_c in Folge der langsameren Brownschen Molekularbewegung der neu gebildeten, größeren Protein-Protein-Komplexe zustande. Dabei schien der Oligomerisierungsgrad der AhpC-Varianten von untergeordneter Rolle, da die chemischen Verschiebungen der Aminosäureseitenketten von ^{15}N -wtPar10 bei der Titration mit 6xHis-tag-AhpC, AhpC_kurz und AhpC¹¹⁵⁻¹³² weitgehend miteinander übereinstimmten (Abb. 4-4).

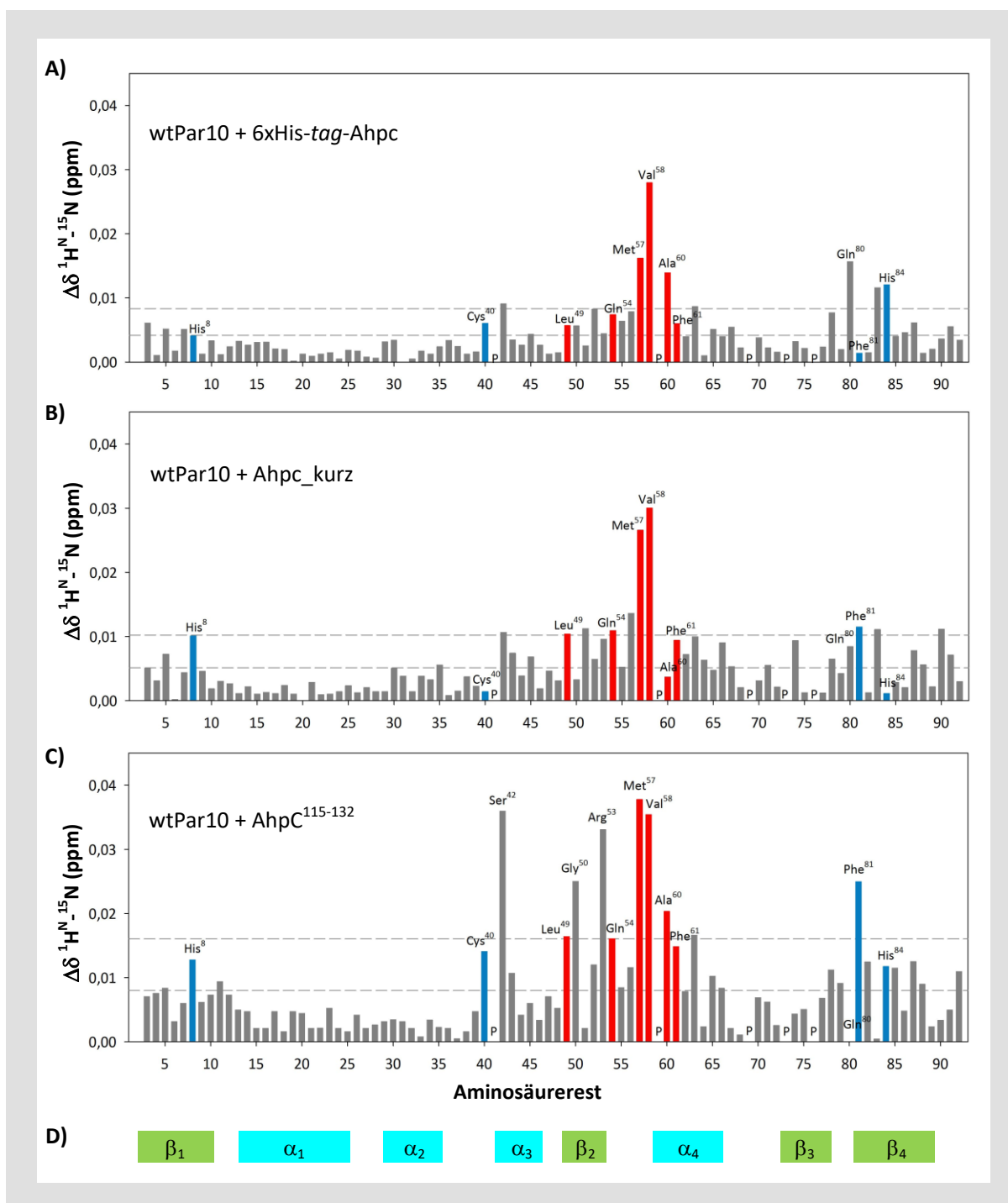


Abb. 4-4. Änderung der $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ chemischen Verschiebung der ^{15}N -wtPar10-Kreuzsignale nach AhpC-Zugabe. Die kombinierte $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebungsänderung ($\Delta\delta\ ^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$) der Amidprotonen des Peptidrückgrats von ^{15}N -wtPar10 ist gegen die entsprechende Aminosäurerestposition in wtPar10 aufgetragen. Aminosäurereste, die mit der Katalyseaktivität (blaue Balken) oder der Substratbindung (rote Balken) in Verbindung gebracht werden, sind im Dreibuchstabencode beschriftet. Prolinreste (P) besitzen keine Amidprotonen (H^{N}) und zeigen keine chemische Verschiebungsänderung. **A)** Verschiebungsänderung in Anwesenheit von Volllängen-6xHis-tag-AhpC. **B)** Verschiebungsänderung in Anwesenheit von verkürzter AhpC_kurz. **C)** Verschiebungsänderung in Anwesenheit des Peptides AhpC¹¹⁵⁻¹³², welches der Sequenz der AhpC-Reste 115-132 entspricht. **D)** Abfolge der Sekundärstrukturelemente des wtPar10. Die jeweils untere gestrichelte Linie in A), B) und C) zeigt die durchschnittliche chemische Verschiebungsänderung, die obere gestrichelte Linie den zweifachen Durchschnittswert. Bedingungen der $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrationsexperimente: [^{15}N -wtPar10] = 0,5 mM, [AhpC_kurz] = 0 bis 1,5 mM in 10 mM KPi , 100 mM, 1 mM DTT, 5 % D_2O (v/v), an einem 500 MHz-Spektrometer bei 25 °C aufgenommen. Berechnung der kombinierten chemischen Verschiebung nach Gleichung (3-10).

Da die $^1\text{H}^{\text{N-}15}\text{N}$ -Korrelationen von ^{15}N -Par10 bekannt waren (BMRB-ID: 5225), war es möglich, die an den Interaktionen beteiligten Aminosäurereste zu bestimmen (mit Ausnahme der Prolinreste, die über keine Amidprotonen verfügen). Hierbei wurde deutlich, dass alle drei AhpC-Varianten mit ^{15}N -Par10 stark wechselwirkten, da sich die $^1\text{H}^{\text{N-}15}\text{N}$ chemischen Verschiebungen vieler Kreuzsignale signifikant verändern.

AhpC¹¹⁵⁻¹³² bewirkte die größten kombinierten $^1\text{H}^{\text{N-}15}\text{N}$ -Verschiebungen der ^{15}N -wtPar10-Aminosäurereste (Abb. 4-4 C). Für 6xHis-tag-AhpC und AhpC_kurz, deren Verschiebungsprofile sich stark ähnelten (Abb. 4-4 A und B), wurden insgesamt kleinere ppm-Verschiebungen beobachtet. Die Aminosäurereste, welche am stärksten ($\Delta\delta \ ^1\text{H}^{\text{N-}15}\text{N}$ -Werten $\geq 0,03$ ppm) respektive am schwächsten ($\Delta\delta \ ^1\text{H}^{\text{N-}15}\text{N} \leq 0,005$ ppm) mit den hinzu titrierten AhpC-Spezies wechselwirkten, stimmten in den drei Profilen weitestgehend überein. Dies betraf insbesondere die sehr stark verschobenen Signale von Met⁵⁷ und Val⁵⁸, zweier Aminosäureseitenketten, welche sich am Rand der hydrophoben Bindungstasche von wtPar10 befinden. Die Mehrzahl der vom katalytischen Zentrum weit entfernten Par10-Aminosäurereste zeigten hingegen keine hervorzuhebenden chemischen Verschiebungsänderungen. Widersprüchliche Resultate zeigten allerdings Cys⁴⁰ und Phe⁸¹, welche größere chemische Verschiebungsänderungen in Anwesenheit von AhpC¹¹⁵⁻¹³² aufwiesen, mit AhpC_kurz und 6xHis-tag-AhpC aber nur mittlere oder sehr geringe Verschiebungsänderungen zeigten.

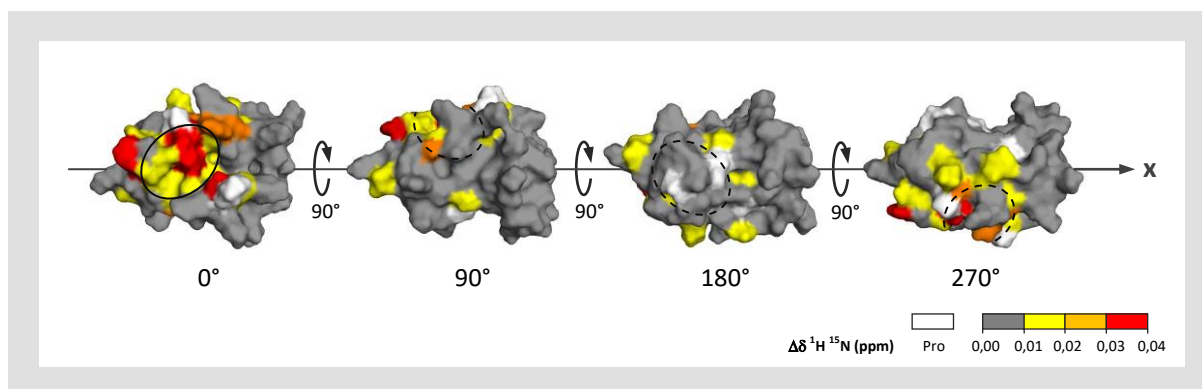


Abb. 4-5. Visualisierung der Interaktionsbereiche von ^{15}N -wtPar10 nach Bindung von AhpC¹¹⁵⁻¹³². Die Informationen aus den $^1\text{H}^{\text{N-}15}\text{N}$ -HSQC-Spektren wurden auf die wtPar10-Oberfläche übertragen. Die verschiedenen Farben repräsentieren die Stärke der chemischen Verschiebungsänderungen in einer Skala von 0 bis 0,04 ppm. Die Einteilung erfolgte nach den in Abb. 4-4 C gezeigten Vektorbeträgen. Prolinreste, welche über keine Amidpotonen verfügen und folglich keine Aussage über chemische Verschiebungsänderungen zuließen, sind weiß dargestellt. Das jeweils um 90° entlang einer gedachten x-Achse gedrehte Parvulinmolekül zeigt bei 0° den Blick in die putative Substratbindungstasche (schwarzes Oval), welche nach Drehungen um 90° verdeckt ist (gestrichelte Linien). Es ist deutlich zu erkennen, dass es vor allem im Bereich der Substratbindungstasche von wtPar10 zu Verschiebungen des Peptidrückgrats gekommen war und von der Bindungstasche entferntere Bereiche kaum mit dem AhpC¹¹⁵⁻¹³²-Peptid interagierten (PDB-ID: 1JNT, Darstellung: PyMol 1.4.1).

Die AhpC¹¹⁵⁻¹³²-induzierten Änderungen der $^1\text{H}^{\text{N-}15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen innerhalb des Proteinrückgrats von ^{15}N -wtPar10 sind in Abb. 4-5 veranschaulicht. Hierfür wurden die absoluten Änderungen der kombinierten $^1\text{H}^{\text{N-}15}\text{N}$ -Verschiebungen entsprechend ihres Betrages stufenweise

eingeteilt und auf die wtPar10-Oberfläche (PDB-ID: 1JNT) mittels einer Farbskala übertragen. Aus der Darstellung ist ersichtlich, dass AhpC¹¹⁵⁻¹³² spezifische Wechselwirkungen mit der Substratbindetasche von Par10 eingeht und die übrigen Molekülbereiche weniger stark beziehungsweise nicht mit dem Peptid interagieren. Ähnliche Darstellungen ergaben sich auch für die 6xHis-tag-AhpC- und AhpC_{kurz}-induzierten Verschiebungen, wenn auch in abgeschwächter Form.

4.2.3 Homonukleare 2D-NOESY-Experimente an AhpC¹¹⁵⁻¹³²

Nachdem eine Bindung zwischen wtPar10 und den jeweiligen AhpC-Varianten 6xHis-tag-AhpC, AhpC_{kurz} und AhpC¹¹⁵⁻¹³² angenommen werden konnte, sollten ¹H/¹H-NOESY-Experimente klären, ob AhpC¹¹⁵⁻¹³² von wtPar10 als Substrat erkannt und umgesetzt wird. In Abwesenheit von wtPar10 war die Umwandlungsgeschwindigkeit der *cis*- und *trans*-Konformere der Prolinbindung zwischen Asp¹²⁵ und Pro¹²⁶ im AhpC¹¹⁵⁻¹³²-Peptid zu gering, um auf der NMR-Zeitskala aufgelöst zu werden. Dies führte zu zwei getrennten Signalen im NOESY-Spektrum, welche von den beiden δ -Ringprotonen der *cis*- und *trans*-Pro¹²⁶-Konformere stammten (Abb. 4-6 A).

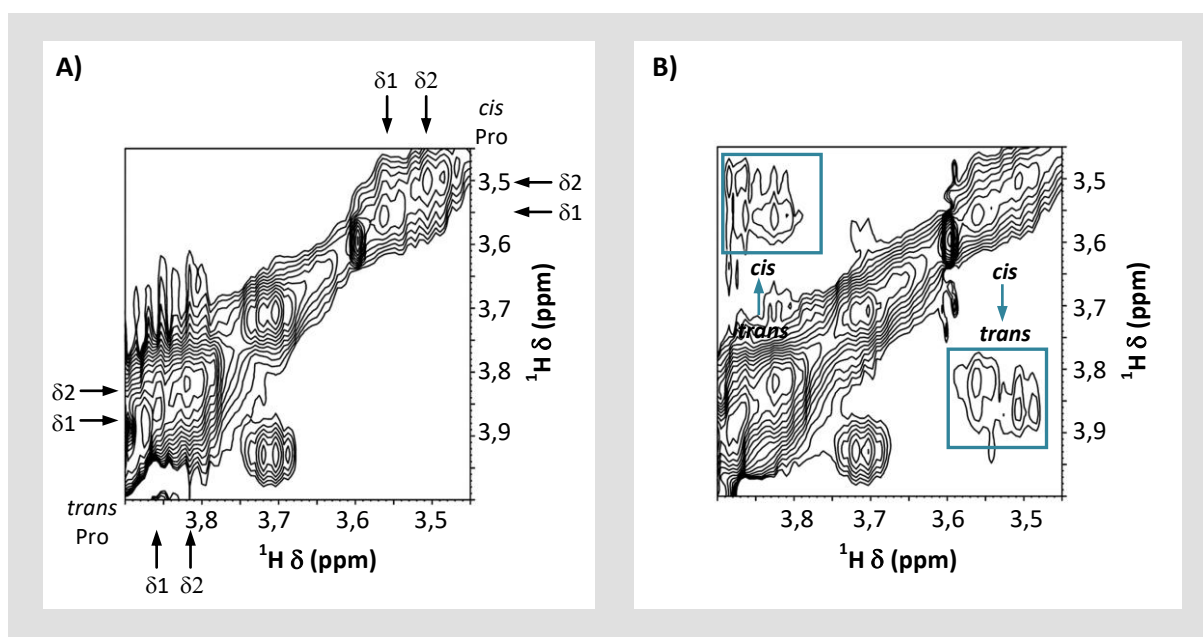


Abb. 4-6. Ausschnitte der ¹H/¹H 2D-NOESY-Spektren von AhpC¹¹⁵⁻¹³². Beide Ausschnitte zeigen im Prolinbereich gespreizte 2D-NOESY-Spektren. Pfeile kennzeichnen die Verschiebungen der δ 1- und δ 2-Ringprotonen von Pro¹²⁶ ($H^{\delta 1}$, $H^{\delta 2}$ der *trans*-Form bei 3,86 und 3,82 ppm, der *cis*-Form bei 3,56 und 3,50 ppm). **A)** AhpC¹¹⁵⁻¹³² in Abwesenheit von wtPar10. **B)** AhpC¹¹⁵⁻¹³² in Anwesenheit von wtPar10. Die zusätzlichen NOESY-Kreuzpeaks zwischen den δ -Ringprotonen von *cis*- und *trans*-Pro¹²⁶ (kleine Kästchen) entstanden durch die von wtPar10 katalysierten *cis*→*trans*- und *trans*→*cis*-Isomerisierungen der Asp¹²⁵-Pro¹²⁶-Bindung. Bedingungen: [AhpC¹¹⁵⁻¹³²] = 3 mM, [wtPar10] = 22 μ M in 10 mM KP_i, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 5 % D₂O (v/v), Spektren über drei Tage an einem 500 MHz-Spektrometer bei 25 °C aufgenommen. Abbildung verändert nach [126].

Die zusätzlichen NOESY-Kreuzpeaks zwischen den δ -Ringprotonen von *cis*- und *trans*-Pro¹²⁶ (Kästchen in Abb. 4-6 B) entstanden erst in Anwesenheit von wtPar10 durch Austauschsignale der δ -Ring-

protonen des Prolylringes während der schnellen *cis*→*trans* und *trans*→*cis* Isomerisierung der Asp¹²⁵-Pro¹²⁶-Bindung durch wtPar10. Die stark erhöhte Umwandlungsgeschwindigkeit ermöglichte die Verfolgung der *cis/trans*-Isomerisierung der Prolylbindung in AhpC¹¹⁵⁻¹³² innerhalb der NMR-Zeitskala und war ein eindeutiger Beleg für die Akzeptanz von AhpC¹¹⁵⁻¹³² als Substrat durch wtPar10.

4.2.4 ¹H^N-¹⁵N-HSQC-Spektren von ¹⁵N-Par10 C40A

Proteine mit einer gefalteten Raumstruktur besitzen charakteristische ¹H^N-¹⁵N-HSQC-Spektren. Jeder Aminosäurerest (mit Ausnahme von Pro) eines gefalteten Proteins sollte ¹H^N-¹⁵N-Kreuzsignale liefern und damit Rückschlüsse auf den Faltungszustand eines Proteins zulassen.

Da Par10 C40A keine enzymatische Aktivität für das Standardsubstrat 2-Abz-AAPF-*p*NA im Vergleich zur Wildtypform zeigte (gemessene Restaktivität von Par10 C40A stammte möglicherweise von kogereinigtem wtPar10), sollten ¹H^N-¹⁵N-2D-HSQC-Spektren der Einzelvariante aufgenommen und mit vorhandenen Spektren von ¹⁵N-wtPar10 verglichen werden, um mögliche Unterschiede im Austauschverhalten einzelner Amidprotonen mit dem Lösungsmittel identifizieren zu können. ¹⁵N-Par10 C40A konnte wie im Abschnitt 4.1.1 beschrieben biosynthetisch hergestellt, gereinigt und für ¹H^N-¹⁵N-HSQC-Messungen verwendet werden. Auf die Ermittlung einer dreidimensionalen NMR-Lösungsstruktur durch sequenzielle Zuordnung anhand von ¹³C/¹⁵N-isotopenmarkierter Par10 C40A-Moleküle und heteronuklearer Tripelresonanzspektren wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

In Abb. 4-7 sind die ¹H^N-¹⁵N-HSQC-Spektren von ¹⁵N-wtPar10 und ¹⁵N-Par10 C40A gegenübergestellt. Beide Spektren waren hoch aufgelöst, da diese über einen großen Spektralbereich verteilte Signale aufwiesen, die das Vorhandensein von definierten Sekundär- und Tertiärstrukturen anzeigten. Zusammengeschobene, stark überlagerte Signale im mittleren Spektralbereich, welche ungeordnete, zufällige Proteinfaltungen anzeigen, waren in schwacher Form nur für das ¹⁵N-Par10 C40A auszumachen.

Die Anzahl der ¹H^N-¹⁵N-Kreuzsignale entsprach im Spektrum für ¹⁵N-wtPar10 der Aminosäureanzahl in wtPar10 (abzüglich der Signale einiger Seitenketten, des *N*-Terminus und der Prolinreste). Einige scheinbar fehlende Signale im Spektrum von ¹⁵N-Par10 C40A (Abb. 4-7 B) waren entweder stark verschoben oder befanden sich im Höhenlinienprofil unterhalb des für die Abb. 4-7 gewählten Bereichs. Die Signaldispersion im ¹⁵N-Par10 C40A-Spektrum entsprach der im ¹⁵N-wtPar10-Spektrum. Im Spektrum von ¹⁵N-Par10 C40A verschobene und/oder linienverbreiterte Signale finden sich vor allem im Strukturbereich des ausgetauschten Cysteins (AS: His³⁷, Ser³⁸, Ile³⁹, Cys⁴⁰, Ser⁴², Gly⁴³), sind aber nicht ausschließlich auf diesen beschränkt (Phe⁸¹, Gly⁸²). Anhand dieses Austauschverhaltens der Amidprotonen mit dem Lösungsmittel wurden lokale Veränderungen der Sekundärstruktur und eine erhöhte Dynamik einzelner ¹⁵N-Par10 C40A-Sekundärstrukturen vermutet (Abschnitt 5.3.1.). Ins-

gesamt ähnelten die Spektren von ^{15}N -Par10 C40A denen, wie man sie für größere Proteine (~20 kDa) erwartet hätte.

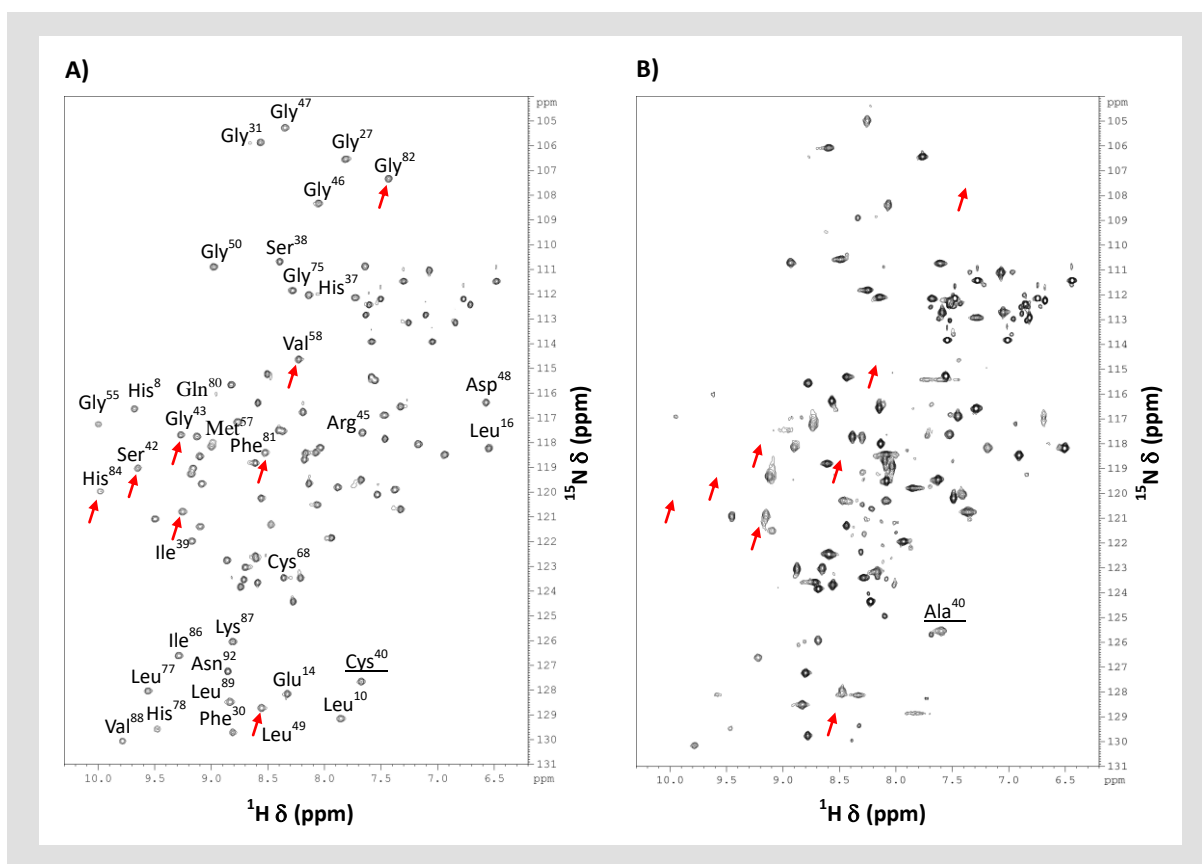


Abb. 4-7. Vergleich der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -wtPar10 und ^{15}N -Par10 C40A. A) Uniform ^{15}N -markiertes ^{15}N -wtPar10 (BMRB-ID: 5225). **B)** Uniform ^{15}N -markiertes ^{15}N -Par10 C40A. Aminosäurereste, deren Signale im ^{15}N -Par10 C40A-Spektrum stark verschoben oder linienverbreitert sind, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur ausgewählte Signale mit einem Dreibuchstabencode gekennzeichnet. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, konnte jedem Signal in B) der entsprechende Aminosäurerest in A) zugeordnet werden. Bedingungen: [Par10] = 0,5 mM in 10 mM KPi , 100 mM KCl, 1 mM DTT, 5 % D_2O (v/v), Spektren an einem 500 MHz-Spektrometer bei 25 °C aufgenommen.

4.3 Synthese fluoreszenzmarkierter Par10-Varianten

Die fluoreszenzmarkierten Par10-Enzyme waren nicht direkt rekombinant herstellbar und sind über eine Semisynthesestrategie unter Verwendung von Peptidzwischenstufen und Segmentligationen realisiert worden (Abb. 4-8). Die hierfür benötigten Par10-Segmente Par10 1-35 und Par10 1-67 wurden als Peptid- α -thioester rekombinant erzeugt und mit den chemisch synthetisierten, an den Seitenkettenfunktionen ungeschützten Segmenten ligiert, welche die Fluoreszenzsonde Dap(Abz) trugen. Für Par10-Varianten, die aus zwei einzelnen Segmenten hergestellt wurden, wurde die Natürlich Chemische Ligation verwendet, für Parvuline, die aus drei Einzelsegmenten entstanden, kam zusätzlich zur Natürlich Chemischen eine durch Trypsinligase katalysierte Enzymatische Ligation hinzu (sequentielle Ligation).

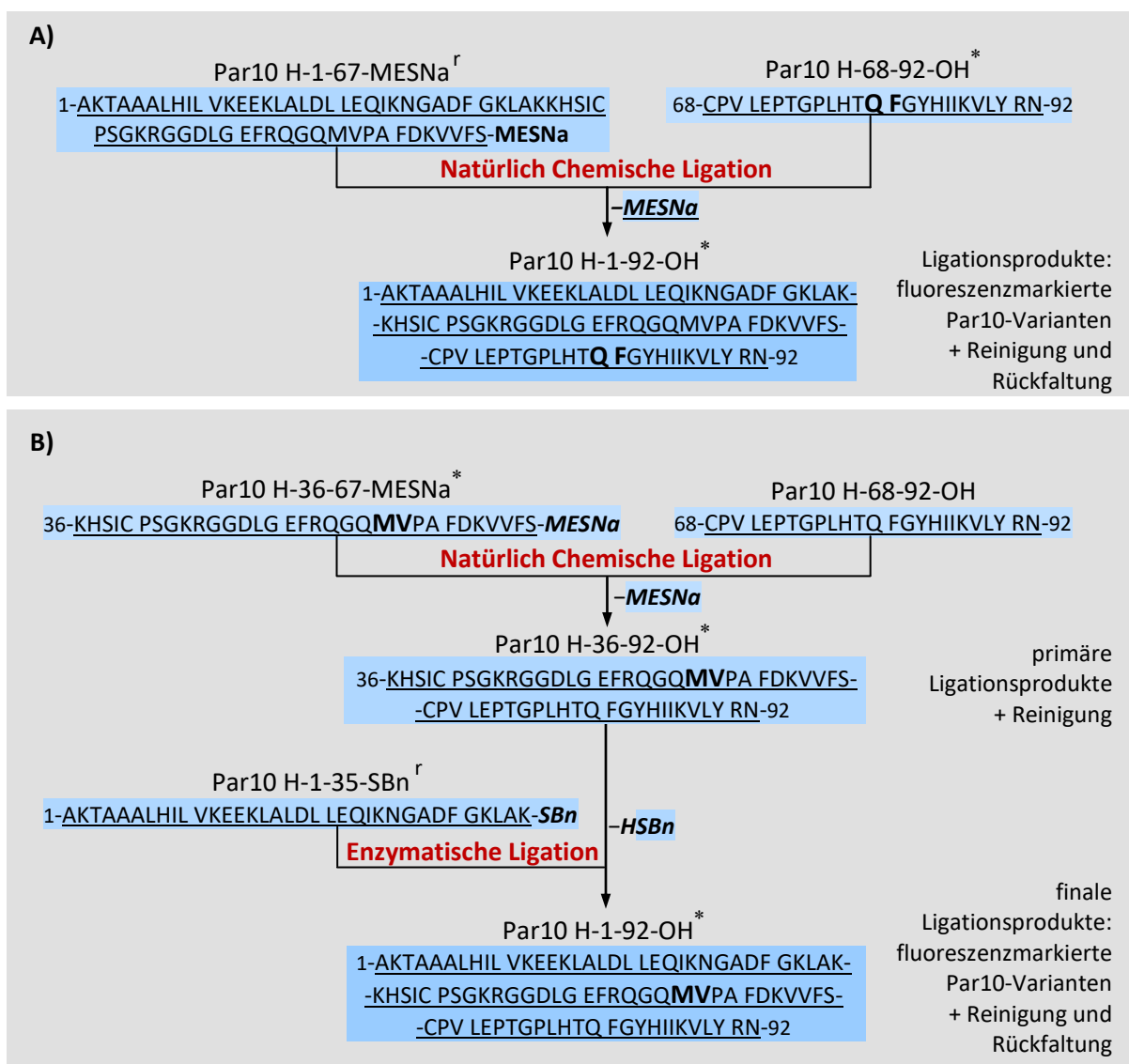


Abb. 4-8. Schemata der Semisynthesen zur Darstellung der fluoreszenzmarkierten Parvulin 10-Derivate. A) Par10 Q80Dap(Abz)- und Par10 F81Dap(Abz)-Synthese. B) Par10 M57Dap(Abz)- und Par10 V58Dap(Abz)-Synthese. **M, V, Q, F** = gegen Dap(Abz) ausgetauschte Aminosäure, **-MESNa** = -ethansulfonsäurethioester (Alkylthioester), **-SBn** = -thiobenzylester (Arylthioester), ***** = enthält Fluoreszenzmarker, **r** = rekombinant erzeugtes Par10-Segment. Alle übrigen Segmente wurden als N-Terminus und Seitenketten ungeschützte Peptide bzw. Peptidthioester chemisch synthetisiert.

4.3.1 Synthese der Fluoreszenzsonde Dap(Abz)

Die Fluoreszenzsonde Dap(Abz) konnte aus kommerziell erhältlichen Vorstufen als Fmoc-/Boc-geschützter Baustein Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH synthetisiert und mittels einer Kieselgelsäule gereinigt werden (Abb. 4-9). Die Syntheseausbeute nach finaler Reinigung betrug 90 % und die Reinheit des Endproduktes konnte mit 96 % (siehe HPLC-Chromatogramm in Abb. 4-9 B) angegeben werden. Bei dem neben der Molekülmasse des Produktes (Abb. 4-9 C, Signal 2 bei 545,7 [M+H]⁺) aufgetretenen zweiten Signal handelt es sich um den Boc-Schutzgruppen-freien Fluoreszenzbaustein (Abb. 4-9 C, Signal 1, gefunden 445,7 [M+H]⁺), welcher durch die benötigten Messbedingungen während der Probenanalyse (250 °C *desolvation*-Temperatur) entsteht. Durchgeführte Dünnschichtchromato-

grafien (DC-Material: TLC *silica gel* 60, Merck, Laufmittelsystem: Essigsäureethylester/Methanol/Essigsäure = 9:1:0,1, Detektion: 254 nm) zeigten während der gesamten Synthese, Aufarbeitung und Isolierung des Bausteins keine spontane Abspaltung der Boc-Schutzgruppe (nicht gezeigt).

Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH konnte erfolgreich als Aminosäurederivat neben den übrigen Aminosäurebausteinen in den entsprechenden Kupplungsschritten der Festphasenpeptidsynthese der Parvulinpeptide 4, 5, 7 und 8 eingesetzt werden (Abschnitt 4.3.2).

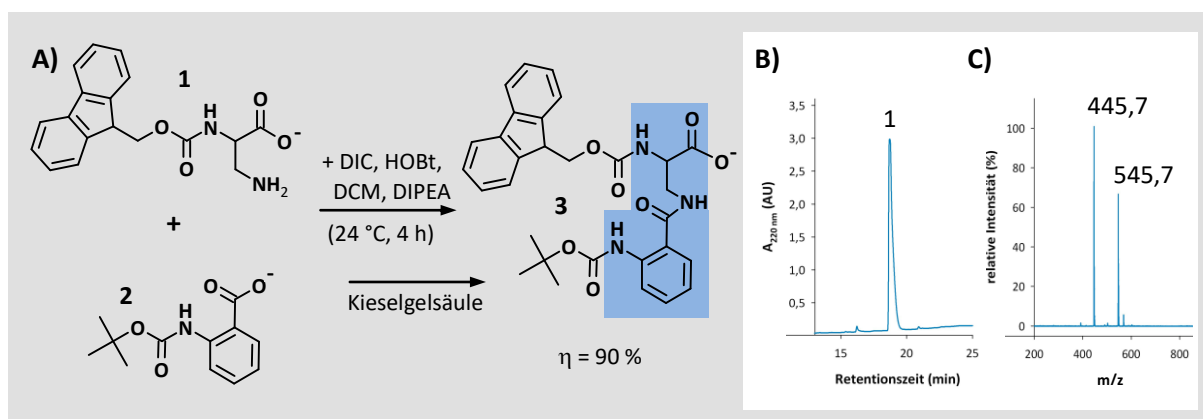


Abb. 4-9. Synthese des Fluoreszenzsondenbausteins Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH. **A)** Syntheschema zur Darstellung von Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH (3) aus Fmoc-L-Dap-OH und dem zuvor mittels DIC aktivierten Boc-2-Abz-OH (2). Der blau hinterlegte Strukturteil zeigt die Fluoreszenzsonde, wie sie nach der Integrierung in die Par10-Sequenz und der Abspaltung der Fmoc- und Boc-Schutzgruppe vorliegt. **B)** HPLC-Chromatogramm des gereinigten Syntheseproduktes Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH (1). **C)** ESI-Massenspektrum von Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH mit den gefundenen Molekülmassen 445,7 [M+H]⁺ für Fmoc-L-Dap(Abz)-OH (Boc-Abspaltung aufgrund der hohen *desolvation*-Temperatur, berechnet: 444,5 Da) und 545,7 [M+H]⁺ für Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH (berechnet 544,6 Da). HPLC-Bedingungen: C₈-RP-Säule, linearer Gradient, 20-80 % ACN in ddH₂O (+0,1 % TFA) in 25 min. Für Reaktionsbedingungen und verwendete Abkürzungen siehe Abschnitt 3.4.3.

4.3.2 Synthese der Par10-Segmente

Par10 H-1-35-MESNa und Par10 H-1-67-MESNa

Die Parvulinsegmente Par10 1-35 und Par10 1-67 konnten unter Verwendung des IMPACT-TWIN-Inteinsystems (NEB) als Fusionsproteine Par-*Mth*-RIR 1-CBD in *E. coli* synthetisiert werden, die es ermöglichten, sie in einem Schritt mittels einer Affinitätschromatografie zu isolieren und sie als C-terminale Peptidthioester zu erhalten. Vorversuche dienten der Ermittlung der optimalen Reinigungs- und Spaltbedingungen für die Fusionsproteine (pH-Wert, pH-Sprung, Spaltdauer, Temperatur), da die Aminosäuresequenz, die Sequenzlänge, die Ausbildung von Sekundärstrukturen und der für die Fusionspaltung zu verwendende Thioester großen Einfluss auf die finalen Ausbeuten haben. Nach Anpassung des Standardreinigungsprotokolls des Herstellers an die eigenen Anforderungen konnten die Fusionsproteine aus den Rohextrakten isoliert, effizient gespalten und die Produkthydrolyse in den folgenden Reinigungs- und Syntheseschritten minimiert werden.

Beide nach Zellaufschluss und Ultrazentrifugation in den Zellextrakten enthaltenen Intein-Fusionsproteine banden jeweils spezifisch an das Chitin-funktionalisierte Säulenmaterial. Die an-

schließenden Waschschriffe mussten aufgrund der schwachen Chitin-CBD-Interaktion bei niedrigen Temperaturen (10 °C) mild erfolgen (wenige Säulenvolumen, geringe Flussrate und niedrige Salzkonzentration). Als Folge ließen sich nicht alle Fremdproteine entfernen. Die Isolierung der Segmente bei einer Umgebungstemperatur von 10 °C minimierte allerdings die Spontanhydrolyse der Par10-Fusionsproteine und deren Elution als freie Carbonsäuren. Initiiert wurde die Spaltung durch die Zugabe des als Spaltreagenz fungierenden Natrium- β -mercaptoethansulfonats (MESNa) und eine simultane pH-Werterhöhung um zwei pH-Einheiten. Als Ergebnis eluierten die Parvulinsegmente als C-terminale Peptidethansulfonsäurethioester Par10 H-1-35-MESNa und Par10 H-1-67-MESNa.

Nach der Konzentrierung der zusammengefassten Elutionsfraktionen diente im Anschluss die Perfusionschromatografie als zweiter Reinigungsschritt dazu, noch vorhandene Fremdproteine abzutrennen, die Proben zu entsalzen und den pH-Wert des Puffers zu senken. Nach der Perfusionschromatografie war ein deutlicher Reinigungseffekt erkennbar. Neben noch vorhandenen Fremdproteinen ließen sich auch die durch Spontanhydrolyse entstandenen freien Carbonsäuren von den intakten Par10-Peptidthioestern abtrennen (massenspektrometrisch nachgewiesen, Daten nicht gezeigt). Saubere Peptidthioesterfraktionen (Reinheit > 90 %) konnten zusammengefasst und gefriergetrocknet werden. Es schloss sich die Umesterung (Transthioesterifizierung) des Alkylthioesters Par10 H-1-35-MESNa mit Benzylmercaptan zum entsprechenden Arylthioester Par10 H-1-35-SBn an. Diese verlief quantitativ und ist in Abb. 4-10 A anhand zweier HPLC-Chromatogramme gezeigt. Der Eduktpeak des Alkylthioesters eluierte bei 16,5 min (Peak 1, bzw. linke Schulter von Peak 2) und lag unter dem Signal des Benzylmercaptans, welches sowohl bei 220 nm als auch bei 254 nm absorbiert. Das ESI-Massenspektrum des Eduktes wies neben dem Signal für Par10 H-1-35-MESNa (Abb. 4-10 B, Peak 1, gefunden: 3886 [M+H]⁺) ein weiteres, marginales Signal auf (Peak 2, gefunden: [3762 M+H]⁺), welches dem unerwünschten Hydrolyseprodukt P10 (1-35)-OH entsprach. Aufgrund der späteren Retentionszeit des Arylthioesters Par10 H-1-35-SBn (20,1 min) ließ sich dieser nach 2 h vom Ausgangsester und vom Benzylmercaptan (17,3 min) abtrennen und ebenfalls massenspektrometrisch nachweisen (Abb. 4-10 B, Peak 3, gefunden: 3869 [M+H]⁺). Es wurden final 0,5-0,75 mg gereinigtes Par10 H-1-35-SBn beziehungsweise 1,5-2,0 mg Par10 H-1-67-MESNa aus einem Liter Flüssigkultur erhalten.

Par10 H-1-35-MESNa fungierte als Ausgangsester für die Substratmimetikaherstellung⁸ und ließ sich als Trypsiligasesubstrat in der Enzymatischen Ligation erfolgreich einsetzen. Par10 H-1-67-

⁸ Bei so genannten inversen Estern (z. B. Peptidyl-4-guanidinophenylester oder Peptidyl-thiobenzylester für Trypsin) ist die Substratspezifität in die Esterabgangsgruppe verlagert. In kinetisch kontrollierten Peptidsynthesen können sie unter Abspaltung der Abgangsgruppe als Acyldonatoren fungieren (Ausbildung eines Acyl-Enzym-Intermediats). Sie werden auch als **Substratmimetika** bezeichnet, da sie, wie im Falle des Trypsins, die Arginylfunktion der natürlichen Substrate „nachahmen“.

MESNa konnte nach der Reinigung als *N*-terminales Teilstück (Thioesterkomponente) für die Natürlich Chemische Ligation eingesetzt werden (Abschnitt 4.3.3).

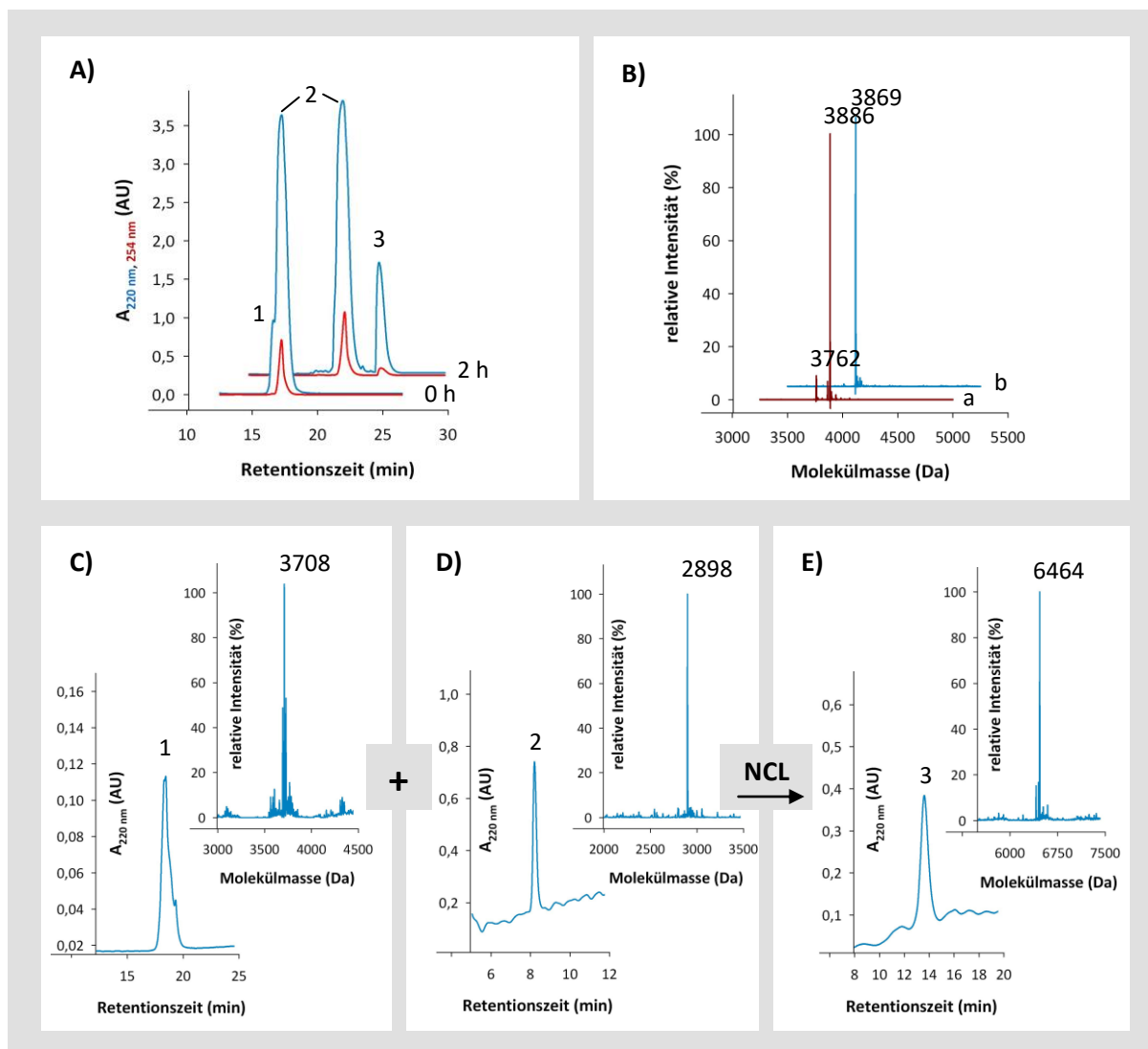


Abb. 4-10. HPLC-Chromatogramme und ESI-Massenspektren ausgewählter Par10-Segmente. **A)** Umesterung von Par10 H-1-35-MESNa zum Substratmimetikum Par10 H-1-35-SBn (3) nach 0 und 2 h. Der Eduktpeak (1) liegt unter dem Signal des Benzylmercaptans (2) und führt zur „Schulterbildung“. **B)** ESI-Massenspektren des Eduktpeaks (a) und des Produktpeaks (b) der Umesterung mit dem Edukt Par10 H-1-35-MESNa (gefunden: 3886 $[M+H]^+$, berechnet: 3884,6 Da), dem Hydrolysen Nebenprodukt Par10 H-1-35-OH (gefunden: 3762 $[M+H]^+$, berechnet 3761,4 Da) und dem Produkt Par10 H-1-35-SBn (gefunden: 3869 $[M+H]^+$, berechnet: 3867,6 Da). **C)** Par10 H-36-67-MESNa V58Dap(Abz) (1), Carboxykomponente für NCL mit nicht abtrennbaren Verunreinigungen. Gefunden: 3708 $[M+H]^+$, berechnet: 3707,3 Da. **D)** Par10 H-68-92-OH (2), Aminokomponente für NCL. Gefunden: 2898 $[M+H]^+$, berechnet: 2896,4 Da. **E)** Par10 H-36-92-OH V58Dap(Abz) (3), Ligationsprodukt der NCL aus Par10 H-36-67-MESNa V58Dap(Abz) und Par10 H-68-92-OH. Gefunden: 6464 $[M+H]^+$, berechnet 6462,5 Da. NCL-Bedingungen: wie in Abb. 4-11 angegeben. HPLC-Bedingungen: C_8 -RP-Säule und C_{18} -RP-Säule (für C), linearer Gradient 20-80 % ACN in ddH₂O (+0,1 % TFA) in 30 min.

Par10-Segmente der Festphasenpeptidsynthese

Alle in Tab. 4-1 aufgeführten mittleren (Peptide 3-5) und C-terminalen Parvulinsegmente (Peptide 6 bis 8) ließen sich nach Standardprotokollen für die Festphasenpeptidsynthese als Peptide mit freiem C-Terminus oder als Peptidthioester synthetisieren (Abschnitt 3.4.3). Kontrollabspaltungen dienen

der Überprüfung des Synthesefortschritts und zeigten deutlich ineffizientere Kupplungsausbeuten bei den mittleren Segmenten. So war für die Herstellung dieser Par10 H-36-67-thioester die Optimierung der Synthesebedingungen notwendig. Beispielsweise wurde die Beladung des polymeren Trägers mit dem ersten Aminosäurerest von 0,49 auf 0,3 mmol/g Harz verringert, die Kupplungsdauer der Aminosäurebausteine auf zweimal 60 min verlängert und ein Gemisch aus DMF/DCM/NMP (1:1:1) mit 1 % Triton X-100 anstatt reinem DMF für die Wasch- und Kupplungsschritte verwendet.

Tab. 4-1. Synthetisierte Par10-Peptide und Par10-Peptidthioester. Die Peptidthioester 1 und 2 wurden rekombinant, die Peptide bzw. Peptidthioester 3 bis 8 mittels Festphasenpeptidsynthese erzeugt. Die Positionen der eingeführten Fluoreszenzsonde sind durch einfache Unterstreichungen gekennzeichnet.

Parvulin 10 Segmente	Peptidsequenzen	Benennung
N-terminale Segmente^f	Aminosäurereste 1-35 bzw. 1-67	Par10-Peptid
H-1-35-MESNa	AKTAAALHILVKEEKLALDLLEQIKNGADFGKLAK	1
H-1-67-MESNa	AKTAAALHILVKEEKLALDLLEQIKNGADFGKLAKKHSICPS GKRGGDLGEFRQQMVPAFDKVVFS	2
mittlere Segmente^c	Aminosäurereste 36-67	Par10-Peptid
H-36-67-MESNa	KHSICPSGKRGGDLGEFRQQMVPAFDKVVFS	3
H-36-67-MESNa M57Dap(Abz)	KHSICPSGKRGGDLGEFRQQ <u>Dap(Abz)</u> VPAFDKVVFS	4
H-36-67-MESNa V58Dap(Abz)	KHSICPSGKRGGDLGEFRQQ <u>MDap(Abz)</u> PAPFDKVVFS	5
C-terminale Segmente^c	Aminosäurereste 68-92	Par10-Peptid
H-68-92-OH	CPVLEPTGPLHTQFGYHIIKVLRYN	6
H-68-92-OH Q80Dap(Abz)	CPVLEPTGPLHT <u>Dap(Abz)</u> FGYHIIKVLRYN	7
H-68-92-OH F81Dap(Abz)	CPVLEPTGPLHT <u>QDap(Abz)</u> GYHIIKVLRYN	8

Dap(Abz) = N^{β} -2-Aminobenzoyl-2,3-diaminopropionsäure, ^f rekombinant erzeugt, ^c chemisch synthetisiert.

Reinheit und Ausbeute der einzelnen Par10-Segmente waren unabhängig vom Vorhandensein und der Position der eingeführten Fluoreszenzsonde Dap(Abz). Nach der Synthese vorhandene Fehl- und Rumpfsequenzen konnten durch zweimalige präparative Reinigung (RP-HPLC) aus den Rohprodukten weitestgehend entfernt werden. Abb. 4-10 C und D zeigen beispielhaft die HPLC-Chromatogramme mit entsprechenden Massenspektren für einen gereinigten fluoreszenzmarkierten Peptidthioester (Par10 H-36-67-MESNa V58Dap(Abz)) und ein gereinigtes unmarkiertes Peptid (Par10 H-68-92-OH), welche anschließend in einer Natürlich Chemischen Ligation miteinander kovalent verknüpft wurden (Abschnitt 4.3.3). In beiden HPLC-Profilen sind eindeutige Hauptprodukte bei Retentionszeiten von 18,4 min beziehungsweise 8,2 min zu erkennen. Einige Thioestersegmente zeigten Peakverbreiterungen oder Schulterbildungen als Hinweise auf vorhandene Verunreinigungen oder Rumpfsequenzen (Abb. 4-10 C). Diese konnten erst nach den erfolgten Ligationen aufgrund der Retentionszeitunterschiede zwischen den Edukten und dem Produkt entfernt werden (Abb. 4-10 E).

Für die Peptidthioester (mittlere Segmente) wurden Rohausbeuten zwischen 23 und 28 % erreicht. Dies entsprach einer durchschnittlichen repetitiven Ausbeute von 95,8 % je Kupplungsschritt (bei insgesamt 32 Kupplungen). Endausbeuten konnten aufgrund nicht abtrennbarer Verunreinigungen hierfür nicht angegeben werden. Die Rohausbeuten für die C-terminalen Par10-Segmente

(25mere) betragen 37-41 % (durchschnittliche repetitive Ausbeute = 96,4 %). Die finalen Ausbeuten nach Reinigung lagen zwischen 11 und 14 % und die Reinheit der löslichen Peptide betrug zwischen 92 und 94 % (HPLC, 220 nm).

4.3.3 Ligation zu fluoreszenzmarkierten Par10-Varianten

Die Peptidthioester (Peptide 2 bis 5) dienten als Carboxykomponente und die C-terminalen Par10-Segmente (Peptide 6 bis 8) als Aminokomponente in den Natürlich Chemischen Ligationen (Tab. 4-1 und Tab. A 2-1 im Anhang). Dabei war es möglich, die Peptide paarweise entsprechend ihrer Sequenz und der Position der Fluoreszenzmarkierung miteinander unter Ausbildung einer Amidbindung in hoher Ausbeute (> 80 %) zu verknüpfen. Abb. 4-11 zeigt anhand einer SDS-Tris/Tricine-Gelelektrophorese exemplarisch die Ligation von Par10 H-1-67-MESNa mit Par10 H-68-92-OH Q80Dap(Abz). Neben beiden Ausgangssegmenten (Bahn a und b) sind das Ligationsprodukt nach zweistündiger Reaktionszeit und das gereinigte Endprodukt (Bahn d), welches massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 4-11 B), gezeigt. Neben Par10 Q80Dap(Abz) und Par10 F81Dap(Abz) waren auch die Ligationsprodukte Par10 H-36-92-OH M57Dap(Abz) und Par10 H-36-92-OH V58Dap(Abz) über NCL-Reaktionen zugänglich und konnten nachfolgend für die enzymkatalysierte Ligation eingesetzt werden. Die isolierten Ausbeuten der NCLs betragen nach HPLC-Reinigung zwischen 62 und 73 %.

Zusammen mit den mittels Festphasenpeptidsynthese generierten Peptiden und Peptidthioestern, welche in den zuvor ausgewählten Positionen Met⁵⁷ und Val⁵⁸ 2-Aminobenzoesäure als Fluoreszenzsonde enthielten, ermöglichten ELs mit Par10 H-1-35-SBn die Darstellung der Par10-Varianten Par10 M57Dap(Abz) und Par10 V58Dap(Abz). Abb. 4-11 C zeigt einen semipräparativen RP-HPLC-Lauf nach erfolgter enzymkatalysierter Ligation von Par10 H-1-35-SBn (Substratmimetikum) und Par10 H-36-92-OH V58Dap(Abz) zu Par10 V58 Dap(Abz). Aufgrund ähnlicher Retentionszeiten (23,5 und 24,4 min) ließen sich Ligationsprodukt und hydrolysiertes Substratmimetikum nur unter Ausbeuteverlusten und unvollständig voneinander trennen. Aus diesem Grund wird die ermittelte maximale Ligationsausbeute von 40,5 % für die EL selbstkritisch betrachtet. Gradientenanpassungen der mobilen Phase und die Verwendung einer C₁₈-RP-Säule als stationäre Phase führten zu keiner signifikanten Verbesserung der Trennleistung (nicht gezeigt). Das im dreifachen Überschuss zum Substratmimetikum eingesetzte und somit nicht vollständig umsetzbare Nukleophil eluierte bei 17,3 min und ließ sich rückstandsfrei von der markierten Par10-Variante abtrennen. Die Abb. 4-11 D zeigt das ESI-MS-Massenspektrum von Par10 V58Dap(Abz) mit einer Signalspitze bei 10207 Da, was der um ein Proton erhöhten Molekülmasse im Vergleich zum berechneten Wert von 10205,9 Da entspricht.

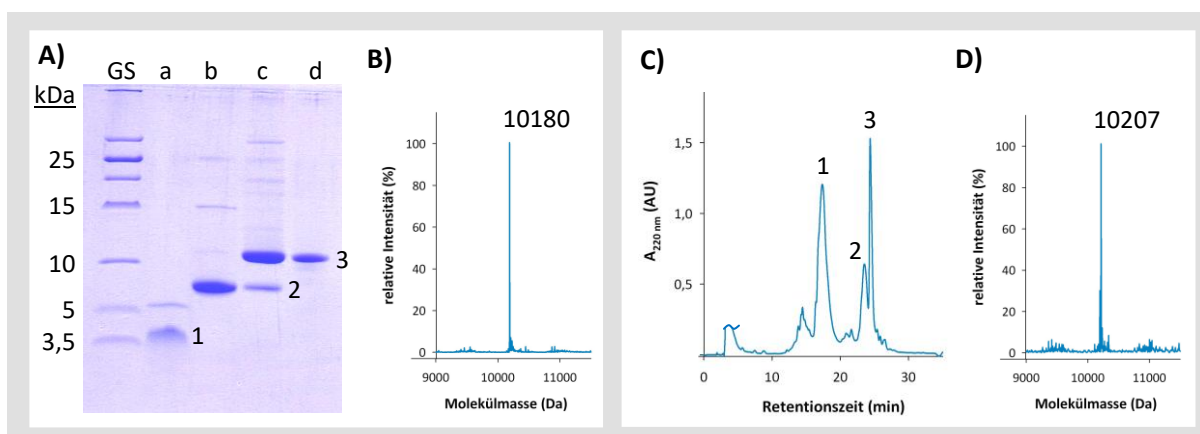


Abb. 4-11. Segmentkondensationsreaktionen zur Generierung fluoreszenzmarkierter Par10-Varianten. **A)** SDS-Tris/Tricine-PAGE der Natürlich Chemischen Ligation von Par10 H-68-92-OH Q80Dap(Abz) (1 in Bahn a) und Par10 H-1-67-MESNa (2 in Bahnen b und c) zu Par10 Q80Dap(Abz) (3 in Bahnen c und d). GS = Größenstandard, a = Aminokomponente, b = Carboxykomponente, c = Reaktionsansatz nach 2 h. d = gereinigtes Produkt. Bedingungen: [Segmente] = 2 mM, 4 M GdmCl, 50 mM NaP_i (pH 8), 1 mM TCEP, 1 % (v/v) Thiophenol, 25 °C. **B)** ESI-Massenspektrum des isolierten Produktes Par10 Q80Dap(Abz). Gefunden: 10180 [M+H]⁺ berechnet: 10177,9 Da. **C)** HPLC-Chromatogramm der Enzymatischen Ligation von Par10 H-1-35-SBn und Par10 H-36-92-OH V58Dap(Abz) (1) zu Par10 V58Dap(Abz) (2) mittels Trypsiligase nach 1 h. Peak 3 = Hydrolyseprodukt Par10 H-1-35-OH von Par10 H-1-35-SBn. Bedingungen: 1 mM Par10 H-1-35-SBn (Substratmimetikum), 3 mM Par10 H-36-92-OH (Nukleophil), 10 µM Trypsiligase, 100 mM HEPES (pH 7,8), 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, und 20 µM ZnCl₂, 25 °C, 1 h. **D)** ESI-Massenspektrum des isolierten Produktes Par10 V58Dap(Abz). Gefunden: 10207 [M+H]⁺, berechnet: 10205,9 Da. HPLC-Bedingungen: C₈-RP-Säule, linearer Gradient 25-75 % ACN in ddH₂O(+0,1 % TFA) in 30 min. Für Ligationsbedingungen siehe Abschnitt 3.5.

Beide in Abb. 4-8 dargestellten Synthesestrategien waren erfolgreich und in jedem Fall wurden die gewünschten Syntheseprodukte erhalten. Eine Spaltung der Edukte oder des Ligationsprodukts nach der trypsiligasekatalysierten Reaktion war nicht festzustellen.

Die vollständig synthetisierten und gereinigten fluorophoren Par10-Varianten zeigten alle die erwarteten Absorptions- und Emissionsspektren. Mit einem Maximum der Absorption bei 320 nm und einem Maximum bei 420 nm im Emissionsspektrum (Abb. 4-19) entsprachen diese Spektren denen der 2-Aminobenzoyl- enthaltenden Positivkontrolle 2-Abz-Ala-OH (Spektren nicht gezeigt).

4.4 Fern-UV CD-Spektroskopie zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts

Um Aussagen über die Sekundärstrukturanteile der untersuchten Proteine und Peptide und über mögliche strukturelle Veränderungen aufgrund der vorgenommenen Mutationen und eingeführten Fluoreszenzmarkierungen treffen zu können, wurde die Fern-UV CD-Spektroskopie als schnelle Methode zur Konformationsanalyse von Proteinen und Peptiden genutzt [193]. Diese Methode kam auch für die Ermittlung geeigneter Pufferbedingungen für die NMR-Messungen zum Einsatz.

Die Peptidrückgratstruktur selbst wird als Chromophor genutzt, welcher innerhalb des Fern-UV-Bereiches (170-250 nm) aufgrund seiner Chiralität rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht unter-

schiedlich stark absorbiert. Extrema um 190 nm und 207 nm (beides $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Peptidbindung) und um 220 nm ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Peptidbindung) sind Kennzeichen für überwiegend helikale Proteinstrukturen und waren damit besonders geeignet, um mögliche Konformationsänderungen durch die vorgenommenen Mutationen, Proteinverkürzungen und -modifizierungen zu verfolgen.

Die Auswertung gemessener CD-Spektren erfolgte durch den Vergleich mit Standardspektren bekannter Konformation und dem Programm CDNN [195]. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Spektren zu gewährleisten, wurden die ursprünglichen Messsignale der Einheit mdeg in die mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest in $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ umgerechnet (Gleichung (3-4)).

wtPar10, Par10 C40A, Par10 C68A

wtPar10 und Par10 C68A zeigten nahezu identische CD-Spektren und damit übereinstimmende relative prozentuale Sekundärstrukturanteile (Abb. 4-12 A und Tab. 4-2). Beide Spektren besaßen ein absolutes Maximum bei 195 nm und ein absolutes Minimum bei 222 nm sowie ein schwächeres Minimum bei 207 nm als Ergebnis der Überlagerung der beiden Grundformen für reine α -helikale und β -Faltblattstrukturen. Die zusätzlich vorhandenen ungeordneten Strukturen in beiden Parvulinvarianten bewirkten eine Verminderung der absoluten Signalhöhe.

Die Auswertung des Fern-UV-CD-Spektrums der Mutante Par10 C40A ergab einen geringeren α -Helixanteil bei gleichzeitiger Zunahme an β -Faltblatt- und Knäuelstrukturen verglichen mit der Wildtypform und der Par10 C68A-Variante. Im Spektrum waren diese Veränderungen durch ein geringeres CD-Messsignal bei 195 nm und ein örtliches Minimum bei 207 nm zu erkennen.

Par10 1-67, Par10 68-92 und unligierte Par10 1-67-/Par10 68-92-Segmente

Die CD-Spektren des rekombinant erzeugten Par10 1-67-Segments und des durch die Festphasenpeptidsynthese hergestellten Par10 68-92-Segments ähnelten stark Spektren von Peptiden, die keine definierten Sekundärstrukturen aufweisen (Abb. 4-12 B) [212, 213]. Die Spektren wiesen zwar starke negative Signale zwischen 202 und 206 nm auf, ließen aber eine für vollständig ungeordnete Strukturen leicht positive Elliptizität bei 220 nm vermissen, wie sie für Spektren von Modellpeptiden erhalten werden. Die Auswertung der experimentellen Spektren mittels der CDNN-Software ergab neben der Dominanz ungeordneter Strukturen einen stark erhöhten β -Faltblattanteil relativ zum α -helikalen Anteil (Tab. 4-2).

Beide nicht kovalent miteinander verbundenen Segmente zeigten bei äquimolaren Konzentrationen auch nach längerer Rekonstruktionszeit keine Bildung von nativ-ähnlichen Sekundärstrukturen. Das entsprechende Spektrum glich stark dem des Einzelsegments Par10 1-67. Zum Vergleich für Spektren ungeordneter Parvulinstrukturen diente ein bei niedrigem pH-Wert (pH 2,5) (teil)ent-

faltetes Parvulin. Hohe Ionenstärken und niedrigere pH-Werte führen zum Verlust stabilisierender ionischer Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb von Proteinen.

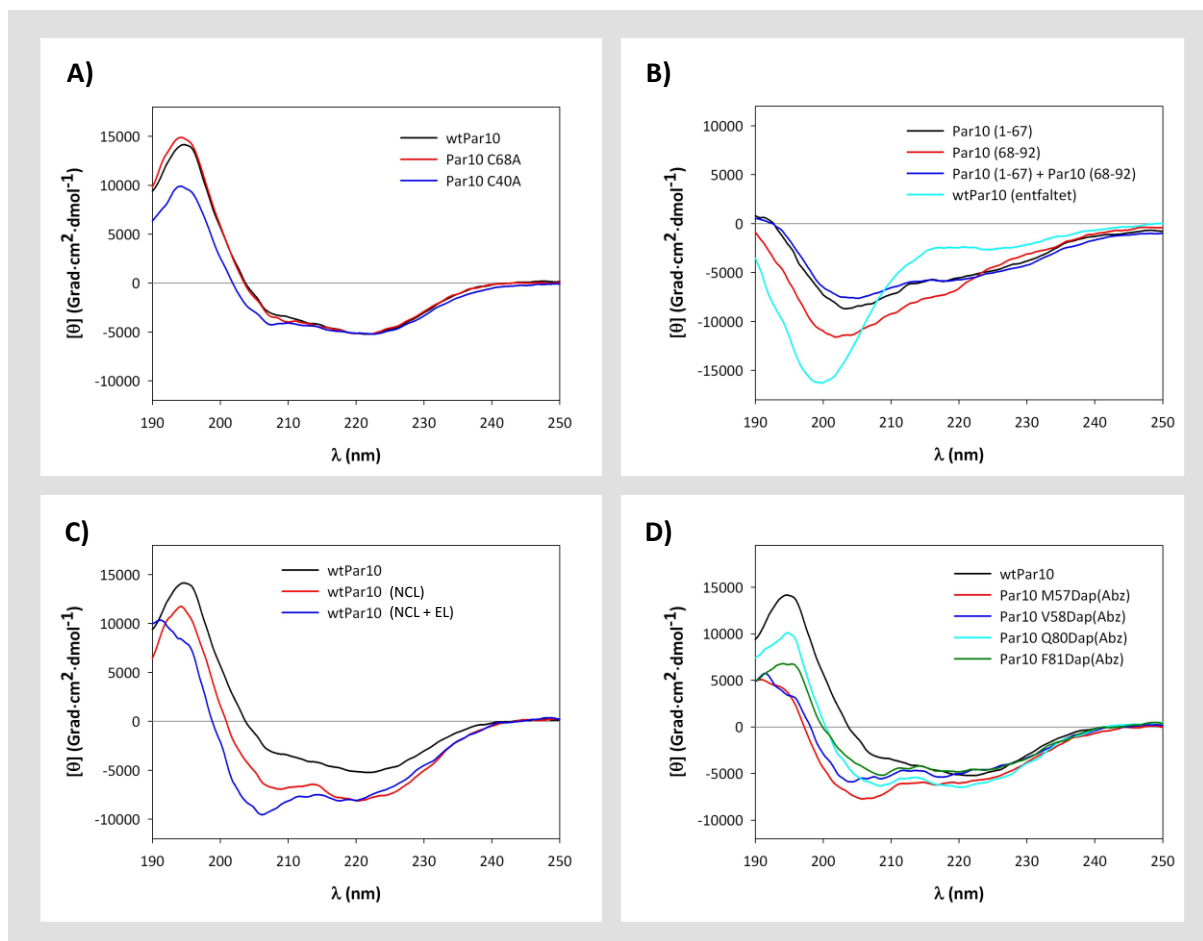


Abb. 4-12. Vergleich der Fern-UV CD-Spektren der Par10-Varianten und ausgewählter Par10-Segmente. A)-D) CD-Spektren von miteinander verglichenen Proteinen (Legenden in den einzelnen Teilabbildungen A-D). Das wiederholt gezeigte CD-Spektrum von wtPar10 dient zur besseren Vergleichbarkeit mit den Par10-Varianten. Alle Spektren wurden auf die mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest ($[\theta]$) in $\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ normiert. Bedingungen für A-D: Jasco J-810 CD-Spectropolarimeter, [Protein] bzw. [Peptid] = 3-10 μM in 5 mM KP_i -Puffers (pH 7,25), 20 °C, 190-250 nm, 1 mm Quarzküvette, 30 Spektren akkumuliert, Bandenweite 1 nm, Scangeschwindigkeit 50 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ Antwortzeit 1 s, Nullspektren abgezogen.

Rekonstruierte Wildtyp-Parvuline

Um den Einfluss der durchgeführten NCL und der kombinierten NCL/EL auf die Sekundärstrukturausbildung unabhängig von den eingeführten Fluoreszenzsonden beurteilen zu können, wurde unmarkiertes Par10 nach den in Abb. 4-8 gezeigten Schemata hergestellt (nicht-markierte Parvulin-spezies aus zwei Segmenten bzw. aus drei Segmenten) und die erhaltenen CD-Spektren mit den entsprechenden Spektren der Dap(Abz)-modifizierten Varianten verglichen (Abb. 4-12 C). Die Spektren der ligierten wt-Varianten zeigten einen veränderten Kurvenverlauf mit ausgeprägteren Minima bei 207 und 220 nm im Vergleich zur rekombinanten Wildtypform (mit deutlicheren Abweichungen für das aus drei Segmenten hergestellte Parvulin). Bei beiden „zusammengesetzten“ Varianten verschoben sich die Spektren hin zu größeren Anteilen an α -helikalen und ungeordneten

Strukturen, was am Auftreten der für α -helikale Strukturen charakteristischen Minima bei 207 beziehungsweise 209 nm und 220 nm zu erkennen war. Beim wtPar10, welches durch zwei Ligationen entstanden ist, zeigte sich zusätzlich eine Verschiebung des absoluten Maximums von 196 nach 192 nm, was als ein weiteres Indiz für einen höheren α -Helixanteil gehalten wurde. Die generelle Abnahme der Signalintensität wurde als ein Hinweis auf vermehrte Zufallsknäuelstrukturen gedeutet.

Die durch das Programm CDNN (Version 2.1) ermittelten Sekundärstrukturanteile weichen teilweise deutlich von der eigenen Interpretation der CD-Spektren ab (Tab. 4-2 und Abschnitt 5.3.1). Als Ursache wird ein zu geringer Datensatz (33 Modellpeptide/-proteine) vermutet, welches das Programm für die Dekonvolution von gemessenen CD-Spektren verwendet.

Tab. 4-2. Ermittelte Sekundärstrukturanteile verschiedener Par10- und AhpC-Spezies. Die Anteile an α -helikalen, β -Faltblatt und ungeordneten Strukturen wurden anhand der mittleren Elliptizität pro Aminosäurerest unter Verwendung des Programms CDNN errechnet. Die Spektrenaufnahme erfolgte bei 20 °C in einer 1 mm Quarzküvette in 5 mM KP_i-Puffer (pH 7,25). Die Protein- beziehungsweise Peptidkonzentrationen betragen zwischen 3-10 μ M.

Par10-Variante/ Par10-Segment ¹	Sekundärstruktur		
	α -Helixstruktur	β -Faltblattstruktur ²	Zufallsknäuelstruktur
wtPar10 ^f	37,0 %	31,7 %	31,2 %
Par10 C68A ^f	37,5 %	31,7 %	30,8 %
Par10 C40A ^f	29,5 %	35,1 %	35,4 %
wtPar10 (entfaltet) ^f	6,0 %	48,2 %	48,5 %
Par10 (1-67) ^f	21,6 %	43,2 %	42,8 %
Par10 H-68-92-OH ^c	9,5 %	49,2 %	41,0 %
Par10 (1-67) ^f + Par10 H-68-92-OH ^c	16,8 %	44,4 %	39,5 %
Par10 (NCL) ^{r+c}	29,2 %	37,0 %	33,2 %
Par10 (NCL + EL) ^{r+c}	20,1 %	49,4 %	31,1 %
Par10 M57Dap(Abz) ^{r+c}	25,6 %	39,3 %	37,1 %
Par10 V58Dap(Abz) ^{r+c}	22,1 %	41,6 %	36,0 %
Par10 Q80Dap(Abz) ^{r+c}	36,6 %	32,8 %	31,2 %
Par10 F81Dap(Abz) ^{r+c}	26,2 %	38,5 %	35,7 %
AhpC-Variante			
6xHis-tag-AhpC ^f	32,7 %	37,8 %	29,9 %
AhpC_kurz ^f	29,0 %	40,0 %	32,3 %

¹Die ungleiche Schreibweise der Par10-Varianten bzw. Par10-Segmente dient der Unterscheidung zwischen rekombinant erzeugten Par10-Segmenten (z. B. Par10 (1-67)) und chemisch synthetisierten Par10-Segmenten (z. B. Par10 H-68-92-OH). Dap(Abz) = N ^{β} -2-Aminobenzoyl-2,3-diaminopropionsäure. ^f rekombinant erzeugt, ^c chemisch synthetisiert. ²Die vom CDNN-Programm angegebenen prozentualen Anteile für parallele und antiparallele β -Faltblattstrukturen sowie β -Faltblattschleifen wurden als β -Faltblattstruktur zusammengefasst.

Par10 M57Dap(Abz), Par10 V58Dap(Abz), Par10 Q80Dap(Abz) und Par10 F81Dap(Abz)

Die Spektren der Parvulinvarianten, welche eine Fluoreszenzsonde enthielten, unterschieden sich in manchen Bereichen erheblich von dem CD-Spektrum des wtPar10 (Abb. 4-12 D), ähnelten aber den entsprechenden aus zwei beziehungsweise drei Teilsegmenten analog synthetisierten unmarkierten Par10-Varianten. Am auffälligsten waren die niedrigeren Signalintensitäten um 195 nm und eine

ausgeprägtere negative Elliptizität im Bereich um 205-208 nm. Damit scheint es in allen markierten Parvulinsepezies zu Sekundärstrukturänderungen gekommen zu sein. Auch hier wurde die Signalintensitätsabnahme auf eine Zunahme an ungeordneten und eine Abnahme an α - und β -Faltblattstrukturen zurückgeführt.

6xHis-tag-AhpC und AhpC_kurz

Die gemessenen Fern-CD-Spektren der AhpC-Variante mit *N*-terminalem 6xHis-tag (6xHis-tag AhpC) und der verkürzten AhpC-Variante (AhpC_kurz) zeigten beide die charakteristischen Merkmale überwiegend aus α -helikalen und β -Faltblattstrukturen aufgebaute Proteine, welche nur einen geringen Anteil an Schleifen- und Zufallsknäuelstrukturen aufweisen (Abb. 4-13). So spiegelten die positiven Signale bei 193 nm (6xHis-tag AhpC) und 194 nm (AhpC_kurz) und die insgesamt niedrige Signalintensität zwischen 210-228 nm für beide Proteinvarianten die hohen α -Helixanteile wider und die absoluten Minima bei 218 nm ließen für beide Varianten hohe β -Faltblattstrukturen vermuten.

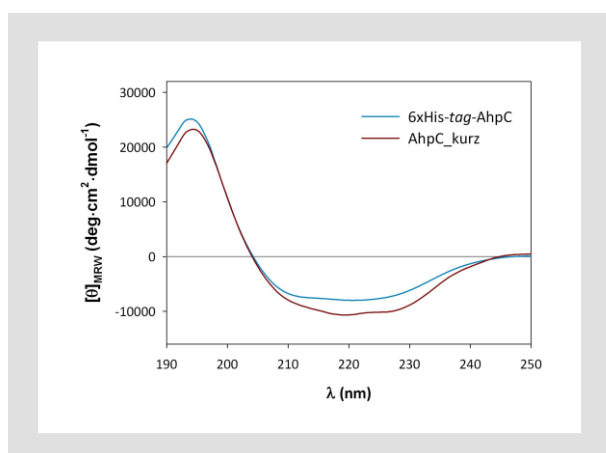


Abb. 4-13. Vergleich der Fern-UV CD-Spektren von 6xHis-tag-AhpC und AhpC_kurz. CD-Spektrum der vollständigen AhpC mit nicht-spaltbarem 6xHis-tag (Cyan) und CD-Spektrum der *N*-terminal (ohne 6xHis-tag) und *C*-terminal verkürzten AhpC (Dunkelrot). Beide Spektren wurden auf die mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest ($[\theta]$) in $\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ normiert. Bedingungen: Jasco J-810 CD-Spectropolarimeter, $[\text{AhpC}] = 10 \mu\text{M}$ in 5 mM KP_i -Puffers (pH 7,25), 20 °C, 190-250 nm, 1 mm Quarzküvette, 30 Spektren akkumuliert, Bandenweite 1 nm, Scangeschwindigkeit $50 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ Antwortzeit 1 s, Nullspektren abgezogen.

4.5 Proteolytische Stabilität der Parvulinvarianten gegenüber Trypsin

Zusammen mit den aufgenommenen CD-Spektren ließen die zeitabhängigen tryptischen Proteolysen der Par10-Varianten Rückschlüsse auf die strukturellen Effekte der ortsgerichteten Mutagenesen zu. wtPar10, Par10 C40A und Par10 C68A enthielten jeweils alle dreizehn potenzielle Trypsinspaltstellen (je Parvulinsequenz 10 Lysin- und 3 Argininseitenketten). Die Aminosäureaustausche C40A und C68A führten zu keiner Veränderung der Anzahl an theoretischen Spaltstellen. Beide Parvulinvarianten zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der limitierten Proteolyse verglichen mit wtPar10 (erkennbar an der schnelleren Peakflächenabnahme im jeweiligen HPLC-Elutionsprofil, nicht gezeigt), aber eine deutlich langsameren proteolytischen Abbau als das zuvor hitzedenaturierte wtPar (Abb. 4-14). Par10 C40A wurde allerdings doppelt so schnell durch Trypsin abgebaut wie die C68A-

Variante. Man kann daraus ableiten, dass der Austausch des Cys⁴⁰ gegen einen Alaninrest einen größeren Einfluss auf die Gesamtstruktur ausübt als ein analoger Austausch des Cys⁶⁸.

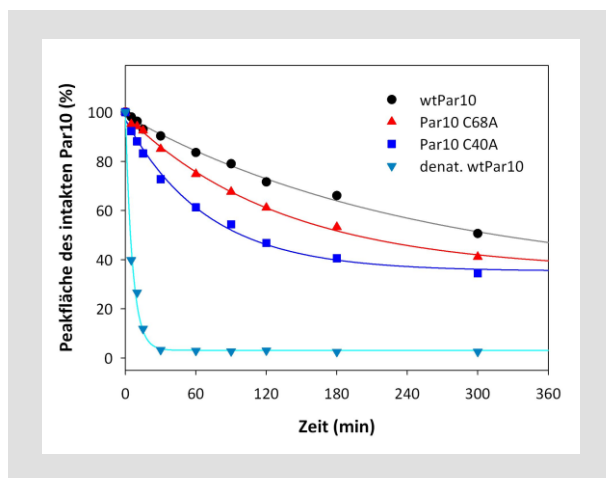


Abb. 4-14. Untersuchung zur Stabilität der Parvulinvarianten mittels limitierter Proteolyse. Der proteolytische Abbau wurde mittels HPLC-Analyse bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt, indem die relative Abnahme der intakten Parvulinspezies über die entsprechende Peakfläche im HPLC-Chromatogramm quantifiziert wurde. Kurven stellen Trendlinien zu den experimentellen Daten (Symbole) dar. Bedingungen: [Trypsin] = 0,03 mg·ml⁻¹, [Par10] = 250 μM, [Benzoessäure] = 2 μM (interner Standard) in 100 mM Tris (pH 8,45), 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 30 °C, detektiert bei 280 nm.

4.6 Experimentell bestimmte Enzymaktivitäten

4.6.1 Spezifitätskonstanten der Par10-Varianten und ausgewählter Par10-Segmente

Für die Ermittlung der katalytischen Effizienz der verschiedenen Par10-Varianten wurden die Spezifitätskonstanten $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1}$ in $M^{-1} \cdot s^{-1}$ als Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung bestimmt und miteinander verglichen. Dabei kam ein proteasefreier PPIase-Aktivitätstest zum Einsatz, da dieser gegenüber einem proteasegekoppelten Test mehrere Vorteile aufweist (höherer *cis*-Peptidanteil zu Reaktionsbeginn, günstigeres Signal-Rausch-Verhältnis, keine Proteolyse von Substrat oder Enzym) [214, 215]. Die Spezifitätskonstante $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1}$ für das Standardsubstrat 2-Abz-AAPF-*p*NA bei pH 7,8 und 10 °C wurde durch eine exponentielle Glättung erster Ordnung der primären Verlaufskurven (Fluoreszenzsignal bei 420 nm aufgetragen gegen die Zeit, Abb. 4-15 A) und die lineare Anpassung der Abhängigkeit von k_{obs} von der PPIase-Konzentration (Sekundärauftragung, Abb. 4-15 B) bei konstanter Substratkonzentration bestimmt. Zur übersichtlicheren Darstellung sind die relativen Spezifitätskonstanten in Abb. 4-16 in Prozent aufgetragen. Die Absolutwerte für $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1}$ in $M^{-1} \cdot s^{-1}$ sind im Anhang in Tab. A 3-1 aufgeführt.

Das Substrat 2-Abz-AAPF-*p*NA wurde durch wtPar10 am effizientesten umgesetzt. Die ermittelte Spezifitätskonstante von $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1} = 9,9 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^5 M^{-1} \cdot s^{-1}$ stimmte mit der zuvor mit einem proteasegekoppelten PPIase-Test gemessenen Konstante von $6,8 \times 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$ angenähert überein [26]. Die C68A-Mutante (96 % der Wildtypaktivität) war annähernd so effizient wie wtPar10 mit einer Spezifitätskonstante von $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1} = 9,5 \times 10^6 \pm 4,1 \times 10^5 M^{-1} \cdot s^{-1}$. Par10 C40A war nahezu katalytisch inaktiv

($k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1} = 5,0 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) mit nur noch $0,5 \pm 0,01 \%$ der katalytischen Effizienz von wtPar10.

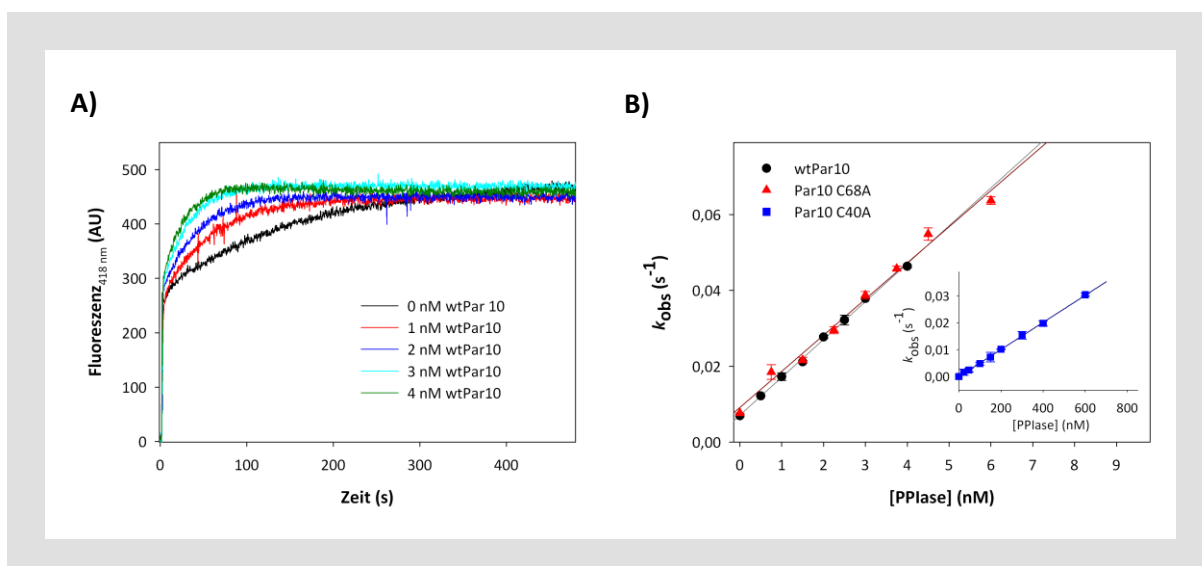


Abb. 4-15. Proteasefreie PPIase-Aktivitätstests. A) Verlaufskurven der *cis/trans*-Isomerisierung des Substrates 2-Abz-AAPF-*p*NA ($c = 25 \mu\text{M}$) ohne wtPar10 und in Anwesenheit verschiedener wtPar10-Konzentrationen in 35 mM HEPES (pH 7,8) mit 1 mM DTT bei 10 °C, $\lambda_{\text{An}} = 320 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 420 \text{ nm}$. B) Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} von der Parvulinkonzentration. Aus den jeweiligen Anstiegen ergaben sich die Spezifitätskonstanten $k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1}$ (Abb. 4-16 und Tab. A 3-1). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zweier unabhängiger Aktivitätsmessungen an. Bedingungen für Enzymtest: wie in Abschnitt 3.7.1 angegeben.

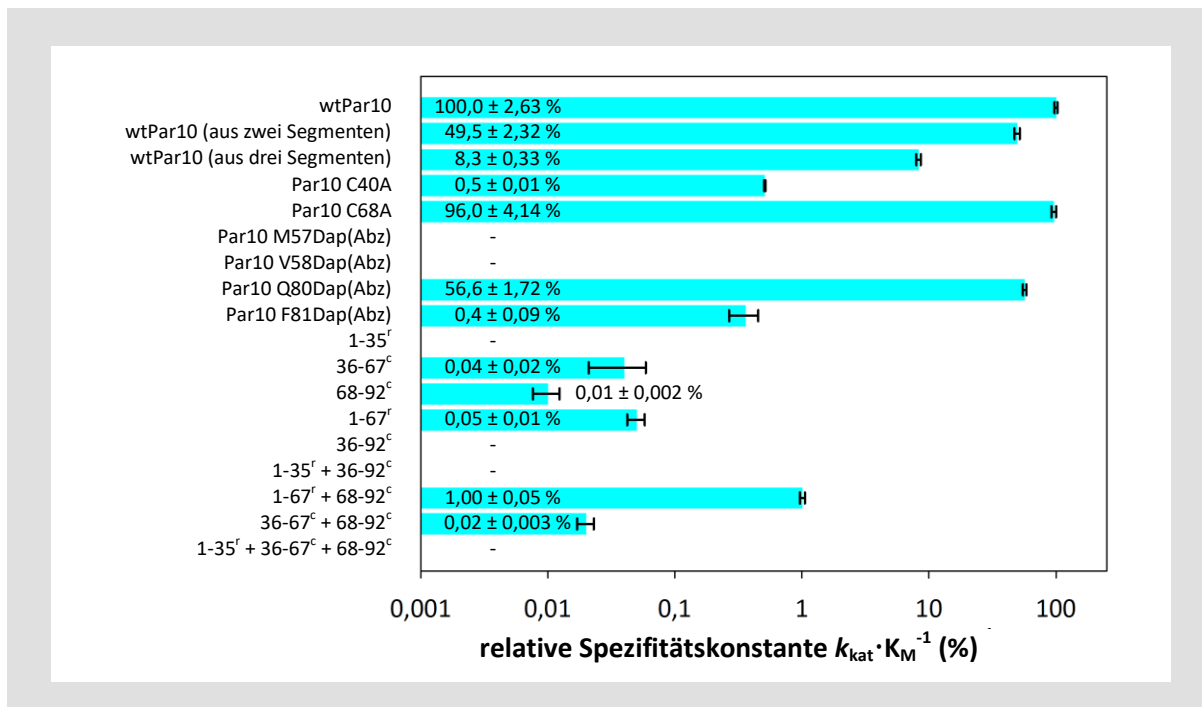


Abb. 4-16. Übersicht über die relativen Spezifitätskonstanten $k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1}$. Für die relativen Spezifitätskonstanten in Prozent wurde die Spezifitätskonstante von wtPar10 (Wildtypaktivität) 100 % gesetzt und alle übrigen Angaben darauf bezogen. Für Parvulinvarianten oder Par10-Segmente ohne Prozentangabe (-) war keine Aktivität nachweisbar. Die absoluten Spezifitätskonstanten in $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ sind im Anhang in Tab. A 3-1 aufgeführt. Fehlerprozentangaben und Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern der Regressionsanalysen zur Ermittlung der Spezifitätskonstanten, welche anhand von mindestens sechs Datenpunkten ermittelt wurden. ^r = rekombinant erhaltenes Par10-Segment, ^c = chemisch synthetisiertes Par10-Segment.

Von den vier hergestellten fluoreszenzsondentragenden Parvulinvarianten zeigte nur Par10 Q80Dap(Abz) mit einem $k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1}$ -Verhältnis von $5,6 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ eine katalytische Aktivität in der Größenordnung von wtPar10. Par10 F81Dap(Abz) wies eine 0,4%ige Restaktivität zum wtPar10 auf und besaß damit die katalytische Effizienz der unmarkierten Par10 C40A-Mutante. Für die Varianten, bei denen Met⁵⁷ beziehungsweise Val⁵⁸ durch die Fluoreszenzsonde ausgetauscht wurde, konnte keine PPIase-Aktivität festgestellt werden.

4.6.2 AhpC-Aktivitätstest

Die für die NMR-Experimente verwendeten AhpC-Varianten wurden auf ihre Peroxidaseaktivität hin überprüft. Bei den verwendeten DTT-Oxidationstests (Abschnitt 3.7.2) war eine Steigerung des Substratumsatzes in Abhängigkeit von der AhpC-Konzentration für alle getesteten AhpC-Varianten nachweisbar. Eine Peroxidreduktion durch DTT als Reduktionsmittel erfolgte auch in Abwesenheit von AhpC. Die zeitabhängige Umsetzung von *t*BHP durch 6xHis-*tag*-AhpC ist in Abb. 4-17 beispielhaft gezeigt.

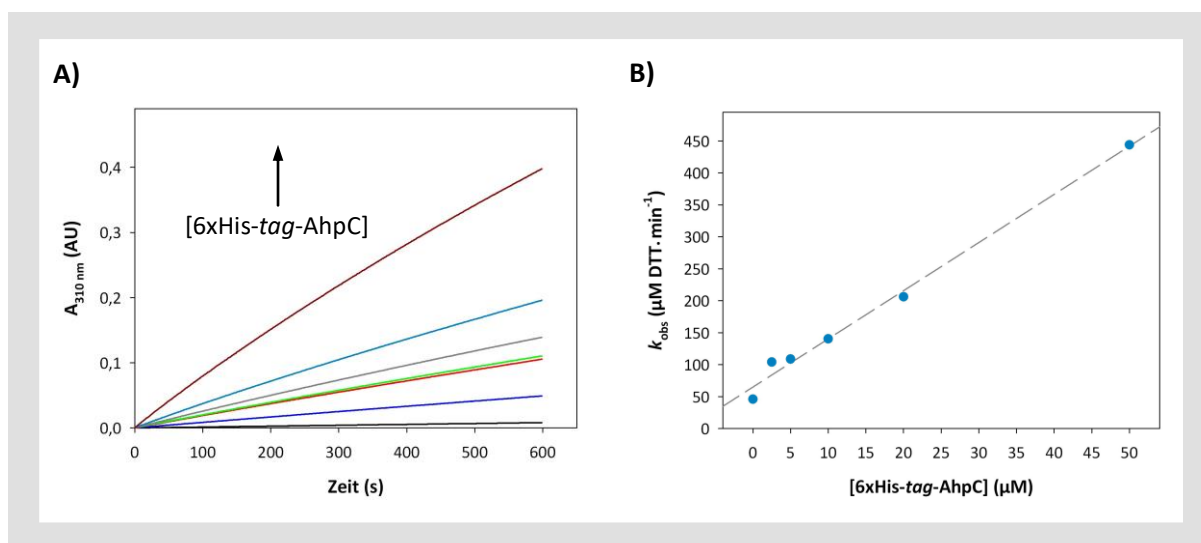


Abb. 4-17. AhpC-Aktivitätstest. A) Verlaufskurven des DTT-Oxidationstests für 6xHis-*tag*-AhpC mit dem Substrat *tert.*-Butylhydroperoxid (*t*BHP) und dem Hilfssubstrat Dithiothreitol (DTT), dessen Oxidation bei 310 nm verfolgt werden konnte. Gezeigt sind die DTT-Oxidation in Abwesenheit von *t*BHP und 6xHis-*tag*-AhpC (schwarze Kurve), die DTT-Oxidation durch das Substrat *t*BHP in Abwesenheit von 6xHis-*tag*-AhpC (blau) und die DTT-Oxidation bei steigender 6xHis-*tag*-AhpC-Konzentration (2,5 μM [rot], 5 μM [grün], 10 μM [grau], 20 μM [türkis], 50 μM [dunkelrot]) in Anwesenheit von *t*BHP. Messbedingungen: wie in Abschnitt 3.7.2 angegeben. B) DTT-Oxidationsrate (in $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$) in Abhängigkeit von der 6xHis-*tag*-AhpC-Konzentration (in μM). Aufgetragene Punkte (türkis) entsprechen den Anstiegen der Verlaufskurven aus A) und gepunktete Kurve zeigt die lineare Abhängigkeit der DTT-Oxidation von der 6xHis-*tag*-AhpC-Konzentration (Anstieg = $7.54 \pm 0,36 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$). Bedingungen für Enzymtest: wie in Abschnitt 3.7.2 angegeben.

k_{kat} - oder K_{M} -Werte konnten mit dem verwendeten Aktivitätstest, welcher ohne AhpF und $\text{NADH} + \text{H}^+$ durchgeführt werden konnte, nicht ermittelt und somit nicht mit Literaturdaten verglichen werden. Zum einen war die AhpC-Regenerierung durch DTT geschwindigkeitsbestimmend und nicht, wie für

eine nach einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik verlaufende Enzymreaktion gefordert, die Produktbildung. Zum anderen erlaubte der apparative Aufbau des benutzten Spektrophotometers keine Messung unter Sauerstoffausschluss.

4.7 pH-Aktivitätsprofil und pK_S -Werte der Cys⁴⁰- und Cys⁶⁸-Seitenkette in Parvulin 10

pH-Aktivitätsprofil des wtPar10

Für das pH-Aktivitätsprofil wurden die $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1}$ -Werte über einen pH-Bereich von 2,6 bis 9,8 aufgetragen. Die logarithmische Auftragung $\log(k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1})$ gegen den pH, wie in Abb. 4-18 A dargestellt, wurde gegenüber der linearen bevorzugt, da der Anstieg des aufsteigenden Astes der Trendlinie einen Hinweis auf die Anzahl der ionisierten Seitenkettengruppen geben kann, welche zur beobachtbaren pH-Abhängigkeit beitragen. Der so ermittelte Anstieg = 1 deutet darauf hin, dass die volle Aktivität erreicht wird, wenn eine Seitenkettenfunktion deprotoniert ist [216]. Der in Abb. 4-18 A angegebene pK_S -Wert von $5,48 \pm 0,07$ ergibt sich aus dem Schnittpunkt der diagonalen und horizontalen Geraden extrapoliert aus den beiden linearen Abschnitten der Kurve. Dieser pK -Wert spiegelt möglicherweise auch den pK_S -Wert einer einzelnen ionisierbaren Seitenkette in Par10 wider. Die k_{obs}/pH -Auftragung der in Abb. 4-18 A dargestellten Daten zeigt eine einfach sigmoid verlaufende Kurve mit ansteigender Aktivität bei ansteigendem pH (nicht gezeigt).

pK_S -Wertbestimmung der Sulfhydrylgruppe von Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸

Die Deprotonierung der Sulfhydrylgruppe der Cysteinseitenkette mit ansteigendem pH-Wert konnte für alle Proben aufgrund der Differenz in der Absorption bei 240 nm zwischen dem dissoziierten Thiolatanion und der undissoziierten Thiolform verfolgt werden. Die entsprechenden Kurven waren S-förmig mit einem Plateau im alkalischen Bereich (Abb. 4-18 D) und konnten nach der angegebenen HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung (Gleichung (3-6)) gefittet werden. Unterschiede zwischen den kürzeren, aus Zufallsstrukturen bestehenden Par10-Segmenten und den Vollängen-Par10-Einzelmutanten mit definierten Sekundärstrukturen waren erkennbar (Abb. 4-18 C und D). Die gefundenen pK_S -Werte für die kurzen Par10-Segmente betrugen 8,08, 8,25 und 8,43 und stimmten damit nahezu mit dem pK_S -Wert von $8,55 \pm 0,03$ bei 25 °C für das Pentapeptid AACAA überein [217]. Sowohl Cys⁴⁰ als auch Cys⁶⁸ wiesen in den entsprechenden Varianten einen um mehr als drei pH-Einheiten niedrigeren pK_S -Wert verglichen mit dem pK_S -Wert einer freien Cysteinseitenkette auf. Diese Ergebnisse konnten durch Verwendung von DTNB zur Bestimmung der pK_S -Werte von Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸ für die Vollängen-Parvuline bestätigt werden (Abb. 4-18 B). Die Reaktionsgeschwindigkeiten für die Reaktion der Par10 C40A- und der Par10 C68A-Variante mit DTNB als ein Maß für die Deprotonierung der Cysteinseitenkette stieg mit steigendem pH-Wert an und erreichte ein Plateau oberhalb pH 7. Die

Absenkung des pK_S -Wertes von Cys⁶⁸ war dabei nicht so deutlich wie bei der Ermittlung mittels der spektroskopischen Detektion bei 240 nm. Die bestimmten pK_S -Werte sind in Tab. 4-3 zusammengefasst.

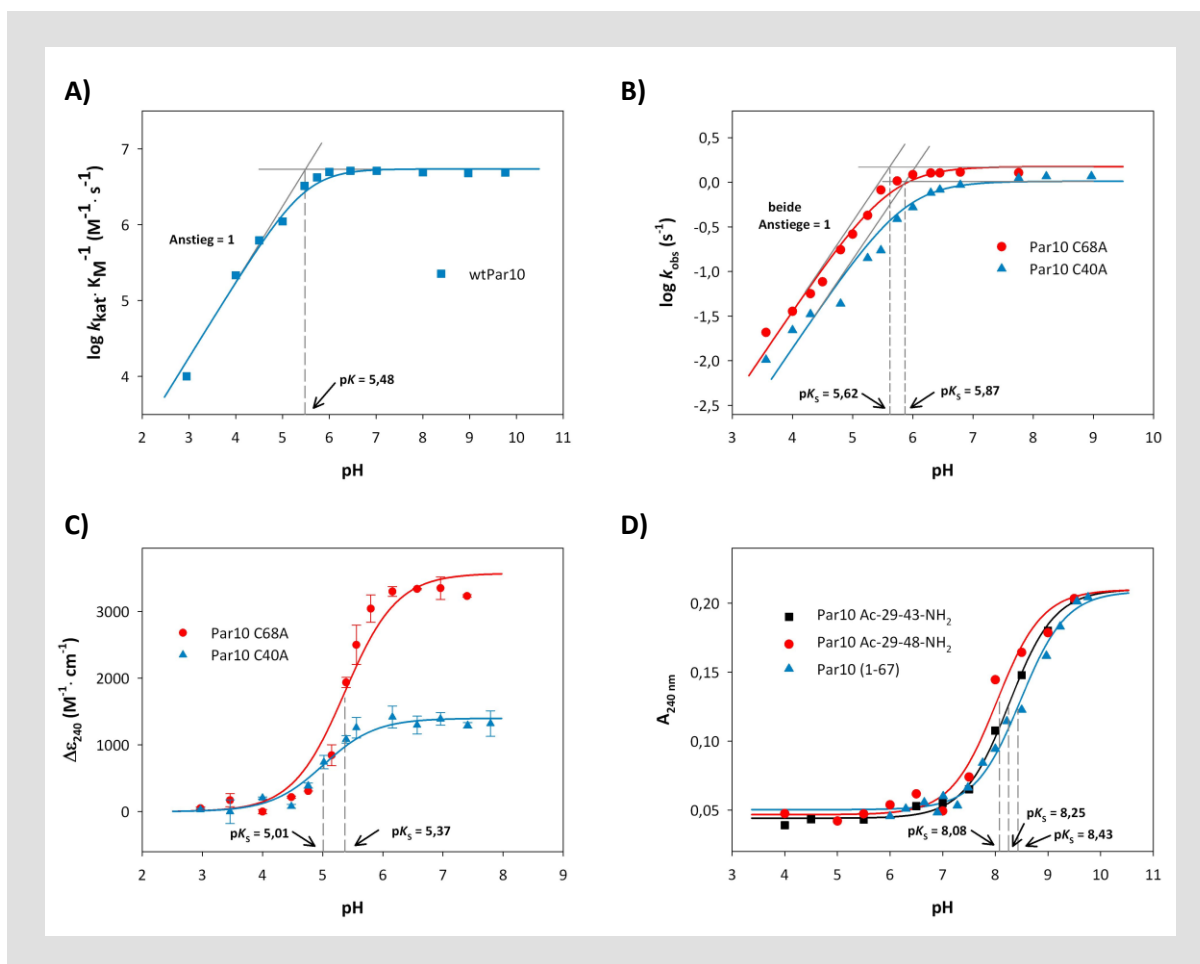


Abb. 4-18. pH-Aktivitätsprofil von wtPar10 und pK_S -Werte der Sulfhydrylgruppen von Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸.
A) Abhängigkeit der Spezifitätskonstante ($k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1}$) von wtPar10 vom pH-Wert. Der Anstieg des aufsteigenden Astes der Trendlinie der logarithmischen Auftragung betrug 1 und deutet damit auf eine monophasische Abhängigkeit von $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1}$ vom pH-Wert hin. Der ermittelte pK -Wert von 5,48 ergab sich aus dem Schnittpunkt der beiden linearen Trendlinien. **B)** Abhängigkeit der beobachteten Reaktionsgeschwindigkeit des Umsatzes von DTNB mit Cys⁴⁰ in Par10 C68A und Cys⁶⁸ in Par10 C40A mit den daraus ermittelten pK_S -Werten für die beiden Sulfhydrylgruppen. **C)** Änderung der Extinktionskoeffizienten der Sulfhydrylgruppen von Cys⁴⁰ bzw. Cys⁶⁸ bei 240 nm mit steigendem pH-Wert (Doppelbestimmungen). Nicht-lineare Regression erfolgte nach HENDERSON-HASSELBALCH (Gleichung (3-6)), die Wendepunkte ergaben die angegebenen pK_S -Werte. **D)** Absorptionsänderung der Thiolatgruppe des Cys⁴⁰ in unstrukturierten Par10-Peptiden bei 240 nm mit steigendem pH-Wert. Nicht-lineare Regression erfolgte nach HENDERSON-HASSELBALCH (Gleichung (3-6)), die Wendepunkte ergaben die angegebenen pK_S -Werte. Messbedingungen für A-D: siehe Abschnitte 3.6.7. und 3.7.1. Symbole stellen experimentelle Daten dar, während Kurven daran angepasste Trendlinien repräsentieren. Alle ermittelten pK_S -Werte mit den Fehlerintervallen sind in Tab. 4-3 zusammengefasst.

Par10 C40A und Par10 C68A wichen in den $\Delta\epsilon_{240}$ -Werten deutlich voneinander ab. So betrug $\Delta\epsilon_{240}$ für Par10 C68A $3560 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Abb. 4-18 C). Für Par10 C40A wurde ein deutlich niedrigerer Wert von $1400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmt, welcher im Gegensatz zur molaren Absorptionsänderung $\Delta\epsilon_{240}$ von

4000 M⁻¹·cm⁻¹ für die vollständige Ionisierung einer Sulfhydrylgruppe, wie von DONOVAN *et al.* beschrieben [199], stand.

Tab. 4-3. pK_S(SH)-Werte der Cysteinseitenkette in L-Cystein, Par10-Segmenten, Par10 C40A und Par10 C68A. Angegebene Standardfehler $\sigma_{\bar{x}}$ für die pK_S-Werte wurden aus den Regressionsgeraden der A_λ vs. pH-Auftragungen erhalten.

Par10 Segment/ Par10 Mutante	Cystein	pK _S 1 ± σ _̄ (A _{240 nm} -Methode)	pK _S 2 ± σ _̄ (DTNB-Methode)	Arithm. Mittel \bar{x} aus pK _S 1 und pK _S 2 mit Standardfehler σ _̄
L-Cystein ¹	Cystein	8,26 ± 0,03	7,55 ± 0,02	7,90 ± 0,36
Dithiothreitol (DTT) ¹	-	9,53 ± 0,02	n. b.	-
Par10 Ac-29-43-NH ₂ ²	Cys ⁴⁰	8,25 ± 0,04	n. b.	-
Par10 Ac-29-48-NH ₂ ²	Cys ⁴⁰	8,08 ± 0,09	n. b.	-
Par10 H-1-67-OH	Cys ⁴⁰	8,43 ± 0,08	n. b.	-
Par10 H-1-92-OH C68A	Cys ⁴⁰	5,37 ± 0,09	5,62 ± 0,07	5,50 ± 0,13
Par10 H-1-92-OH C40A	Cys ⁶⁸	5,01 ± 0,09	5,87 ± 0,11	5,44 ± 0,43

¹L-Cystein und DTT dienten als Positivkontrollen. ²Synthetisiert und gemessen von Dr. B. HARTRODT, Literaturwerte: pK_S(L-Cys-Seitenkette) = 8,33 [217]; pK_{S,1}(DTT) = 9,2, pK_{S,2}(DTT) = 10,1 [218]. n. b. = nicht bestimmt.

Für das freie L-Cystein, das DTT (Positivkontrollen, nicht gezeigt) und die Par10-Segmente konnten nur pK_S-Werte aber keine ϵ_{240}^{obs} (pH)- oder $\Delta\epsilon_{240}$ -Werte bestimmt werden. Aufgrund der nicht vorhandenen aromatischen Aminosäureseitenketten (keine Absorption bei 280 nm) war in diesen Fällen die Gleichung (3-5) zur Berechnung der Extinktionskoeffizienten nicht anwendbar.

4.8 Par10-Ligand-Bindungsstudien

4.8.1 Fluoreszenzlöschung der Par10-Varianten durch kovalente Bindung von 2-INPA

Die in Par10 eingebrachten fluorophoren 2-Aminobenzoylfunktionalitäten (anstelle von Met⁵⁷, Val⁵⁸, Gln⁸⁰ bzw. Phe⁸¹) wurden dahin gehend untersucht, ob diese Fluorophor/Quencher-Paare bilden und eine Fluoreszenzlöschung der 2-Aminobenzoylfluoreszenz mit steigender Quencherkonzentration stattfindet. Als ein kovalent an Cys⁴⁰ bindender Quencher wurde 2-Iod-N-(4-nitrophenyl)acetamid (2-INPA) gewählt, welcher sich erfolgreich synthetisieren und für nachfolgende Modifizierungsreaktionen einsetzen ließ (Abb. 4-19 A-C). In einem Abstand kleiner 7 Å quencht der im Molekül enthaltene 4-Nitroanilidrest die Fluoreszenz des bei 320 nm angeregten und bei 420 nm lichtemittierenden 2-Aminobenzoylrestes [219].

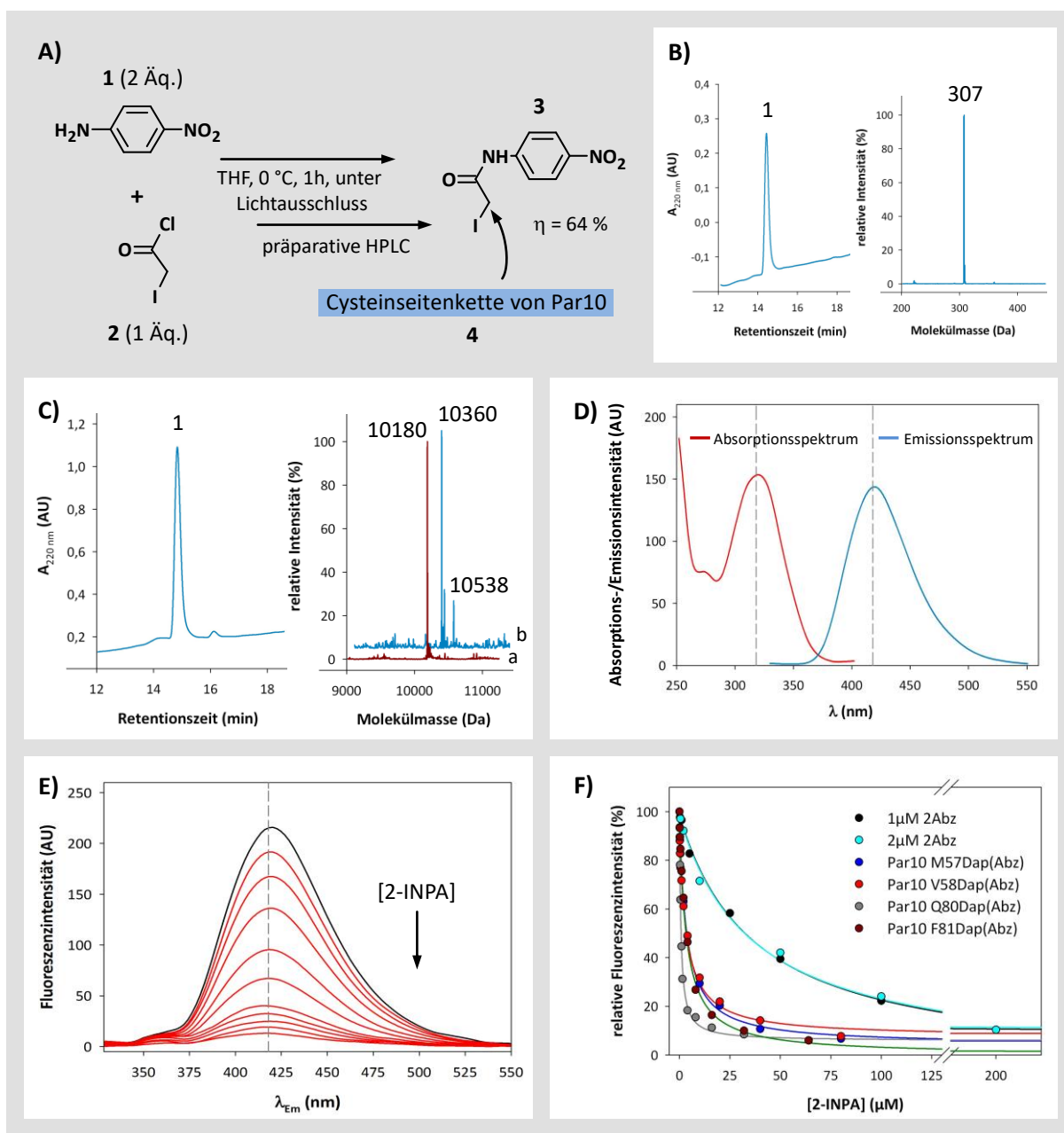


Abb. 4-19. Synthese und Verwendung des Quenchers 2-INPA. **A)** Syntheschema zur Darstellung des Quenchers 2-Iod-*N*-(4-nitrophenyl)acetamid (2-INPA) (3) aus 4-Nitroanilin (1) und Iodacetylchlorid (2). Dunkelgrau hinterlegt ist die reaktive Cysteinseitenkette im Par10 (4), welche mit dem sulfydrylreaktiven Quencher unter Ausbildung einer Thioetherbindung reagiert. **B)** HPLC-Chromatogramm des gereinigten Syntheseprodukts 2-INPA (1) und ESI-Massenspektrum von 2-INPA mit der gefundenen Molekülmasse 307 $[M+H]^+$, berechnet 306,1 Da. **C)** HPLC-Chromatogramm von Par10 Q80Dap(Abz) (1) nach der Modifizierung mit dreifachem Überschuss an 2-INPA und Molekülmasse vor ((a), gefunden: 10180 $[M+H]^+$, berechnet: 10177,9 Da) und nach Modifizierung mit 3 Äq. 2-INPA ((b) einfach modifiziert, gefunden: 10360 $[M+H]^+$, berechnet: 10357,1 Da und zweifach modifiziert, gefunden: 10538 $[M+H]^+$, berechnet: 10536,3 Da). Reaktionsbedingungen: siehe Abschnitt 3.5.3 **D)** Absorptions- und Emissionsspektrum von Par10 Q80Dap(Abz). Bedingungen: 25 °C, $\lambda_{An} = 320$ nm (3 nm Spaltbreite), $[Par] = 20$ μ M (Absorptionsspektrum) bzw. 3 μ M (Emissionsspektrum), je fünf Einzelspektren akkumuliert. Geräte: Scinco UV/VIS S-3100 (Jasco) (250-400 nm) bzw. Perkin Elmer LS 50B (330-550 nm). **E)** Fluoreszenzemissionsspektren von Par10 Q80Dap(Abz) (3 μ M) in Ab- (schwarz) und Anwesenheit (rot) verschiedener 2-Iod-*N*-(4-nitrophenyl)acetamid-Konzentrationen ($[2-INPA] = 0-80$ μ M) nach Fluoreszenzanregung bei 320 nm. Bedingungen: siehe Abschnitt 3.5.3 **F)** Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität der fluorophoren Parvalbuminvarianten bei 420 nm nach Anregung bei 320 nm mit zunehmender 2-INPA-Konzentration; gemessen in 10 mM KP_i (pH 7,25), 100 mM KCl bei 25 °C, Parvalbuminkonzentration je 3 μ M. Punkte repräsentieren Einfachbestimmungen, Kurven entsprechen Trendlinien. HPLC-Bedingungen: C_8 -RP-Säule, linearer Gradient, 20-80 % ACN in H_2O (+0,1 % TFA) in 25 min.

Massenspektrometrische Analysen gaben einen Hinweis auf eine deutlich höhere Reaktivität der Sulfhydrylgruppe von Cys⁴⁰ im Vergleich zu der des Cys⁶⁸. So wurden bei äquimolaren Konzentrationen von 2-INPA und wtPar10 beinahe ausschließlich einfach modifizierte Par10-Spezies detektiert und selbst ein dreifacher Überschuss der Quencherkonzentration führte zu keiner vollständigen Modifizierung der beiden in Par10 enthaltenen Cysteinseitenketten (Abb. 4-19 C). Par10 C68A, welches nur Cys⁴⁰ enthielt, ließ sich entsprechend den eingesetzten 2-INPA-Konzentrationen quantitativ modifizieren. Cys⁶⁸ in Par10 C40A hingegen war nur mit einem fünffachen Überschuss vollständig kovalent zu modifizieren.

Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität durch die schrittweise Zugabe von 2-INPA konnte, wie für Par10 Q80Dap(Abz) in Abb. 4-19 E und F gezeigt, für alle fluorophoren Par10-Varianten detektiert werden. Die schnellste Abnahme der 2-Aminobenzoylfluoreszenz war bei Par10 Q80Dap(Abz) zu beobachten. Die Fluoreszenzlöschung der Varianten F81Dap(Abz), M57Dap(Abz) und V58Dap(Abz) durch 2-INPA war weniger effektiv (F). Die aus den Sättigungskurven (Abb. 4-19 F) abgeleiteten und in Tab. 4-4 aufgelisteten K_{D_app} -Werte gaben einen Hinweis auf die nukleophilen Eigenschaften der Cysteinseitenketten in den einzelnen fluoreszenzmarkierten Par10-Varianten (Abschnitt 5.2.4).

Eine STERN-VOLMER-Auftragungen ($(F_0/F) - 1$ versus $[Q]$) ergab eine Kombination aus dynamischem und statischem Quenchen. Im Gegensatz dazu zeigte die Titration von 2-INPA zu 2-Abz-OH, gemessen bei 10 °C und 25 °C, eine temperaturabhängige, diffusionskontrollierte dynamische Fluoreszenzlöschung (nicht gezeigt).

4.8.2 Fluoreszenzlöschung der Par10-Varianten durch nicht-kovalente Bindung von Suc-AAPF-pNA

Die Bindung und Umsetzung des Substrats Suc-AAPF-pNA wird unter anderem für die Bestimmung der Spezifitätskonstanten $k_{kat} \cdot K_M^{-1}$ von Parvulinen und anderen PPIasen genutzt [26]. Durch die schrittweise Titration von Suc-AAPF-pNA zu den Par10-Varianten konnte eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensitäten der vorgestellten Par10-Varianten beobachtet werden. Die in Abb. 4-20 dargestellten Ligandenbindungskurven zeigten alle ein Bindungssättigungsverhalten, welches sich nach einem 1:1 Bindungsmodell anpassen ließ und die Bestimmung von apparenten Dissoziationskonstanten (K_{D_app}) ermöglichte, welche in Tab. 4-4 zusammengefasst sind. Die Bindungssättigungskurve von Suc-AAPFpNA und Par10 M57Dap(Abz) zeigte den stärksten Quencheffekt und hob sich damit von den übrigen Par10-Varianten ab. Dementsprechend war die Dissoziationskonstante dieser Parvulinvariante niedriger als die der drei übrigen Varianten, lag aber, wie für alle Varianten im zweistelligen μM -Bereich.

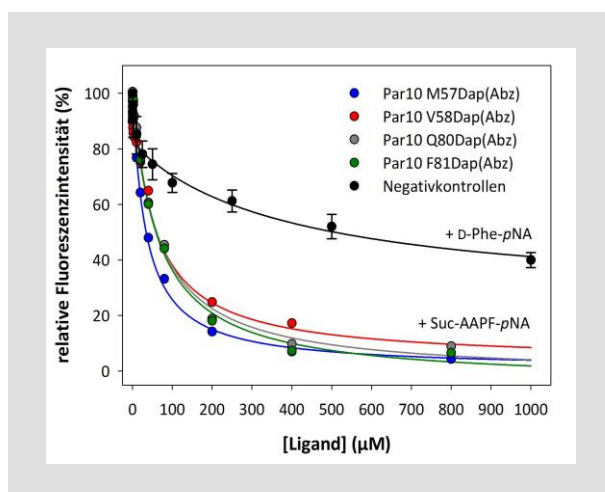


Abb. 4-20. Par10-Suc-AAPF-pNA-Bindungskurven. Abnahme der relativen Fluoreszenzintensitäten der fluorophoren Parvulinvarianten mit zunehmender Suc-AAPF-pNA- bzw. D-Phe-pNA-Konzentration. Die Sättigungskurven der vier Par10-Varianten mit D-Phe-pNA wurden gemittelt und dienten als Negativkontrollen für eine unspezifische Fluoreszenzlöschung. **Bedingungen:** Gemessen in 10 mM KP_i (pH 7,25), 100 mM KCl bei 25 °C, [Par] = 3 μ M, λ_{An} = 320 nm, λ_{Em} = 420 nm. Farbige Punkte repräsentieren experimentelle Einfachbestimmungen, Kurven entsprechen Trendlinien, aus denen K_{D_app} -Werte abgeleitet wurden.

D-konfiguriertes D-Phe-pNA, welches keine Prolylbindung enthält, wurde als ein für die Par10-Ligand-Bindung ungeeignetes 2-Abz-OH-Fluoreszenz-löschendes Molekül getestet. Die Titrationskurven von D-Phe-pNA zeigten für alle Par10-Varianten einen wesentlich flacheren Kurvenverlauf und damit einen deutlich geringeren Quencheffekt. Für die Par10/D-Phe-pNA-Interaktionen ließen sich keine K_{D_app} -Werte bestimmen, da keine ausreichende Fluoreszenzlöschung (relative Fluoreszenzintensität <10 %) gemessen werden konnte.

Tab. 4-4. Apparente Fluoreszenzlöschungskonstanten für 2-INPA, Suc-AAPF-pNA und D-Phe-pNA. Angegebene Standardfehler $\sigma_{\bar{x}}$ für die K_{D_app} -Werte wurden aus den Regressionsgeraden der relativen Fluoreszenzintensität vs. [Ligand]-Auftragungen erhalten. Für D-Phe-pNA ließ sich kein K_{D_app} -Wert bestimmen, da keine sättigende Fluoreszenzlöschung erreicht wurde.

Par10-Variante bzw. 2-Aminobenzoesäure	$K_{D_app} \pm \sigma_{\bar{x}}$		
	2-INPA	Suc-AAPF-pNA	D-Phe-pNA ²
2-Abz-OH (1 μ M) ¹	33,26 \pm 4,32 μ M	n. b.	n. b.
2-Abz-OH (2 μ M) ¹	35,21 \pm 2,88 μ M	n. b.	n. b.
Par10 M57Dap(Abz)	3,05 \pm 0,26 μ M	33,73 \pm 4,64 μ M	-
Par10 V58Dap(Abz)	2,33 \pm 0,42 μ M	56,29 \pm 12,68 μ M	-
Par10 Q80Dap(Abz)	0,73 \pm 0,05 μ M	63,25 \pm 4,32 μ M	-
Par10 F81Dap(Abz)	3,17 \pm 0,20 μ M	64,00 \pm 3,87 μ M	-

¹ Negativkontrolle (unspezifische 2-Abz-OH/-pNA-Fluoreszenzlöschung). ² Negativkontrolle (aufgrund der D-Konfiguration und fehlender Prolylbindung, nur unspezifische Bindung an die Par10-Varianten möglich). n. b. = nicht bestimmt.

4.8.3 Kompensationsbindungsstudien an Par10-Varianten

Da die Zugabe der AhpC-Peptide AhpC¹⁻¹⁶ und AhpC¹¹⁵⁻¹³² zu den Par10-Varianten keine ausreichende Veränderung der Fluoreszenzintensitäten bewirkte, wurden Kompensationsbindungsstudien mit Suc-AAPF-pNA und den AhpC-Peptiden durchgeführt. Durch schrittweise Titration von AhpC¹⁻¹⁶ beziehungsweise AhpC¹¹⁵⁻¹³² zu den Par10/Suc-AAPF-pNA-Komplexen konnte die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität infolge der Verdrängung von Suc-AAPF-pNA aus dem Par10-Bindungsbereich beobachtet werden.

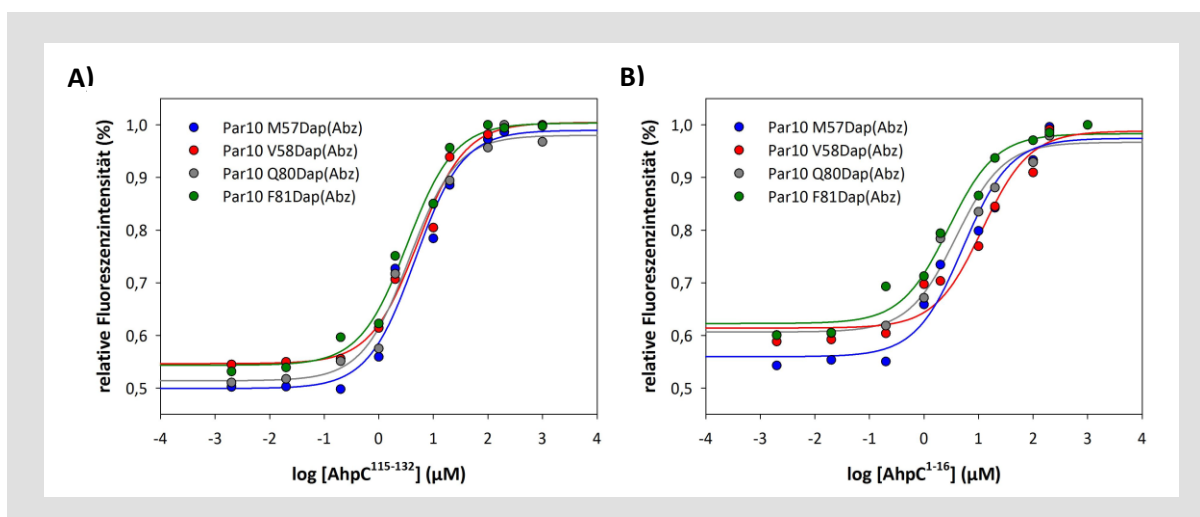


Abb. 4-21. Kompetitive Verdrängungskurven. Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität der fluorophoren Parvulinvarianten mit zunehmender Konkurrentkonzentration. Zu Beginn einer jeden Fluoreszenztitration war die 2-Abz-Fluoreszenz der Par10-Varianten durch Suc-AAPF-*p*NA auf 50 % gequenchet (ermittelt aus den entsprechenden Sättigungskurven (siehe Abb. 4-20). **A)** Verdrängung von Suc-AAPF-*p*NA aus den Par10-Substrat-Bindungsstellen durch AhpC¹¹⁵⁻¹³². **B)** Verdrängung von Suc-AAPF-*p*NA aus den Par10-Substrat-Bindungsstellen durch AhpC¹⁻¹⁶. **Bedingungen:** Gemessen in 10 mM KPi (pH 7,25), 100 mM KCl bei 25 °C, [Par] = 3 μM, λ_{An} = 320 nm, λ_{Em} = 420 nm. Punkte repräsentieren experimentelle Einfachbestimmungen, Kurven entsprechen Trendlinien, aus denen K_{C50}-Werte abgeleitet wurden.

Bei allen Messungen ergaben sich einphasische Verdrängungskurven, welche K_{C50}-Werte als ein Maß für die Affinität von AhpC¹⁻¹⁶ und AhpC¹¹⁵⁻¹³² zu den einzelnen Par10-Varianten lieferten. Die anschließend nach Gleichung (3-9) im Abschnitt 3.6.8 berechneten K_{K_app}-Werte für die Par10-AhpC/Peptid-Komplexe entsprachen dabei den K_{D_app} für die Par10-Suc-AAPF-*p*NA-Komplexe in der Tab. 4-4. Mit Ausnahme des Par10 V58Dap(Abz)/AhpC¹⁻¹⁶-Komplexes zeigten alle übrigen Par10/ Liganden-Paare sehr ähnliche Werte für K_{C50} und K_{K_app} im einstelligen μM-Bereich.

Tab. 4-5. Beobachtete Fluoreszenzlöschungskonstanten für AhpC¹¹⁵⁻¹³² und AhpC¹⁻¹⁶. Angegebene Standardfehler $\sigma_{\bar{x}}$ für die K_{C50}-Werte wurden aus den Regressionsgeraden der relativen Fluoreszenzintensität vs. [Ligand]-Auftragungen erhalten. K_{K_app} berechnete sich nach Gleichung (3-9) (Abschnitt 3.6.8).

Par10-Variante	AhpC ¹¹⁵⁻¹³²		AhpC ¹⁻¹⁶	
	K _{C50} ± $\sigma_{\bar{x}}$	K _{K_app}	K _{C50} ± $\sigma_{\bar{x}}$	K _{K_app}
Par10 M57Dap(Abz)	4,65 ± 0,91 μM	3,10 ± 0,74 μM	5,19 ± 1,15 μM	3,46 ± 0,90 μM
Par10 V58Dap(Abz)	5,15 ± 0,62 μM	3,43 ± 0,87 μM	11,68 ± 1,62 μM	7,79 ± 2,05 μM
Par10 Q80Dap(Abz)	3,65 ± 0,57 μM	2,43 ± 0,41 μM	3,87 ± 0,95 μM	2,58 ± 0,66 μM
Par10 F81Dap(Abz)	3,32 ± 0,59 μM	2,21 ± 0,41 μM	2,80 ± 0,77 μM	1,86 ± 0,52 μM

Der Einfluss von AhpC¹⁻¹⁶ und AhpC¹¹⁵⁻¹³² auf die PPIase-Aktivität von wtPar10 und der katalytisch aktiven Par10-Variante (Par10 Q80Dap(Abz)) ergab für wtPar10 eine signifikante Abnahme der Aktivität im Fall des AhpC¹¹⁵⁻¹³²-Peptids und eine nahezu unveränderte Aktivität in Anwesenheit von AhpC¹⁻¹⁶ (Abb. 4-22). Die im Vergleich zum wtPar10 geringere PPIase-Aktivität der Par10-Variante wurde durch beide AhpC-Peptide um annähernd den gleichen Betrag verringert. Ein deutlicheren

Inhibierungseffekt durch AhpC¹¹⁵⁻¹³² verglichen mit AhpC¹⁻¹⁶, wie er für wtPar10 beobachtet wurde, wurde für Par10 Q80Dap(Abz) nicht gefunden (Abschnitt 5.2.4).

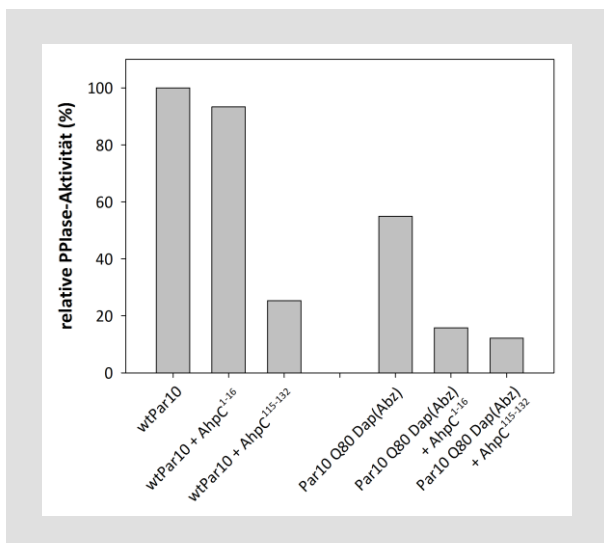


Abb. 4-22. Inhibierungsstudien. Inhibierung der PPIase-Aktivität von wtPar10 und Par10 Q80Dap(Abz) durch die Peptide AhpC¹⁻¹⁶ (400 μ M) bzw. AhpC¹¹⁵⁻¹³² (400 μ M). Die beobachtete wtPar10-Aktivität (k_{obs}) wurde 100 % gesetzt und alle übrigen bestimmten Aktivitäten darauf bezogen. Bedingungen: Gemessen in 35 mM HEPES (pH 7,8) bei 10 °C, [Par] = 2 nM, [AhpC-Peptid] = 400 μ M, [Abz-AAPF- ρ NA] = 25 μ M, λ_{An} = 320 nm, λ_{Em} = 420 nm (siehe Abschnitt 3.7.1).

5 Diskussion

5.1 Gewinnung der rekombinant erzeugten Proteinvarianten und Peptid- α -thioester

5.1.1 Par10- und AhpC-Varianten

Für die Isolierung der untersuchten Par10- und AhpC-Varianten kamen etablierte Reinigungsverfahren zur Anwendung (Abschnitt 3.4.1.). Die Parvulinvarianten ließen sich aufgrund des im Vergleich zu anderen *E. coli*-Proteinen hohen isoelektrischen Punktes mittels Ionenaustauschchromatografie sehr gut reinigen. Alle AhpC-Proteine konnten als 6xHis-tag-Fusionsproteine an einer Affinitätssäule mit immobilisierten Ni²⁺-Kationen schnell und hochspezifisch gewonnen werden. Die zwischen einzelnen Reinigungsschritten durchgeführten SDS-PAGE-Analysen zeigten keinen Abbau der Proteine und RP-HPLC- und ESI-MS-Untersuchungen der endgereinigten Proteine wiesen Einzelpeaks und die jeweils korrekten Molekulargewichte auf. Unter Verwendung eines M9-Minimalmediums anstelle des LB-Mediums (Abschnitt 4.1) war die Herstellung ¹³C- und/oder ¹⁵N-markierter Par10- und AhpC-Proteinspezies für die Aufnahme von NMR-Spektren ebenfalls erfolgreich.

Die Anreicherung von enzymatisch aktiven Par10- und AhpC-Spezies dürfte für eine Zelle grundsätzlich Vorteile bieten. Par10 begünstigt die Faltung naszierender Proteine in ihre native Raumstruktur und AhpC schützt die Zellen vor Überoxidationsschäden durch freie Radikale, Peroxide und Peroxinitrite. Dies trifft auch zu, wenn die für die Regeneration des AhpR-Komplexes benötigte Untereinheit AhpF nicht überexprimiert wird. In diesem Fall können weitere zelluläre Disulfidreduktasen (z. B. Thioredoxin) die AhpC reduzieren [112]. Darüber hinaus erfüllt die AhpC wichtige Aufgaben in stress- und in nicht-stressinduzierten Signalwegen innerhalb von Zellen [220].

Die eingeführten Mutationen und Sequenzverkürzungen zeigten mit Ausnahme der Variante Par10 C40A keinen Einfluss auf die erhaltenen Proteinmengen in mg·l⁻¹ Flüssigkultur. Die im Vergleich zu wtPar10 und Par10 C68A vierfach niedrigere Proteinmenge je Liter Bakterienkultur der C40A-Mutante war bereits zuvor aus der Literatur bekannt [108] und konnte durch mehrmalige Anzucht von *par10 C40A*-Gen exprimierenden *E. coli*-Zellen kompensiert werden. Es ließen sich so alle benötigten Peptide und Proteine in der erforderlichen Menge, in hohen Konzentrationen (1-2 mM) und hoher Reinheit erhalten.

Vermutlich führt die fehlende autokatalysierte Faltung der PPlase-inaktiven Par10 C40A-Variante (Abschnitt 4.6.1) zu einer größeren Anzahl fehlerhaft gefalteter Moleküle, welche durch Proteasen abgebaut werden oder sich in *inclusion bodies* anreichern. Die Anreicherung der Par10-

Einzelmutanten C40D und S42A in Einschlusskörpern wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben [108] und auf drastische Parvulinstrukturänderungen dieser Mutationsvarianten zurückgeführt. Im Vergleich zu dem Par10-Homologen Ess1 in *S. cerevisiae* ist Par10 für das Überleben von *E. coli* nicht essentiell. Vermutlich übernehmen andere in *E. coli* vorhandene PPIasen die Par10-Funktionen. Die fehlende Autokatalyse von Par10 C40A können diese aber anscheinend nicht kompensieren. Es ließen sich mit der gewählten Reinigungsstrategie dennoch lösliche Par10 C40A-Moleküle isolieren, deren Proteinstruktur in CD- und NMR-Experimenten näher untersucht wurden und auf eine zur wtPar10-Struktur ähnlichen Faltung hindeuteten (Abschnitt 5.3.1).

Der für eine einfache Reinigung vorteilhafte Affinitätstag eines Fusionsproteins kann bei der Strukturklärung von Proteinen oder bei der Untersuchung von Protein-Ligand-/Protein-Protein-Interaktionen oft hinderlich sein [221]. Deshalb ist der Einfluss des verwendeten 6xHis-tags auf die Sekundärstruktur der AhpC untersucht worden (Abschnitt 4.4). Die Fern-UV CD-Spektren zeigten einen erkennbaren Unterschied in der sekundären Struktur von 6xHis-tag-tragenden und 6xHis-tag-freien AhpC-Varianten. Aus diesem Grund sind NMR-Untersuchungen sowohl an 6xHis-tag-AhpC als auch an AhpC_kurz durchgeführt worden. Ein Einfluss des 6xHis-tags auf die AhpC-Aktivität war nicht erkennbar (Daten nicht gezeigt). Ein direkter Vergleich der Enzymaktivitäten der eigenen AhpC-Varianten mit weiteren Literaturdaten war nicht möglich, da diese Aktivitätsbestimmungen unter Einbeziehung der zweiten Untereinheit des Alkylhydroperoxid-Reduktase-Komplexes, der AhpF und einer NADH+H⁺-abhängigen Peroxidreduktion, erfolgten. Zusätzlich hängt die AhpC-Aktivität vom verwendeten Elektronendonator ab (DTT bei eigenen Messungen) [222], dessen tatsächliches Redoxpotential im selbst durchgeführten Enzymassay mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht bestimmt werden konnte.

5.1.2 Par10 H-1-35-MESNa und Par10 H-1-67-MESNa

Die Segmente, in die keine Fluoreszenzmarkierung eingebracht werden sollten (Par10 H-1-35-MESNa und Par10 H-1-67-MESNa), konnten mit dem unter 3.4.2 beschriebenen INTEIN-System rekombinant hergestellt werden. Die Spalteffizienz der Par10-(1-35)-Mth-RIR 1-CBD- und Par10-(1-67)-Mth-RIR 1-CBD-Fusionsproteine hing bei der verwendeten Inteinmethode von den C-terminalen Aminosäureresten der Par10-Peptidsequenz ab. Beide Par10-Aminosäuresequenzen verfügten weder über einen für die Inteinspaltung günstigen Glycin- noch Alaninrest, wiesen aber auch keine „problematischen“ Aminosäuren (Pro, Glu, Asp, His) am C-Terminus auf [174, 175]. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Thiol-induzierte Inteinspaltung ausschließlich nach der Immobilisierung der Fusionsproteine an der Affinitätsmatrix erfolgte.

Erste Reinigungsversuche der Par10 H-1-35- und Par10 H-1-67-Segmente als Thioester aus *E. coli*-Extrakten führten aber zunächst zu sehr geringen Ausbeuten aufgrund einer vorzeitigen Inteinspaltung der Fusionsproteine und damit zur Freisetzung der Parvulinsegmente als freie Carbonsäuren. Belegt werden konnte dies mittels SDS-PAGE-Analytik und massenspektrometrischer Methoden (Daten nicht gezeigt). Um die vorzeitige Inteinspaltung in *E. coli* zu verringern, wurde bei der Zellanzucht eine Absenkung der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 16 °C vorgenommen. Die Spaltung der während der Reinigung *in-situ* gebildeten Peptid- α -thioester wurde minimiert, indem alle dem Zellaufschluss nachfolgenden Peptidreinigungsschritte bei 10 °C durchgeführt wurden. Allerdings konnte bei dieser niedrigen Temperatur eine teilweise Ablösung noch intakter Fusionsproteine von der Chitinmatrix nicht vermieden werden. Durch Ansäuern der die Peptid- α -thioester enthaltenden Fraktionen nach der Elution von der Chitinsäule mit Essigsäure (pH-Wertsenkung von 8,5 auf 6,0) konnte der Anteil von Par10 H-1-35-OH und Par10 H-1-67-OH zugunsten der entsprechenden MESNa-Thioester deutlich reduziert werden.

Generell hängen die Endausbeuten gereinigter Peptide unter Verwendung eines Intein-Systems entscheidend von der Größe des Zielpeptids ab [175]. Das benutzte Reinigungssystem wird laut Angabe des Anbieters NEB üblicherweise für 11 bis 124 kDa große Proteine verwendet. 80% der von NEB getesteten prokaryotischen, in *E. coli*-Zellen synthetisierten Proteine konnten dabei mit Ausbeuten zwischen 0,5 und 15 mg·l⁻¹ Flüssigkultur gewonnen werden. Für kleine cyclische Peptide (9-14 AS) werden Ausbeuten zwischen 0,05 und 1 mg·l⁻¹ beschrieben [223], jedoch war hier die Reinigung durch die gleichzeitige Verwendung einer N- und einer C-terminalen Chitinbindedomäne erleichtert. Für ein weiteres lineares 26 AS-langes Oligopeptid wurde eine Ausbeute von 1,4 mg·l⁻¹ Kultur angegeben [224]. Allerdings handelte es sich hierbei um ein Peptid, welches mit einer freien C-terminalen Carboxygruppe effizienter, weil nebenproduktfrei, isoliert werden konnte. Damit lag die eigene Ausbeute von 0,5-0,75 mg reinem Par10 H-1-35-MESNa und 1,5-2 mg Par10 H-1-67-MESNa je Liter Flüssigkultur im akzeptablen Bereich, bedenkt man, dass neben den Peptid- α -thioestern auch stets die entsprechenden freien Carbonsäuren gebildet werden.

Das Natriumsalz des 2-Mercaptoethansulfonats (MESNa) wurde gewählt, da es sich, verglichen mit Thiophenol (PhSH) oder Benzylmercaptan (BnSH), sehr gut in wässrigen Puffersystemen löst, sich in hohen Konzentrationen für die Inteinspaltung einsetzen lässt und zu vergleichsweise stabilen Thioestern führt. Die reaktiveren aber instabileren Arylthioester Par10 H-1-35-SPh und Par10 H-1-67-SPh, welche für die Natürlich Chemischen Ligationen benötigt wurden, wurden erst *in situ* gebildet (Abschnitt 5.2.3).

Es bleibt festzustellen, dass das eingesetzte IMPACT-TWIN-System geeignet ist, beide Par10-Segmente als Peptid- α -thioester herzustellen und diese durch einen ersten Reinigungsschritt zu isolieren.

5.2 Fluoreszenzmarkierte Par10-Varianten als zukünftige Untersuchungsobjekte

5.2.1 Festlegung der ausgetauschten Aminosäuren und der Positionen der Ligationsstellen

Durch Dap(Abz) ausgetauschte Par10-Aminosäuren

Par10 besitzt keinen für Fluoreszenzstudien geeigneten internen Fluorophor in Form einer Tryptophanseitenkette oder eines fluorophoren Kofaktors wie NADH oder FAD. Die in Par10 vorhandenen Tyrosin- und Phenylalaninreste sind als natürliche Fluorophore ungeeignet, da in nativen Proteinen die Tyrosinfluoreszenz stark gequenchet ist und die Phenylalaninfluoreszenz eine zu geringe Quantenausbeute aufweist [225]. Mit der Einführung einer 2-Aminobenzoessäurefunktionalität als artifizielle Fluoreszenzsonde konnte dieser Nachteil in einen Vorteil für die Untersuchung von Par10 umgewandelt werden. Da starke interne Quenchereignisse durch eigene Fluorophore ausgeschlossen werden können, kann eine künstliche Sonde in beliebigen Positionen innerhalb der Par10-Sequenz eingeführt und beispielsweise für FRET-Experimente genutzt werden.

Die Festphasenpeptidsynthese ermöglichte die selektive, regiospezifische Einführung der Fluoreszenzmarkierung. Kommerziell angebotene Modifizierungsreagenzien zum Einführen von biochemischen oder biophysikalischen Sonden, wie gemischte Disulfide, Maleimid- und Iodacetamid-derivate für die Cysteinseitenkettenmodifizierung oder *N*-Hydroxysuccinimidester und Iso(thio)-cyanate für die Lysinseitenkettenmodifizierung, sind meist nur chemo- und nicht regioselektiv.

2-Aminobenzoessäure (2-Abz) ist eine seit langem in der Grundlagenforschung eingesetzte Fluoreszenzsonde, welche kostengünstig bezogen werden kann und nur eine geringe Toxizität aufweist [219, 226, 227]. Aufgrund ihrer geringen Molekülgröße (vergleicht man sie z. B. mit Alexa Fluor-Farbstoffen) und ihrer sehr guten Quantenausbeute ist 2-Abz besonders geeignet, Proteine gezielt zu markieren, ohne die native Proteinstruktur massiv zu stören [228]. Verglichen mit komplexeren Fluorophoren (z. B. TAMRA, Alexa Fluor) stellen die niedrigere Anregungs- und Emissionswellenlänge von 2-Abz meist akzeptable Einschränkungen dar. Die in organischen Lösungsmitteln gute Löslichkeit von 2-Abz und Dap(Abz) war bei der Synthese fluoreszenzmarkierter Par10-Segmente und schließlich der vollständigen Par10-Moleküle ebenfalls von Vorteil. Durch die Einführung von Dap(Dansyl) anstelle von Dap(Abz) konnte die prinzipielle Eignung der Fluoreszenzmarkierung anhand der in Vorarbeiten zu dieser Arbeit stattgefundenen Par10 Q80Dap(Dansyl)- und Par10 F81Dap(Dansyl)-Synthesen gezeigt werden [229]. Somit ließen sich auch fotostabilere Fluorophore verwenden, welche eine noch höhere Quantenausbeute aufweisen und sich bei zusätzlichen Wellenlängen anregen lassen.

Die Auswahl der durch Dap(Abz) ausgetauschten Aminosäuren innerhalb der Par10-Sequenz wurde nach vergleichenden Betrachtungen der Kristallstruktur des *h*Pin1 im Komplex mit dem ge-

bundenen Dipeptid Ala-Pro [43] und der Lösungsstruktur des Par10 aus *E. coli* [97] getroffen, da die Primärsequenzen- und die PPlase-Domänen von *hPin1* und Par10 eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie zeigen. Die ersetzten Aminosäuren Met⁵⁷, Val⁵⁸, Gln⁸⁰ und Phe⁸¹ in Par10 befinden sich randständig an einer hydrophoben Furche, welche als putative Substratbindungsstelle gilt [97]. Von den ausgetauschten Aminosäuren (alle unterschiedlichen Typs: schwefelhaltig (Met), klein, hydrophob (Val), polar (Gln), aromatisch, hydrophob (Phe)) wird nur Phe⁸¹ direkt mit der Substratbindung in Verbindung gebracht, indem der Phenylring und der Prolylring eines Substrates möglicherweise über *stacking*-Effekte (hydrophobe und CH- π -Interaktionen) miteinander wechselwirken [11, 230, 231]. Es wurde darauf geachtet, dass sich die ausgetauschten Aminosäuren weder innerhalb von α -helikalen noch β -Strangstrukturen befinden, sondern Bestandteile flexibler Schleifenregionen sind, die dem Lösungsmittel zugänglich sind. Damit sollte eine mögliche Destabilisierung wichtiger Par10-Sekundärstrukturelemente durch die Einführung der artifiziellen 2-Aminobenzoylgruppe verhindert und die Interaktion mit Quencher-molekülen in weiterführenden Studien ermöglicht werden.

Wahl der Ligationsstellen für die Segmentkondensationen

Neben den auszutauschenden Aminosäuren wurden Ligationsstellen festgelegt, welche die Synthese der fluoreszenzmarkierten Par10-Varianten durch den selektiven Einbau von Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH während der Festphasenpeptidsynthese zulassen sollten. Die Darstellung eines vollständigen, aus 92 AS bestehenden, fluoreszenzmarkierten Par10-Derivates durch eine einzige durchgängige Festphasenpeptidsynthese wurde in der eigenen Arbeitsgruppe versucht, war aber mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht realisierbar. Die Knüpfung längerer Peptide geht stets mit der Ausbildung von Fehl- und Rumpfsequenzen einher. Mit der wachsenden Polypeptidkette verlaufen Bindungsknüpfungen und Bindungsspaltungen zunehmend ineffizienter [177, 232]. Dies führt zu inakzeptablen Endausbeuten unter großem Materialeinsatz. Auch wenn es in der Vergangenheit gelang, Proteine mit mehr als 100 AS unter Verwendung der Festphasenpeptidsynthese herzustellen, so variierten die Ausbeute und die Reinheit der Proteine zum Teil erheblich [233].

Die Synthese einzelner kürzerer Peptide und deren anschließende Verknüpfung zum Gesamtprotein erschien zielführender, wie die aus der Literatur bekannten Beispiele der Darstellung einer *humanen* HIV-1 Protease (99 AS, [234]) und eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequorea victoria* (238 AS, [235]) mittels Segmentkondensationsreaktionen erwarten ließen. Das in Par10 vorkommende Cys⁶⁸ bot die Möglichkeit, 32 (H-36-67-MESNa-Segmente) und 25 AS-lange Oligopeptide (H-68-92-OH-Segmente) an der festen Phase zu synthetisieren und durch Natürlich Chemische Ligationen miteinander zu längeren Par10-Segmenten (H-36-92-OH-Segmente) beziehungsweise zu vollständigen Par10-Derivaten zu verbinden (siehe Abb. 4-8). Da NCL-Reaktionen chemo- und regiospezifisch verlaufen, war das im Par10 H-1-67-MESNa vorhandene Cys⁴⁰ unproblematisch, da es keine neue irreversible Bindung bilden konnte [236]. Somit konnten für die

automatisierte Festphasenpeptidsynthese gut handhabbare Peptidlängen unter Verwendung von kostengünstigen Standardaminosäurederivaten und -kupplungsreagenzien für die Fmoc/*t*Butyl-Schutzgruppentaktik verwendet werden.

wtPar10 bietet mit Cys⁴⁰ eine zweite Ligationsstelle für eine NCL (Verknüpfung von Par10 1-39-MESNa mit Par10 40-67-OH). Für eine Übertragung des in dieser Arbeit entwickelten Synthesekonzeptes auf weitere, zukünftige neue Proteine, sollte die Darstellung von Par10 H-1-92-OH M57Dap(Abz) und Par10 H-1-92-OH V58Dap(Abz) mit einer Alternativmethode zur NCL erfolgen. Da für eine allgemeine NCL-Reaktion immer nur Aminokomponenten mit einem *N*-terminalen Cystein in Frage kommen, wäre eine ausschließlich NCL-vermittelte Synthese nicht auf jedes Protein anwendbar; zumal nur 1,37 % aller Aminosäureseitenketten nativer Proteine, welche in der ExPasy-Proteindatenbank hinterlegt sind, Cysteinseitenketten sind (Stand Juni 2015). „Erweiterte“ NCLs erlauben zwar auch die Verwendung von Selenocystein-, Homocystein-, Pseudocystein-, Glycin-, Phenyl-Threoninresten oder β -Mercapto- α -aminosäurederivaten, führen dabei allerdings nur über zusätzliche Syntheseschritte zur Erweiterung der darstellbaren Peptidsequenzen [237-241]. Ein weiteres Ligationsverfahren neben der NCL vergrößert demzufolge die möglichen Anwendungsbereiche der hier gezeigten Semisynthesestrategie zur Erzeugung modifizierter Proteine enorm.

Als zweites Ligationsverfahren bot sich die kinetisch kontrollierte enzymkatalysierte Peptidknüpfung an. Für diese Art der Segmentkondensation kommen prinzipiell verschiedene Serin- oder Cysteinproteasen und somit eine Vielzahl von Ligationsstellen in Frage. Genannt seien die Glu/Asp-spezifische V8-Protease aus *Staphylococcus aureus* [133] oder das Wildtyp-Trypsin aus *Rattus norvegicus* mit einer Spezifität für Arginin- und Lysinseitenketten [82]. Unveränderte Serinproteasen besitzen allerdings eine unerwünschte proteolytische Aktivität gegenüber der Parvulinsequenz.

Mit der vom wtTrypsin aus *Rattus norvegicus* abgeleiteten Zn²⁺-Ionen-abhängigen Trypsiligase [183] und dem Substratmimetikakonzept [147] konnte ein nahezu proteolytisch inaktives Enzym verwendet werden, um das Par10 H-1-35- mit den Par10 36-92-Segmenten zu ligieren (Abschnitt 5.2.3). Trypsiligase besitzt eine Präferenz für Substrate mit der Erkennungssequenz Tyr-Arg-His, ist aber im Unterschied zum wtTrypsin in der Lage, die in Par10 vorhandene Lys³⁵-Lys³⁶-Peptidbindung zu knüpfen, da es in der S'₁-Position⁹ [242] anstelle einer Arginin- auch eine Lysinseitenkette akzeptiert (Lys³⁶ in Par10) und die S'₂-Position durch eine Histidinseitenkette (His³⁷ in Par10) besetzt werden kann. Der Thiobenzylrest (SBn) des Par10 H-1-35-SBn-Segments „imitiert“ die Tyrosinseitenkette, welche üblicherweise primärspezifisch in der S₁-Position von Trypsiligase gebunden wird.

⁹ Nach der durch SCHECHTER und BERGER [241] eingeführten Nomenklatur werden die Bindungsorte auf der Protease mit S_n bis S'_n und die entsprechenden Bindungsorte im Substrat mit P_n bis P'_n *N*- nach *C*-terminal bezeichnet. Die zu spaltende Bindung befindet sich zwischen P₁ und P'₁ (vgl. Abb. A 6-1 im Anhang).

5.2.2 Synthese von Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH und Festphasen-peptidsynthese

In dieser Arbeit wurde die chemische Peptidsynthese gewählt, da diese den Einbau der unnatürlichen Fluoreszenzsonde Dap(Abz) als eine nicht-codierte Aminosäure in jede freiwählbare Position erlaubte. Es sind zwar Alternativen vorhanden, den genetischen Code um unnatürliche Aminosäuren zu erweitern (Abschnitt 1.5), jedoch lassen sich dabei keine Voraussagen bezüglich Stabilität oder Zytotoxizität der künstlichen Proteine treffen. Ein weiterer Vorteil der Chemosynthese war die parallele Synthese mehrerer Peptide, die sich in ihren Primärsequenzen unterschieden.

Die gewählte Festphasenpeptidsynthese bot, im Unterschied zur Synthese in Lösung, den Vorteil der automatisierten Zugabe und Entfernung der Aminosäurederivate, Reagenzien und Lösungsmittel. Eine Unterbrechung der Synthese war zu jedem Zeitpunkt möglich und gestattete die Überprüfung des Synthesefortschritts. Die Fmoc-/tButyl-Schutzgruppentaktik [243] wurde der Boc-/Benzyl-Taktik vorgezogen, da sich erstere durch mildere Reaktionsbedingungen und eine größere Auswahl an geeigneten Aminosäurebausteinen auszeichnet. Das für die chemischen Peptidsynthesen verwendete 2-Chlortrityl-Harz [244, 245] sollte die Racemisierung beim Anknüpfen des ersten Aminosäurerests [246] und die Diketopiperazinbildung verhindern [247]. Die Bildung von Diketopiperazinen kann nach der Fmoc-Abspaltung auf Dipeptidstufe als unerwünschte Nebenreaktion auftreten und zum vorzeitigen Syntheseabbruch führen. Aufgrund des sehr säurelabilen 2-Chlortrityl-Linkers ließen sich vollgeschützte Par10 H-36-67-Segmente vom polymeren Träger abspalten und nach der Aktivierung der Carboxyfunktion des C-terminalen Serinrests zu Peptid- α -thioestern umsetzen, welche in den NCL-Reaktionen verwendet wurden. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Aktivierung und die anschließende Veresterung nur im Falle einer C-terminalen Glycinseitenkette racemisierungsfrei verlaufen.

Alternativmethoden, um zu den entsprechenden Par10 Peptid- α -thioestern zu gelangen, gehen meist mit einem erhöhten Syntheseaufwand einher, versprechen zudem geringere Ausbeuten und wurden in dieser Arbeit daher nicht getestet. Die mögliche alternative Verwendung von mit KENNERS Sulfonamid-*safety-catch* Linkern funktionalisierten polymeren Trägern [248-251], eines *backbone-amide*-Linkers [252] und der Einsatz von HMBA- (4-Hydroxymethylbenzoesäure)- [253] oder PAM (4-Hydroxymethylphenylacetamidomethylpolystyrol)-Harzen [254] seien an dieser Stelle nur erwähnt.

Die für die Generierung fluoreszierender Par10-Varianten notwendige Fluoreszenzsonde Dap(Abz) konnte als Fmoc-/Boc-geschützter Baustein aus zwei kommerziell bezogenen Ausgangsverbindungen in einer Einschrittssynthese dargestellt werden (Abschnitt 4.3.1). Aufgrund der zufriedenstellenden Endausbeute von 90 % und einer 96%igen Reinheit des Endproduktes wurden keine weiteren Optimierungsversuche hinsichtlich Ausbeute und Reinheit unternommen. Geringe Substanzverluste ent-

standen bei der wässrig-sauren Aufarbeitung des Rohprodukts und der zur Endreinigung eingesetzten präparativen Kieselgelsäulenchromatografie, wobei sich das hierfür verwendete Laufmittelsystem (Essigsäureethylester/Methanol/Essigsäure = 9:1:0,1) als sehr geeignet erwies.

Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH ließ sich in den automatisierten Festphasenpeptidsynthesen analog zu den verwendeten Aminosäurederivaten problemlos einsetzen und gleichsam effizient wie die übrigen Aminosäurederivate an die wachsenden Peptidketten knüpfen. Die Kontrollabspaltungen im Verlauf der Synthese und die Endproduktanalysen ließen keine Unterschiede zwischen den Peptiden gleichen Segmenttyps, welche die Fluoreszenzsonde enthielten und denen, die keine Sonde enthielten, erkennen. Die Position des Fluorophors (57, 58, 80, 81) hatte ebenfalls keinen erkennbaren Einfluss auf die Reinheit und Ausbeute der gereinigten Peptide.

Die ersten Festphasenpeptidsynthesen unter Standardbedingungen zeigten allerdings Unterschiede zwischen den Par10 H-36-67-MESNa- (Peptide 3-5) und Par10 H-68-92-OH-Segmenten (Peptide 6-8). Die Synthese der Peptid- α -thioester lieferte Segmente in geringerer Reinheit und Ausbeute, erkennbar an verbreiterten Peakflächen und zusätzlichen Nebenpeaks in den analytischen RP-HPLC-Chromatogrammen der Rohprodukte (nicht gezeigt). Die massenspektrometrischen Analysen zeigten verkürzte und fehlerhafte Primärsequenzen (Rumpfsequenzen). Es wird angenommen, dass der relativ hohe Anteil an trifunktionellen Aminosäuren (15 von 32 AS) zusammen mit sogenannten *schwierigen Sequenzen* den Syntheseverlauf dieser Peptide negativ beeinflussten [141]. Sterisch anspruchsvolle Aminosäurederivate oder die Ausbildung von unerwünschten Sekundärstrukturen (vor allem Faltblattstrukturen) können zu unvollständigen oder fehlerhaften Kupplungen führen, indem sie die Löslichkeit der wachsenden Polypeptidketten verringern. Es wird vermutet, dass intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einzelnen Faltblattstrukturen [255] der Polypeptidketten auf der Harzoberfläche die Diffusion der aktivierten Aminosäurederivate zu den *N*-terminalen Aminogruppen behindern und so zur Verringerung der Kupplungsausbeute führen [256]. Ebenso könnten auch Wechselbeziehungen zwischen den hydrophoben Seitenketten [257] der vollgeschützten Par10 H-36-67-Segmente zu einer insgesamt schlechteren Syntheseeffizienz der mittleren Par10-Segmente geführt haben.

Die bei den eigenen Synthesen schwierig zu verknüpfenden Aminosäurederivate lagen nahe dem C-Terminus der zu synthetisierenden Peptidsequenzen, wie Kontrollabspaltungen zu verschiedenen Zeitpunkten zeigten und eine computergestützte Vorhersage schwieriger Sequenzabschnitte ([256], Abb. 5-1) bestätigte. Im errechneten Aggregationsprofil von Par10 H-36-67-MESNa lag ein vermutlich schwer zu synthetisierender Sequenzabschnitt zwei Aminosäurepositionen näher am C-Terminus als ein ebensolcher Bereich für das um sieben Aminosäuren kürzere Par10 H-68-92-OH-Peptid. Bei den mittleren Par10-Segmenten (Peptide 3-5) verschlechterte sich der Synthesefortschritt bereits nach 13 Kupplungen deutlich (Sequenzabschnitt Gly⁵⁰-Gln⁵⁴, insgesamt 31 Kupplungsschritte), bei den Par10 H-68-92-OH-Segmenten (Peptide 6-8) war dies bis zum Ende der Synthese nicht zu

beobachten (insgesamt 24 Kupplungen). Obwohl der Sequenzabschnitt H-68-92-OH des nativ gefalteten Par10 zwei lange β -Stränge (β -Stränge 3 und 4, Abb. 1-2) aufweist, die über Wasserstoffbrücken zu einer Faltblattstruktur verbunden sind, scheinen diese unter Synthesebedingungen (Verwendung von organischen Lösungsmitteln) keinen negativen Einfluss auf die Synthese zu haben. Beide β -Stränge liegen hintereinander am C-Terminus und somit „früh“ in der zu synthetisierenden Sequenz (AS 74-79 und 82-89). Die N-terminalen Abschnitte der Peptide 6, 7 und 8 (AS 68-73) bilden hingegen im vollständigen Par10 keine Sekundärstrukturen aus und blieben mutmaßlich bis zum Abschluss der Synthese für die Kupplungs- und Abspaltreagenzien gut erreichbar (Abb. 5-1).

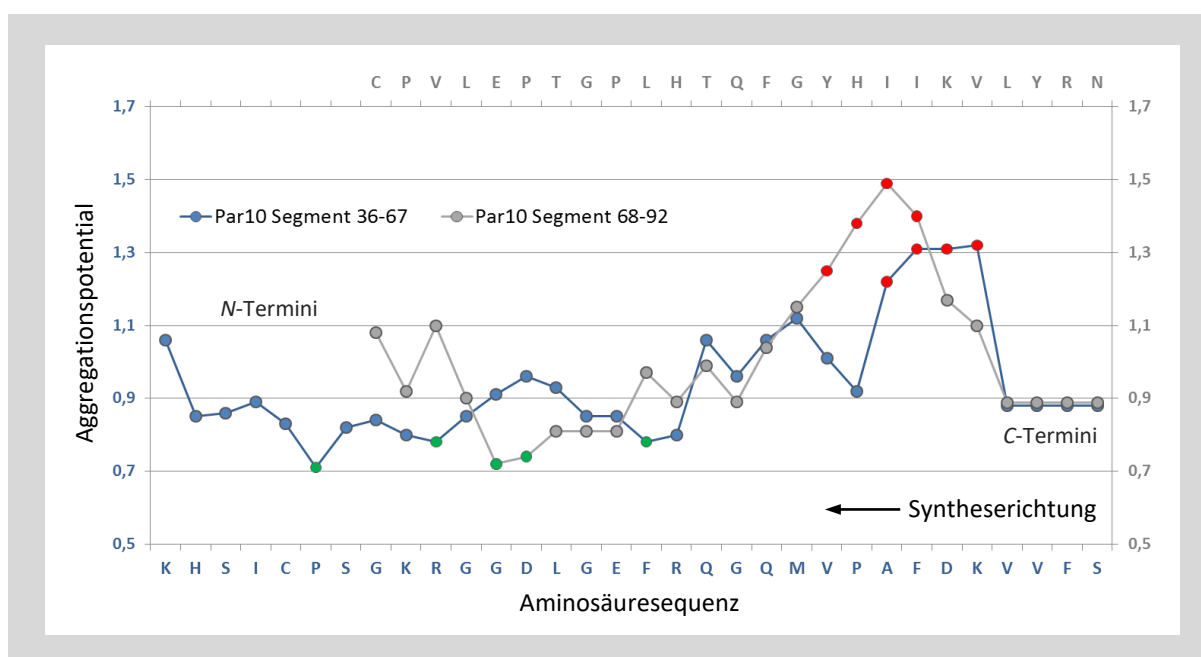


Abb. 5-1. Vorhersage schwierig zu synthetisierender Peptidabschnitte. Das Programm *Peptide Companion* (Version 1.24) [256] hebt vermutlich unvollständig verlaufende Kupplungsschritte einer Festphasenpeptidsynthese rot bzw. vermutlich vollständig verlaufende Kupplungsschritte grün hervor. Die individuellen Eigenschaften der zu verknüpfenden Aminosäuren wie Größe, Solvationsverhalten und relative Reaktivität im Kupplungsschritt sowie die Position der Aminosäure innerhalb der Peptidsequenz bestimmen dabei das berechnete Aggregationsverhalten der entstehenden Peptidketten. Die verlässlichsten Vorhersagen liefert *Peptide Companion* für natürliche, seitenkettenungeschützte Aminosäuren. Blaue Buchstaben = AS-Sequenz von Par10 H-36-67-MESNa, graue Buchstaben = AS-Sequenz von Par10 H-68-92-OH. Die Synthesen erfolgten vom C- zum N-Terminus der Peptide.

Zur Verbesserung der Synthese von schwierigen Sequenzen sind einige Strategien entwickelt worden, die häufig nur mit materiellem und technischem Mehraufwand realisierbar sind und keinen Erfolg garantieren. So lässt sich in manchen Fällen eine Verbesserung der Synthese durch das Ersetzen von Xaa-Ser-, Xaa-Thr- oder Xaa-Cys-Dipeptideinheiten durch entsprechende Pseudoproline als sekundärstrukturstörende Bausteine [258] oder durch die Verwendung von Hmb- (2-Hydroxy-4-methoxybenzyl-) [259] und Oxazolidinbausteinen erreichen [260]. Eine Ultraschallanwendung während der Synthese soll die am Harz gebundenen Peptidketten aufrichten [261] und eine eingesetzte Mikrowellenbestrahlung einen verbesserten Energietransfer auf die Reaktanten gewährleisten [262, 263].

Darüber lassen sich die nach Kupplungsschritten noch vorhandenen freien α -Aminofunktionen durch Acetylierung mittels Essigsäureanhydrid blockieren (*capping*). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf derartige Optimierungsversuche verzichtet. Mit den unter Abschnitt 4.3.2 vorgenommenen Anpassungen der Synthesebedingungen gelang es, neben den Par10 H-68-92-OH- auch die Par10 H-36-67-MESNa-Segmente ausreichend sauber (Reinheit laut RP-HPLC >92 %) und in verbesserter Ausbeute darzustellen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kupplungsreagenzien HCTU und HATU zeichnen sich neben ihren guten Kupplungsausbeuten durch eine geringe Tendenz zur Epimerbildung aus [264-267]. Es wird dennoch angenommen, dass zusätzlich zu den aufgetretenen Fehlsequenzen auch denkbare basenkatalysierte Epimerisierungen während der Peptidsynthese zu inhomogenen Rohprodukten und der erschwerten Endproduktreinigung führten. Die Reinigung der Peptide mittels chiraler HPLC-Säulen und eine eingehendere strukturelle Untersuchungen anhand der NMR-Spektroskopie sind im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt worden. Zudem lassen sich hochaufgelöste Strukturen der 57mere nur anhand von ^{15}N -, besser noch ^{15}N - und ^{13}C -markierten Peptiden, ermitteln. Für letzteres erschien der Material- und Zeitbedarf zu hoch und ungerechtfertigt. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die gereinigten Peptide nicht völlig epimerenrein waren und zu den beobachteten Abweichungen der dreidimensionalen Struktur verglichen mit wtPar10 beitrugen (Abschnitt 5.3.1). Diese Beobachtungen stellen jedoch keinen generellen Nachteil solcher Chemosynthese von Peptiden und Proteinen dar. So kann die teilweise oder vollständige, chemische Synthese anderer Enzyme oder Proteine durchaus zu homogeneren Endprodukten führen.

5.2.3 Eignung der gewählten Ligationsreaktionen

Natürlich Chemische Ligation

Mit den seit den 1990er Jahren entwickelten „chemischen Ligationen“ lassen sich in chemoselektiven Kondensationsreaktionen zwei seitenkettenungeschützte Peptide zu einem einheitlichen, kovalent miteinander verbundenem Produkt zusammenfügen. In dieser Arbeit wurde die NCL angewendet, da sie als eine der wenigen Methoden das Peptidrückgrat unverändert lässt und zu einer nativen Amidbindung führt (Abb. A 5-1 im Anhang) [146]. Dadurch konnte die Längenlimitation der Festphasenpeptidsynthese überwunden werden und zusammen mit den trypsiligasekatalysierten Ligationen ließen sich die Synthesen von vier fluoreszenzmarkierten Par10-Varianten realisieren.

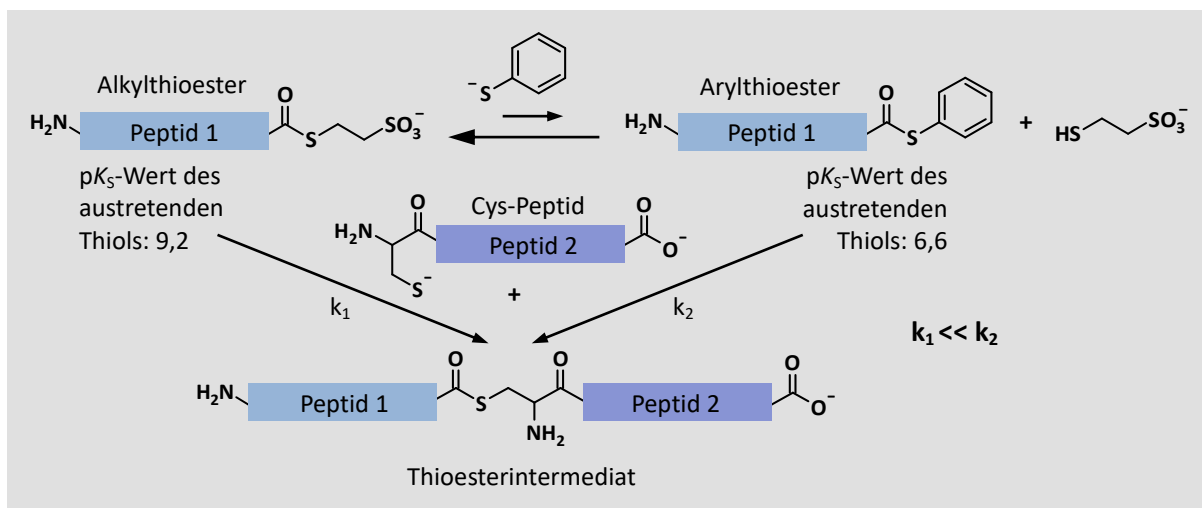


Abb. 5-2. *In situ* Thiol-Thioesteraustausch während einer NCL. Das gebildete Thioesterintermediat reagiert nach dem im Anhang in Abb. A 5-1 gezeigten Mechanismus zum finalen Ligationsprodukt weiter. Abbildung verändert nach [268].

Die anfangs beobachteten langen Reaktionszeiten der durchgeführten NCLs wurden auf das Vorhandensein einer sterischen Hinderung durch die Serinseitenkette am C-Terminus des Peptidthioesters [269] und auf die Verwendung des pH-Wert-stabilen (bis pH 8,2) aber unreaktiven Alkylthioesters zurückgeführt. Da die eingesetzten Par10 H-1-67-MESNa und Par10 H-36-67-MESNa Alkylthioester gut herzustellen waren (Abschnitt 5.1), aber in NCL-Reaktionen nur sehr langsam reagierten (mit Reaktionszeiten bis zu 24 h), wurden sie *in situ* in die entsprechenden reaktiveren α -Carboxyphenylthioester durch die Zugabe von Thiophenol zum Reaktionsansatz umgesetzt. Da die Arylthioester gegenüber den Alkylthioestern die besseren Abgangsgruppen bildeten [270, 271] und eine höhere Elektrophilie am Carbonylkohlenstoff aufwiesen, konnten die Reaktionsgeschwindigkeiten erhöht und die Reaktionszeiten auf zwei Stunden verkürzt werden. Thiophenol eignete sich aufgrund seines niedrigeren pK_S -Wertes (6,6 bei 25 °C) hervorragend, um MESNa ($pK_S = 9,2$ bei 25 °C) in einer nukleophilen Substitutionsreaktion zu ersetzen (Thiol-Thioester-Austausch, Abb. 5-2). Zusammen mit dem ebenfalls zugegebenen TCEP [272] verhinderte Thiophenol die Ausbildung von inter- und intramolekularen Disulfidbindungen zwischen den Par10-Segmenten und schützte gleichzeitig vor einer Entschwefelung der Cysteinseitenketten [268].

Die im wässrigen Milieu durchgeführten NCLs erlaubten milde pH-, Temperatur- und Pufferbedingungen und gewährleisteten damit die Integrität aller eingesetzten Segmente und der gebildeten Reaktionsprodukte. Das in den eigenen Ansätzen verwendete denaturierende Reagenz Guanidiniumhydrochlorid ($c = 4 \text{ M}$) war nicht zwingend erforderlich und diente lediglich zur Steigerung der Produktausbeute, indem höhere Konzentrationen (je 2 mM) der miteinander reagierenden Par10-Segmente eingesetzt und tendenziell störende Sekundärstrukturen der Peptide aufgelöst werden konnten.

Aus allen NCL-Reaktionsansätzen konnten die gewünschten Endprodukte von den noch vorhandenen Ausgangsverbindungen abgetrennt und rein erhalten werden. Die internen Cys⁴⁰-Reste der Par10 H-1-67- und Par10 36-67-Thioestersegmente konnten aufgrund der reduzierenden Pufferbedingungen keine irreversible, kovalente Bindung eingehen und infolgedessen die Ausbeute nicht negativ beeinflussen, weil temporär gebildete Thioester untereinander schnell austauschen. Die eigenen, erzielten Ausbeuten lagen mit 62-73 % über den in der Literatur zu findenden Angaben von 60 % [273]. Unvermeidbare Verluste traten während der Entsalzung und semipräparativen Reinigung der Ansätze auf.

Alternative chemo- und regiospezifische Ligationsmethoden führen oft zu unerwünschten Nebenreaktionen, ersetzen die natürlichen Peptidbindungen und finden unter drastischeren chemischen und physikalischen Bedingungen statt. So lassen sich zwei ungeschützte Peptide in einer Thiosäurealkylierung unter Bildung einer Thioesterbindung bei niedrigen pH-Werten miteinander verknüpfen [155]. Der Austausch einer Peptidbindung durch eine Thioesterbindung führt aber häufig zum Verlust von natürlicherweise vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen und zur Instabilität des Proteins bei pH-Werten größer 7 infolge einer basenkatalysierten Esterhydrolysereaktion. Wesentlich stabiler, aber ebenfalls unnatürlich, sind nach der Ligation verbleibende Thioetherbindungen anstelle der Peptidbindung [274]. Zusätzlich lassen sich die Ausgangsverbindungen, die zum Beispiel für die Synthese von Peptid-Hydrazonen [275] oder Peptid-Oximen [154] benötigt werden, meist schwieriger bereitzustellen als die Ausgangspeptide der NCL. Die für die eigenen NCLs als Carboxykomponente benötigten Peptid- α -thioester und die *N*-terminal einen Cysteinrest-tragenden Amino-komponenten ließen sich hingegen mit vertretbarem Aufwand bereitstellen.

Enzymatische Ligation

Für die Enzymatischen Ligationsreaktionen bestand die Herausforderung darin, Bedingungen zu finden, unter denen alle Reaktionspartner gelöst, das eingesetzte Substratmimetikum Par10 H-1-35-SBn stabil und die Trypsiligase katalytisch aktiv blieben. Deshalb konnten Reduktionsmittel, chaotrope Salze oder organische Lösungsmittel als Additive im Unterschied zu den NCL-Reaktionen nur sehr eingeschränkt eingesetzt werden. Um eine spontane Esterhydrolyse bei pH-Werten größer 8,0 zu verhindern und einen nukleophilen Angriff der *N* ^{α} -Aminofunktion der Par10 H-36-92-Peptide auf den intermediären Acyl-Enzym-Komplex zu ermöglichen, sowie um die katalytische Aktivität der Trypsiligase zu gewährleisten, wurde ein pH-Bereich von 7,4-8,0 gewählt. Ferner musste nach der Ausbildung des Acyl-Enzym-Intermediats das Aminolyse-Hydrolyse-Verhältnis zugunsten der Aminolyse verschoben sein, um eine maximale Produktausbeute (vollständige Par10-Moleküle) zu erzielen (Abb. A 6-1 im Anhang). Als zweiter, reaktionsgeschwindigkeitsbestimmender Schritt nach der Acylierung der Trypsiligase durch das Substratmimetikum steht die Aminolyse in Konkurrenz zur

Hydrolyse. Beide Reaktionen führten zur Deacylierung der Enzyme, aber nur die Aminolyse durch die Par10 H-36-92-Peptide lieferte die gewünschten Ligationsprodukte.

Durch die Verwendung der gewählten organischen Lösungsmittel, chaotropen Salze und Reduktionsmittel in niedrigen Konzentrationen (Abschnitt 3.5.2) gelang es, die zunächst schwerlöslichen fluoreszenzmarkierten 57mere (Par10 H-36-92-OH Q80Dap(Abz) bzw. Par10 H-36-92-OH F81Dap(Abz)) in Lösung zu halten, ohne dabei die Funktion der Trypsiligase zu stören. Zudem zeigte sich eine Abhängigkeit der Löslichkeit der 57mere von der Zn^{2+} -Ionenkonzentration. Bei der üblicherweise verwendeten Zn^{2+} -Ionenkonzentration (100 μ M $ZnCl_2$) führte vermutlich eine Komplexbildung zwischen Histidinseitenketten des Nucleophils und Zn^{2+} -Ionen zu Präzipitaten, welche sich anschließend nur mit EDTA wieder auflösen ließen. Durch den Einsatz einer geringeren Zn^{2+} -Konzentration (20 μ M $ZnCl_2$) war es möglich, eine Nucleophilkonzentration von 3 mM einzusetzen und die „Ligaseaktivität“ der zinkabhängigen Trypsiligase zur Par10-Synthese zu nutzen, ohne dass es zu einer Niederschlagsbildung kam.

Somit standen nach erfolgreichen enzymatischen Ligationen auch die Varianten Par10 M57Dap(Abz) und Par10 V58Dap(Abz) zur Verfügung (Abb. 4-11). Da ELs regio- und stereospezifisch verlaufen, kam es hier zu keiner Nebenproduktbildung. Die Trennung der Ligationsprodukte von den Ausgangssegmenten gelang allerdings nicht vollständig und erschwerte vor allem die Interpretation der CD-spektroskopischen Charakterisierung dieser Varianten.

Für Par10 Q80Dap(Abz) und für die beiden rekonstruierten wtPar10-Varianten, welche aus zwei beziehungsweise aus drei Segmenten ligiert wurden, kann man von einer der wtPar10 ähnelnder Raumstruktur ausgehen, da diese eine katalytische Aktivität zeigten.

Beim Umgang mit langen, chemisch hergestellten Proteinsegmenten stellt das Auftreten von unlöslichen und aggregierenden Spezies ein typisches Problem dar. Auch das C-terminale Par10 H-36-92-Segment in den EL-Ansätzen war unstrukturiert, wie die aufgenommenen Fern-UV-CD-Spektren belegten (Abschnitt 4.4). In künftigen ELs könnten ein zusätzlicher Rückfaltungsschritt und eine anschließende Konzentrierung der 57mere vor der Ligationsreaktion höhere effektive Nucleophilkonzentrationen in den Ligationsansätzen erlauben und somit die Ausbeute erhöhen. Die Ausbildung sekundärer Strukturelemente könnte allerdings die Zugänglichkeit des N-Terminus des Nucleophils für die Trypsiligase erschweren (sekundärstrukturfreie N-Termini werden besser erkannt und umgesetzt) und letztlich zu niedrigeren Endausbeuten führen.

Der Einbau hydrophilerer Fluoreszenzsonden anstelle des in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzbausteins könnte ebenfalls zu einer besseren Löslichkeit der 57mere führen. Bei den von der Firma *invitrogen* angebotenen Alexa Fluor 350- und Alexa Fluor 405-Fluoreszenzfarbstoffen erhöhen eingebrachte Sulfonsäuregruppen die Löslichkeit dieser Sonden in wässrigen Lösungsmitteln. Aller-

dings ist vor allem Alexa Fluor 405 sterisch weitaus anspruchsvoller als der 2-Aminobenzoesäurerest, was sich erschwerend auf die Synthese entsprechender Peptide auswirken könnte.

Eine Änderung der Synthesestrategie hinsichtlich der Verknüpfungsreihenfolge verspricht keine Verbesserung der Endausbeute an markierten Par10-Proteinen. Erfolgt die EL vor der NCL, hat dies einen zweimaligen Einsatz von MESNa-Estern zur Folge, die meist auch einer spontanen Hydrolyse unterliegen und in der Folge nicht mehr in einer NCL eingesetzt werden könnten. Auch die verwendete Trypsiligase kann Peptid-MESNa-Ester in Abhängigkeit von der sich in P₁-Position befindenden Aminosäure teilweise hydrolisieren.

Alternative Substratmimetika, welche beispielsweise einen C-terminalen Thiophenylester aufweisen (*substrate engineering*), in Kombination mit dem Einsatz innovativer Puffersysteme, die beispielsweise ionische Flüssigkeiten enthalten (*medium engineering*), ließen sich zukünftig nutzen. Das dies ein erfolgsversprechendes Konzept für die Peptid-/Proteinsynthese darstellt, konnten WEHOFSKY *et al.* 2008 zeigen, indem sie die Syntheseausbeute eines verkürzten Par10 42-92-Segments unter Verwendung der ionischen Flüssigkeit [MMIM] [Me₂PO₄]¹⁰ (60 % (v/v) [MMIM] [Me₂PO₄] und 40 % (v/v) MOPS¹¹-Puffer, pH 8) signifikant erhöhen konnten [276]. Die generelle Eignung ionischer Flüssigkeiten für ELs (und damit eine mögliche Übertragbarkeit auf Trypsiligase) konnte ebenfalls gezeigt werden, indem Chymotrypsin, Trypsin und die V-8-Protease Ausbeuten von 52 %, 50 % beziehungsweise 45 % bei der Ligation von Par10 46-62-OGp/SCm mit Par10 63-92 erreichten. Die Synthese vollständiger, allerdings ebenfalls unmodifizierter Par10-Moleküle gelang ebenfalls mit der D-stereospezifischen Alkaline-D-Peptidase (ADP), welche auch die Knüpfung von L-Aminosäuren erlaubt und somit eine weitere Alternativmethode zur eigenen verwendeten Trypsiligasereaktion darstellt [277]. Damit erscheint die eigene Ausbeute von 40,5 % Ligationsprodukt steigerungsfähig. Eine Ausbeuteerhöhung wurde nicht weiter verfolgt, da das vorrangige Ziel, fluoreszenzmarkierte Par10-Varianten für Titrationsanalysen bereitzustellen, erreicht wurde.

Es bleibt festzuhalten, dass sich die Trypsiligase als Biokatalysator für die Verknüpfung von Peptiden zu vollständigen Proteinen sehr gut eignete und dabei die Verwendung von löslichkeitsfördernden Zusätzen (GdmCl, DMSO) und von Reduktionsmitteln (TCEP) ohne folgenschweren Aktivitätsverlust tolerierte. Dies war entscheidend für die Ligation der im wässrigen Milieu schwerlöslichen und leicht aggregierenden 57mer Par10-Peptide. Durch ein genau festgelegtes Substratmotiv (Lys-Lys-His), welches in Proteinen äußerst selten vorkommt, war die trypsiligasevermittelte Ligation hoch spezifisch. Da das ursprüngliche Erkennungsmotiv nicht im Ligationsprodukt verblieb, war bei den

¹⁰ 1,3-Dimethylimidazolium dimethylphosphat

¹¹ 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

Substratmimetika unterstützten Peptidknüpfungen keine Sekundärproteolyse des Produktes beobachtbar. Ferner dienten die hergestellten Par10-Derivate als Modellsysteme zur Evaluierung der prinzipiellen Anwendbarkeit der sequentiellen chemoenzymatischen Semisynthese mit einer einhergehenden ortsspezifischen Modifizierung von Proteinen unter Beibehaltung des natürlichen Proteinerückgrats.

5.2.4 Fluoreszenztitrations

Anhand von Titrationsversuchen konnte demonstriert werden, dass sich die synthetisierten fluoreszenzmarkierten Par10-Varianten grundsätzlich als Untersuchungsobjekte für weiterführende Studien eignen. Eine spezifische Fluoreszenzlöschung nach erfolgter Ligandenbindung war bei allen Par10-Derivaten zu beobachten. Die Löschung der eingeführten 2-Aminobenzoessäurefluoreszenz erfolgte zum einen durch die kovalente Bindung von 2-Iod-*N*-(4-nitrophenyl)acetamid (2-INPA) an Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸ und zum anderen durch die nicht-kovalente Bindung von Suc-AAPF-*p*NA an die Substratbindungstasche. Die Abnahme der Fluoreszenz in Anwesenheit der Negativkontrollen (2-Abz-OH, D-Phe-*p*NA) wird auf einen allgemeinen inneren Filtereffekt zurückgeführt [225].

Es wurde davon ausgegangen, dass 2-INPA nach sterischen Kriterien wie die natürlichen Substrate von Par10 schnell in die Bindungstasche gelangte und dass die Bindung von 2-INPA an die Cys⁴⁰-Seitenkette die Lage der Dap(Abz)-Sonde nur geringfügig beeinflusste. Ferner wurde angenommen, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen (Abschnitt 3.5.3) ausschließlich die beiden Sulfhydrylketten mit 2-INPA reagierten und mögliche Nebenreaktionen (z. B. mit His-Seitenketten) aufgrund geringerer Reaktivitäten zu vernachlässigen waren. Massenspektrometrische Untersuchungen deuteten an, dass Cys⁴⁰ bevorzugt und deutlich schneller als Cys⁶⁸ reagierte (Abschnitt 4.8.1). Kovalent modifizierte Cys⁶⁸-Seitenketten befanden sich darüber hinaus auf der gegenüberliegenden Seite und in einem zu großen Ring-Ring-Abstand ($>7 \text{ \AA}$), um die 2-Abz-Fluoreszenz zu löschen [219]. Wie für das doppelt markierte 2-Abz-AAPF-*p*NA-Peptidderivat wurden Quencheereignisse aufgrund der räumlichen Nähe von Fluorophor und Quencher für die Fluoreszenzlöschung verantwortlich gemacht (intramolekulare Kollision [208]).

Die größte 2-Abz-Fluoreszenzlöschung und der kleinste K_{D_app} -Wert ergab sich bei der katalytisch aktiven Par10 Q80Dap(Abz)-Variante (Abb. 4-19 F und Tab. 4-4). Da die Reaktivität der Cys⁴⁰-Seitenkette mit deren Deprotonierung des Schwefelatoms korreliert, wird angenommen, dass der pK_S -Wert des Cys⁴⁰ von Par10 Q80Dap(Abz) im Vergleich zu dem der drei übrigen katalytisch inaktiven Varianten am kleinsten ist. Diese Beobachtung stützt die Befunde, wonach eine deprotonierte Cys⁴⁰-Seitenkette für einen Substratumsatz erforderlich ist (Abschnitt 4.7). Allerdings ließen sich die einzelnen Cys⁴⁰- pK_S -Werte für die modifizierten Par10-Varianten aufgrund des Vorhandenseins von

Cys⁶⁸ nicht bestimmen. Dies gelang nur für die vollständig rekombinant erhaltenen Mutanten Par10 C40A und Par10 C68A (Abschnitt 3.6.7), welche jeweils nur eine Cysteinseitenkette aufwiesen.

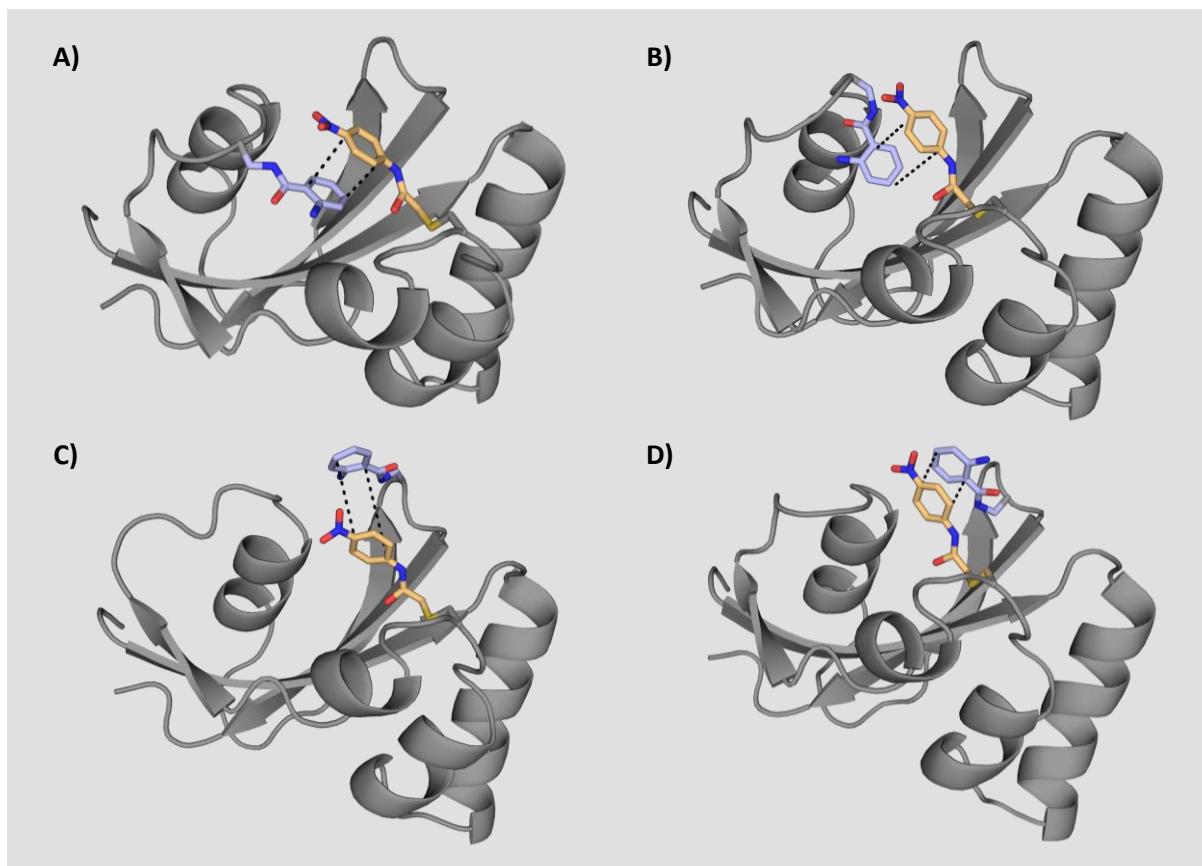


Abb. 5-3. Fluoreszenzlöschung der markierten Par10-Derivate. Modelle der Fluorophor-Quencher-Paare nach der kovalenten Modifizierung der fluoreszenzmarkierten Par10-Derivate mit 2-INPA. Alle Abstände zwischen dem Fluorophor (2-Abz, hellblau) und dem Quencher (2-INPA bzw. pNA-Rest, orange) betragen weniger als 7 Å und liegen damit innerhalb der fluoreszenzlöschenden Ring-Ring-Distanz (gestrichelte Linien) [219]. **A)** Par10 M57Dap(Abz). **B)** Par10 V58Dap(Abz). **C)** Par10 Q80Dap(Abz). **D)** Par10 F81Dap(Abz). Die Abbildungen wurden mittels der PDB-Datei 1JNS und PyMol 1.4.1 erstellt. Die eingeführten Aminosäuresubstituenten wurden mit den PyMol-Befehlen *build* und *sculpting* hinsichtlich Bindungslänge, Bindungswinkel, Chiralität, Planarität und Atomabständen optimiert, aber ohne weitere Energieminimierung lediglich graphisch eingefügt. (Farbcode der Stabdarstellung: Rot = O-Atome, Blau = N-Atome, Hellblau = C-Atome von 2-Abz, Orange = C-Atome von 2-INPA)

Die Titrationsanalysen mit Suc-AAPF-pNA als Liganden ergaben apparente K_{D_app} -Werte, welche um ein bis zwei Größenordnungen höher lagen als die für 2-INPA (Abschnitt 4.8.2). Aufgrund fehlender Vergleichsdaten ist die Einordnung der eigenen Befunde schwierig. BEHR SIN *et al.* ermittelten für hPin1 und Suc-AEPF-pNA einen K_M -Wert von $310 \pm 72 \mu\text{M}$ [107]. Dass der K_{D_app} -Wert für Par10 M57Dap(Abz) mit $33,73 \pm 4,64 \mu\text{M}$ am kleinsten war, wird darauf zurückgeführt, dass mit dem erfolgten Austausch von Met⁵⁷ durch Dap(Abz) der Aminosäurerest ersetzt wurde, die von den vier ausgewählten Aminosäureresten am weitesten in den Substratbindungsbereich von wtPar10 hineinragt. Der Austausch von Met⁵⁷ durch Dap(Abz) führte so möglicherweise zu einer stabileren Suc-AAPF-pNA-Anlagerung an Par10.

Der relativ hohe K_{D_app} -Wert für Par10 Q80Dap(Abz) von $63,25 \pm 4,32 \mu\text{M}$ stellt keinen Widerspruch zu den bestimmten $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1}$ -Werten dar (Abschnitt 4.6.1), da für die katalytische Effizienz die Substratanlagerung an das katalytische Zentrum eines Enzyms allein nicht ausreichend ist. Vielmehr spielen auch der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes und die Produktbildung entscheidende Rollen. Auf die kleineren K_{D_app} -Werte der drei übrigen Par10-Varianten bei fehlenden Enzymaktivitäten, wird im Abschnitt 5.3.2 eingegangen.

Verdrängungsstudien mit Suc-AAPF-*p*NA als primär gebundenem Liganden gestatteten die Bestimmung der Affinitäten (K_{K_app}) der beiden nicht markierten Peptide AhpC¹⁻¹⁶ (Ac-SLINTKIKP FKNQAFK-NH₂) und AhpC¹¹⁵⁻¹³² (Ac-GLADRATFVVD PQGIIQA-NH₂) für die einzelnen Par10-Derivate. Allerdings lieferten diese Analysen schwer zu interpretierende Ergebnisse, welche zunächst im Widerspruch zu den IANUS-Studien standen, die unter anderem ein Ausgangspunkt dieser Arbeit waren. Zwar enthalten beide AhpC-Sequenzabschnitte je eine Prolylbindung und damit eine potenzielle Substraterkennungssequenz für wtPar10, aber nur AhpC¹¹⁵⁻¹³² wurde im IANUS-Assay als ein mit dem Substratbindungsbereich von wtPar10 wechselwirkender Peptidligand identifiziert. AhpC¹⁻¹⁶ zeigte dagegen keine Interaktion mit der wtPar10-Sequenz [126]. Gestützt wird diese Beobachtung dadurch, dass AhpC¹¹⁵⁻¹³², nicht aber AhpC¹⁻¹⁶, die *cis/trans*-Isomerisierung von Suc-AAPF-*p*NA durch wtPar10 vermutlich kompetitiv inhibiert (Abb. 4-22 und [126]).

Für beide AhpC-Peptide waren die ermittelten K_{K_app} -Werte um eine Größenordnung kleiner als die entsprechenden K_{D_app} -Werte für Suc-AAPF-*p*NA (ausgenommen Par10 V58Dap(Abz) mit AhpC¹⁻¹⁶, Tab. 4-5). Hierfür könnte eine höhere Anzahl von möglichen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von AhpC¹⁻¹⁶ beziehungsweise AhpC¹¹⁵⁻¹³² mit der Substratbindungsstelle der einzelnen Par10-Varianten verglichen mit der Anzahl an Wechselwirkungen zwischen den Varianten mit dem Tetrapeptid Suc-AAPF-*p*NA verantwortlich sein. Allerdings hätte man für AhpC¹¹⁵⁻¹³² deutlich niedrigere K_{K_app} -Werte als für AhpC¹⁻¹⁶ erwarten können. Ob das hier gefundene, und zu den Ergebnissen des IANUS-Peptidarrays (mit wtPar10) im Kontrast stehende, eher unspezifisch erscheinende Bindungsverhalten von AhpC¹⁻¹⁶ und AhpC¹¹⁵⁻¹³² gegenüber den Par10-Varianten im Zusammenhang mit den ausgetauschten Aminosäuren oder dem gewählten Syntheseweg steht, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Anhand von Par10 Q80Dap(Abz) konnte aber gezeigt werden, dass sich die Katalyseaktivität durch beide AhpC-Peptide um etwa den gleichen Betrag inhibieren lässt (Abb. 4-22) und damit vermutlich beide AhpC-Peptidsequenzen in das katalytische Zentrum von Par10 Q80Dap(Abz) eingebunden werden. Diese Ergebnisse bestätigten somit die Resultate der Verdrängungsstudien (Abschnitt 4.8.3).

Interessanterweise befinden sich vor und nach dem jeweiligen Prolinrest von AhpC¹⁻¹⁶ beziehungsweise AhpC¹¹⁵⁻¹³² Aminosäuren, welche sich in ihren Ladungen und Hydrophobizitäten stark voneinander unterscheiden. Die durchgeführten CD-spektroskopischen Untersuchungen ergaben für

alle fluoreszenzmarkierten Varianten einen höheren Anteil ungeordneter und damit vermutlich auch beweglicherer Sekundärstrukturelemente im Vergleich zur Wildtypform (Abschnitt 5.3.1). Dieser könnte zu einem flexibleren Substratbindungsbereich der Par10-Varianten gegenüber dem Wildtyp geführt haben. Die sich unter Umständen daraus ergebende breitere Substratspezifität von Par10 Q80Dap(Abz) ist womöglich eine Ursache für die bevorzugte Einbindung von positiv (Lys im Fall von AhpC¹⁻¹⁶) und negativ geladenen Seitenketten (Asp im Fall von AhpC¹¹⁵⁻¹³²) vor dem Prolylrest gegenüber den für wtPar10 „üblichen“ ungeladenen, hydrophoben Seitenketten (Leu>Phe>Ala für Suc-AXPF-*p*NA-Substrate [26]).

Auch eine Bindung der AhpC-Peptide an einer von der Prolinseitenkette entfernten Position ist denkbar. So wurde beispielsweise für Par17 in einem Phagen-Display-Verfahren die Konsensussequenz XHSXVH \emptyset (X = beliebige AS-Seitenkette, \emptyset = hydrophobe AS-Seitenkette) gefunden, welche nicht zwingend eine Prolylseitenkette für die Bindung an die postulierte Bindungstasche von Par17 voraussetzt [278]. Für die Bindung von KHSPVHIGGGG-NH₂ an Par17 wurde von den zuvor zitierten Autoren zudem ein unerwartet hoher K_D-Wert von 0,7 mM bestimmt und dieser mit der geringen Länge des Peptids begründet. So scheint auch in der eigenen Arbeit die Verdrängung von Suc-AAPF-*p*NA eher durch die Länge der AhpC-Peptide, als durch spezifisch miteinander wechselwirkende Seitenketten bedingt.

Für die drei übrigen Par10-Varianten lieferten die Verdrängungsstudien keine Hinweise auf deren katalytische Inaktivität. Aber auch in diesen Fällen konnte die Verdrängung eines Peptides durch ein zweites demonstriert und damit die generelle Eignung der fluoreszenzmarkierten Par10-Moleküle für weiterführende Studien gezeigt werden.

5.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehung von Parvulin 10

Da das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen als ein Hinweis auf die Ausbildung einer natürlichen Proteinstruktur gilt, wurden die Sekundärstrukturmerkmale der Par10-Einzelmutanten, der markierten Par10-Varianten und ausgewählter Par10-Segmente anhand der Fern-UV-CD-Spektroskopie (190-250 nm) untersucht und mittels Vergleichsspektren von rekombinant erhaltenem wtPar10 analysiert (Abschnitt 4.4). Zusammen mit dem zeitabhängigen tryptischen Verdau von wtPar10, Par10 C40A und Par10 C68A (Abschnitt 4.5) sowie den ¹H^N-¹⁵N-HSQC-Spektren von Par10 C40A (Abschnitt 4.2.4) ließen die aufgenommenen CD-Spektren Rückschlüsse auf die strukturellen Effekte der ortsgerichteten Mutagenesen, der eingeführten Fluoreszenzsonden, der Segmentlängen und der eingesetzten Segmentligationsverfahren zu. Anhand der ermittelten Enzymaktivitäten, pH-Optima und der pK_S-Wertbestimmung der Cys⁴⁰- und Cys⁶⁸-Seitenketten wird im Folgenden versucht, eine Struktur-Funktions-Beziehung einzelner Par10-Varianten zu beschreiben

und anhand der Ergebnisse der strukturellen Untersuchungen eine mögliche Erklärung für die kinetischen Befunde zu geben.

5.3.1 Sekundärstrukturen der Par10-Varianten

Da für wtPar10 eine Spezifitätskonstante von $9,9 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ für das Substrat Abz-AAPF-pNA ermittelt wurde, die gut mit zuvor publizierten Daten übereinstimmte [26], ist davon auszugehen, dass die isolierte Proteinspezies über eine vollständige katalytische Aktivität verfügte, wie sie nur mit einer korrekten Raumstruktur erzielt werden kann. Das für wtPar10 in Abb. 4-12 A dargestellte CD-Spektrum spiegelt demnach die native Faltungsform von wtPar10 wider und die Interpretationen zur Sekundärstruktur einzelner Par10-Proteinvarianten oder Par10-Segmente beziehen sich darauf.

Die aufgenommenen CD-Spektren deuten darauf hin, dass wtPar10 und Par10 C68A identische globale Faltungsstrukturen aufweisen, da sie sich nur unwesentlich voneinander unterscheiden (Abb. 4-12 A). Die ermittelten Sekundärstrukturanteile von 37 % helikalen, 32 % Faltblatt- und 31 % ungeordneten Strukturen (CDNN-Software) stimmen anteilig mit der bekannten wtPar10-Lösungsstruktur (PDB-ID: 1JNT) überein.

Im Unterschied dazu, scheint es in der Struktur von Par10 C40A eine Verschiebung von helikalen Anteilen hin zu mehr Faltblatt- und Zufallsknäuelstrukturen zu geben (30 %/35 %/35 %). Auf diese strukturellen Veränderungen wird auch die proteolytische Instabilität der C40A-Mutante zurückgeführt, welche zweimal schneller durch Trypsin abgebaut wurde als die C68A-Variante. Durch die eingeführten Einzelmutationen haben sich keine neuen Spaltstellen für das eingesetzte Trypsin ergeben (je 13 Spaltstellen gemäß Expsy *Peptide Cutter*), allerdings befinden sich in unmittelbarer Nähe zum Cys⁴⁰ drei, in der Nähe zum Cys⁶⁸ aber nur eine geeignete Trypsinspaltstelle. Ein Verlust an definierter dreidimensionaler Struktur um Cys⁴⁰ führt vermutlich deshalb zu einem schnelleren Abbau. Man kann bereits an dieser Stelle spekulieren, dass Cys⁴⁰ einen größeren stabilisierenden Einfluss auf die Gesamtstruktur von Par10 ausübt als Cys⁶⁸. NMR-Untersuchungen an uniform markierten ¹⁵N-Par10 C40A scheinen diese Befunde zu bestätigen (siehe kommende Abschnitte).

Durch Faltungsstudien mit Harnstoff als denaturierendes Agens konnte die Konformationsstabilität von wtPar mit $\Delta G_{\text{Harnstoff}}^{\text{H}_2\text{O}} = 28 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ für pH 8 und 10 °C ermittelt werden [98]. Die in ihren Molekulargewichten mit wtPar10 vergleichbaren Proteine RNase A (13,7 kDa) und Lysozym (14,3 kDa) weisen unter Berücksichtigung der höheren Temperatur von 25 °C, bei der entsprechende Messungen erfolgten, deutlich größere Stabilisierungsenergien auf (beide $\Delta G_{\text{GdmCl}}^{\text{H}_2\text{O}} = 37 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, pH 7) [279], weshalb man davon ausgehen kann, dass bereits der Austausch einzelner Aminosäuren oder der Einbau einer Fluoreszenzsonde einen entscheidenden Beitrag zu Raumstrukturveränderungen von Par10 leisten kann, was im folgenden näher diskutiert wird.

Für die Par10-Mutante C40A wurde versucht, anhand der $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -wtPar10 und ^{15}N -Par10 C40A Rückschlüsse auf die strukturelle und funktionelle Bedeutung von Cys⁴⁰ abzuleiten. Das $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von ^{15}N -Par10 C40A (Abb. 4-7 B) wird dahingehend interpretiert, dass die dreidimensionale Struktur der Mutante im wesentlichen mit der des wtPar10 [97] übereinstimmt. Allerdings deuten einige verschobene und zum Teil stark linienverbreiterte Signale auf lokale Strukturveränderungen und eine erhöhte Dynamik einzelner Par10 C40A-Bereiche hin. Trotzdem konnten die meisten der Proteinerückgrat-basierenden Signale eindeutig identifiziert und den entsprechenden Sequenzpositionen zugeordnet werden. Auf eine Strukturaufklärung wurde angesichts der nicht-optimalen Spektrenqualität, einzelner fehlender Signale und aus zeitlichen Gründen dennoch verzichtet, da hierzu weitere Zuordnungsstrategien und dreidimensionale NMR-Experimente zur Vervollständigung der Zuordnung nötig gewesen wären. Die eigene Spektrenaufnahme für ^{15}N -Par10 C40A erfolgte an einem leistungsschwächeren 500 MHz Gerät (Bruker DRX 500 Spektrometer, Biospin GmbH). Die $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des wtPar10 wurden bei 25 °C an einem 600 MHz Bruker DMX 600-Spektrometer (Biospin GmbH) aufgenommen.

Auf Basis der $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -wtPar10 ließen sich dennoch Rückschlüsse auf den Faltungszustand von ^{15}N -Par10 C40A ableiten (Abb. 4-7). Obwohl ^{15}N -wtPar10 und ^{15}N -Par10 C40A die gleiche Aminosäureanzahl aufweisen, sind im ^{15}N -Par10 C40A Spektrum weniger Signale vorhanden als im Spektrum von ^{15}N -wtPar10. Die Zahl der in ^{15}N -Par10 C40A detektierten Signale lag leicht unterhalb des Erwartungswertes (einige Signale in Abb. 4-7 B befinden sich unterhalb des Höhenlinienprofils). Das $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von ^{15}N -wtPar10 zeigte darüber hinaus eine erheblich bessere Signalverteilung. Generell traten bei Par10 C40A deutliche Linienverbreiterungen und stark veränderte chemische Verschiebungen bei Aminosäuren auf, die sich in unmittelbarer Nähe zum Ala⁴⁰ befinden (Ser³⁸, Ile³⁹, Ser⁴², Gly⁴³). Interessanterweise gab es aber auch stark verschobene Signale von Aminosäuren, die sich in der Raumstruktur weit von Ala⁴⁰ entfernt befinden. Dies betraf insbesondere solche Reste, welche die Substratbindungstasche bilden (Leu⁴⁹, Met⁵⁷, Val⁵⁸, Phe⁸¹) und die sich auf dem Cys⁴⁰ zugewandten β -Faltblatt befinden (Leu¹⁰, Gly⁸², His⁸⁴). Es lässt sich schlussfolgern, dass der C40A-Austausch zu einer starken Beeinflussung der Peptidrückgratstruktur von Par10 geführt hat und es zu größeren Veränderungen der Par10-Raumstruktur gekommen ist.

Die experimentellen Daten stimmen mit im Nachgang durchgeführten datenbankgestützten Berechnungen zu intrinsisch auftretenden ungeordneten oder flexiblen Strukturen in wtPar10, Par10 C40A und Par10 C68A mittels zweier Algorithmen unter Verwendung neuraler Netzwerke überein [280-282] (Abb. 5-4). Beide auf den Röntgenkristallstrukturen der PDB basierenden Vorhersagen prognostizieren für den C40A-Austausch eine Zunahme ungeordneter Strukturen um Cys⁴⁰. Die C68A-Mutation führt danach beinahe zu keiner Zunahme an unstrukturierten Bereichen innerhalb des Proteins. Es sei darauf hingewiesen, dass Alanin neben den „strukturbrechenden“ Amino-

säuren Glycin und Prolin sowie Aminosäuren mit geladenen Seitenketten, ebenfalls zu den „Unordnung fördernden Aminosäuren“ gehört [283].

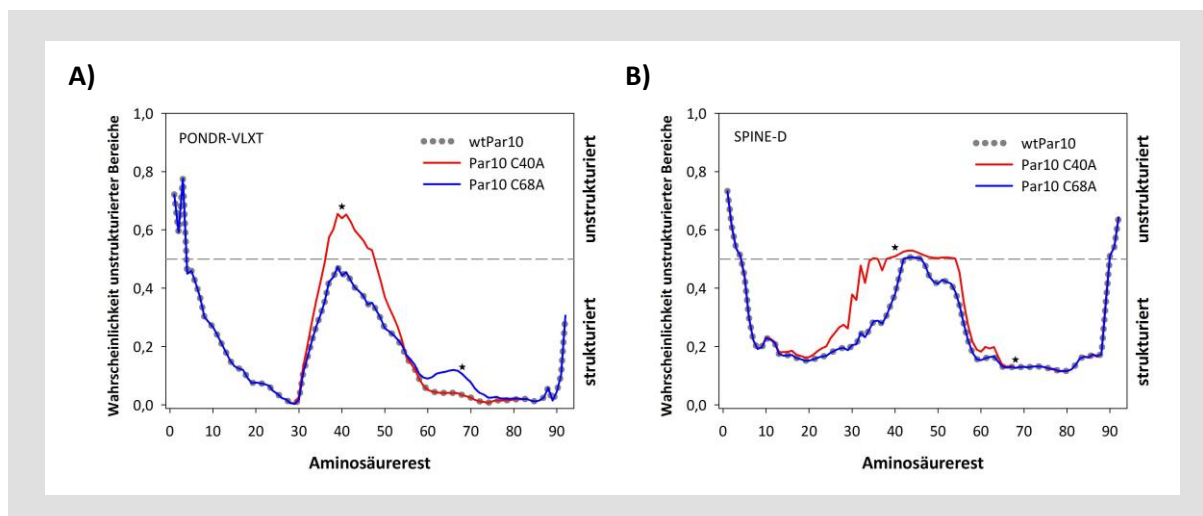


Abb. 5-4. Vorhersage ungeordneter oder flexibler Bereiche von wtPar10, Par10 C40A und Par10 C68A. A) Die Vorhersage unter Verwendung von PONDR (*Predictor Of Natural Disordered Regions*) [280, 281] zeigt für Par10 C40A eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von unstrukturierten Bereichen um Cys⁴⁰ (Par10-Segment 37-47). **B)** SPINE-D (*Sequence based Prediction with Integrated NEural network for Disordered residues*) [282] sagt insgesamt eine weniger starke Erhöhung der Wahrscheinlichkeit flexibler Strukturen um Cys⁴⁰ voraus, dafür über einen größeren Bereich (Par10-Segment 35-54). Für die oberhalb der gestrichelten, grauen Linie (0,5 = Schwellenwert für ungeordnete Bereiche) liegenden Sequenzabschnitte werden ungeordnete oder flexible Sekundärstrukturen vorhergesagt. Die Positionen der ausgetauschten Cysteine sind mit (*) gekennzeichnet.

Wie NMR-Studien an PrsA aus *S. aureus* [65], Titrationsexperimente und Röntgenstrukturanalysen in einer Auflösung von 0,8 Å von *hPar14* [284] belegen, existiert von Asp¹⁹⁴ über His¹⁴⁶ und His²³⁹ zu Ser²³⁴ in PrsA beziehungsweise von Asp⁷⁴ über His⁴² und His¹²³ zu Thr¹¹⁸ in *hPar14* ein Wasserstoffbrücken-charge-relay-System, eine Art Ladungsübertragungssystem (Abb. 5-5 A), welches die negative Ladung der Aspartatseitenkette im aktiven Zentrum von Parvulinen stabilisiert. Dieses in Parvulinen hoch konservierte Cys/Asp-His-His-Ser/Thr-Sequenz- und Strukturmotiv findet sich auch in Par10 als Cys⁴⁰-His⁸-His⁸⁴-Thr⁷⁹ sowie in *hPin1* als Cys¹¹³-His⁵⁹-His¹⁵⁷-Thr¹⁵² wieder. Das Strukturmotiv wird von den Autoren als eine über Wasserstoffbrücken verbundene Tetrade bezeichnet [284] und sollte in der Lage sein, auch eine negative Ladung der Cysteinseitenkette zu stabilisieren (Abb. 5-5). Die Beobachtung, dass eine T152A-Mutation in *hPin1* zu einer 300fach niedrigeren PPIase-Aktivität verglichen mit der Wildtypvariante führt, wohingegen ein T154S-Austausch die PPIase-Aktivität nur geringfügig verringert, stützt die Vermutung einer weitreichenden, für die Enzymfunktion relevanten Wasserstoffbrückenkette [284]. Nimmt man für wtPar10 ebenfalls eine Cys⁴⁰-Thiolat-stabilisierende Wasserstoffbrückenkette zu einem der Stickstoffatome des Imidazolrings von His⁸ an, festigen die zitierten und parallel zu den selbst durchgeführten Arbeiten erschienenen Publikationen eigene Ergebnisse und helfen, diese zu interpretieren (Abschnitt 5.3.3).

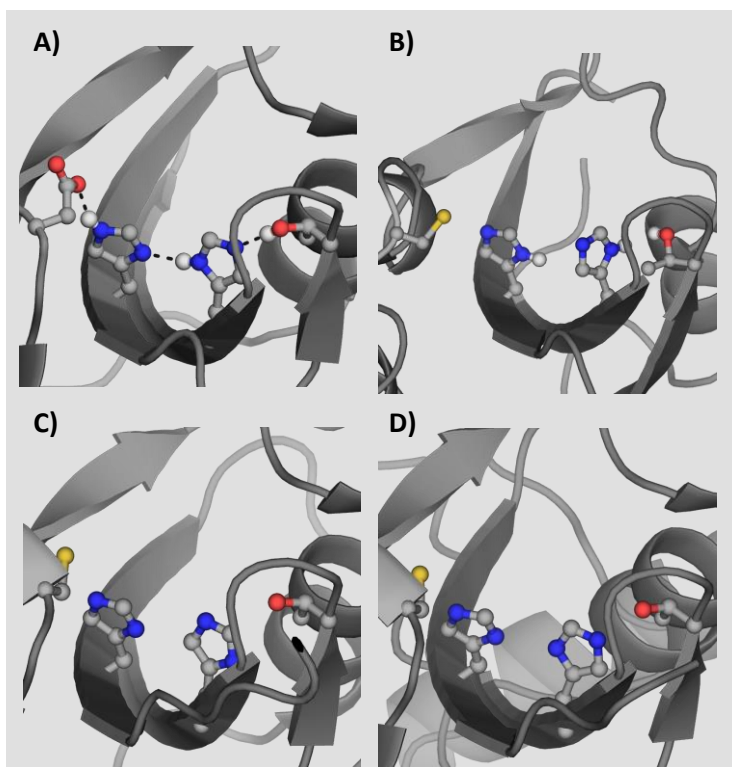


Abb. 5-5. Über Wasserstoffbrücken verbundene Tetraden in Parvulinen. **A)** Wasserstoffbrückennetzwerk (gestrichelte Linien), wie es MUELLER *et al.* für Asp⁷⁴-His⁴²-His¹²³-Thr¹¹⁸ für *humanes* hPar14 postulieren. Die Elektronendichten der gezeigten Wasserstoffatome waren in der |Fo-Fc| Elektronendichtekarte sichtbar (PDB-ID: 3UI4) [284]. **B)** Tetrade in *E. coli* Par10 mit Cys⁴⁰-His⁸-His⁸⁴-Thr⁷⁹ (PDB-ID: 1JNS) **C)** Tetrade in *humanen* hPin1 mit Cys¹¹³-His⁵⁹-His¹⁵⁷-Thr¹⁵² (PDB-ID: 1F8A). **D)** Tetrade in *C. albicans* CaEss1 mit Cys¹²⁷-His⁷²-His¹⁷¹-Thr¹⁶⁶ (PDB-ID: 1YW5). Farbcode der Stabdarstellung: Grau = C-Atome, Blau = N-Atome, Rot = O-Atome, Gelb = S-Atome; Darstellung: PyMol 1.4.1)

Verglichen mit den NMR-Lösungsstrukturen (PDB-IDs: 1NMV, 2LJ4) und Röntgenkristallstrukturen (PDB-IDs: 1PIN, 1F8A, 1YW5, 3UI4) anderer Parvuline erscheinen in *E. coli* Par10 die Abstände und die Orientierungen der Seitenketten von Cys⁴⁰, His⁸, His⁸⁴ und Thr⁷⁹ nicht optimal für die Ausbildung einer Tetrade (Abb. 5-5 B-D). In der Lösungsstruktur von wtPar10 ist vor allem der Abstand zwischen dem Cys⁴⁰-Schwefelatom und dem His⁸-Stickstoffatom mehr als doppelt so lang verglichen mit den Abständen der übrigen Parvuline. Es lässt sich vermuten, dass die Schleife zwischen Helix 2 und Helix 3 in wtPar10 flexibel genug ist und prinzipiell eine passende Orientierung der einzelnen Seitenketten zueinander erlaubt. Eine Kristallstruktur von *E. coli* Par10 könnte ein detaillierteres Bild liefern, da hier Elektronendichten eine genaue Wiedergabe der Anordnung und Ausrichtung der freidrehbaren Aminosäureseitenketten erlauben und sich Lösungs- und Kristallstrukturen gegenseitig ergänzen können. Es besteht allerdings oftmals eine Diskrepanz zwischen diesen beiden Strukturtypen eines Parvulins. So können durchaus die beiden Histidinseitenketten um 180° gedreht sein oder unterschiedliche tautomere Zustände aufweisen. Die Lösungsstruktur des hPin1 (PDB-ID: 1NMV) zeigt beispielsweise keine optimal zueinander ausgerichtete Tetrade aus Cys¹¹³-His⁵⁹-His¹⁵⁷-Thr¹⁵², die hPin1-Kristallstruktur (PDB-ID: 1F8A) hingegen weist nahezu ideale Bindungslängen und -winkel auf. Vermutlich durch die freie Drehbarkeit der Histidinseitenketten bedingt, befinden sich in einigen Strukturen die Histidin-Stickstoffatome N π und N τ (Kennzeichnung nach IUPAC [285]) unterschiedlich positioniert zueinander. Weiterhin lässt sich der Protonierungszustand der beiden Stickstoffatome der einzelnen Imidazolringe nicht aus allen gelösten Proteinstrukturen ermitteln.

Die beschriebene Tetrade scheint ein wesentliches stabilisierendes Element in der Tertiärstruktur von Parvulinen zu sein, wie viele der in Datenbanken hinterlegten Parvulinstrukturen und Mutationsstudien an den beteiligten Aminosäuren belegen [286]. Aufgrund der vergleichenden Studien muss auch für Par10 eine strukturstabilisierende Wasserstoffbrücken-Tetrade postuliert werden, welche vor allem die hydrophobe Bindungstasche „zusammenhält“. Eine Auflösung oder Aufweitung dieser Tetrade könnte die Inaktivität von Par10 C40A und den Verlust der nativen Struktur in diesem Bereich der Par10 C40A-Variante erklären, wie er mittels CD- und NMR-Spektroskopie beobachtet worden ist. Eine über Wasserstoffbrücken verbundene Tetrade mag auch eine Erklärung für den abgesenkten pK_s -Wert von Cys⁴⁰ in Par10 liefern (Abschnitt 5.3.3).

Durch den Austausch des Cysteins gegen das kleinere Alanin in Par10 C40A steht dem Übergangsbereich zwischen α -Helix 2 und α -Helix 3 („Ala⁴⁰-loop“) ein größerer Raum zur Verfügung, was dessen Fixierung möglicherweise beeinträchtigt. Die erhöhte Flexibilität des „Ala⁴⁰-loops“ könnte nicht nur durch eine eingebüßte Cys⁴⁰-His⁸-Wasserstoffbrückenbindung verursacht sein (Abb. 5-5), sondern auch durch den Verlust von möglichen weiteren Wasserstoffbrücken vom Cys⁴⁰-Schwefelatom zum NH-Proton von Ser⁴² und/oder zu den OH-Protonen von Ser³⁸ respektive Ser⁴² bewirkt werden (Abb. 5-6). Letztgenannte Wasserstoffbrückenbindungen werden auch für den stark abgesenkten pK_s -Wert von Cys⁴⁰ verantwortlich gemacht (Absatz 5.3.3).

Man kann vermuten, dass die Cys⁴⁰-Seitenkette selbst von entscheidender funktioneller Bedeutung für die Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung einer Peptidyl-Prolyl-Bindung durch wtPar10 ist, oder, dass die Fixierung des „Cys⁴⁰-loops“ eine ausschlaggebende strukturelle Voraussetzung für die *cis/trans*-Umwandlung einer Prolylbindung schafft. Beide Thesen können durch die vorliegenden Lösungs- und Kristallstrukturen diverser Parvuline weder ausgeschlossen, noch bestätigt werden. Es fehlen bislang hochaufgelöste Röntgenkristall- und Lösungsstrukturen, bei denen Cys⁴⁰ (oder analoge Cysteine) gegen ein Alanin mutiert ist, so dass die genauen strukturellen Auswirkungen dieser Mutation auf die Substratbindungstasche und auf das aktive Zentrum der Cys-defizienten und katalytisch inaktiven Parvuline zunächst noch ungeklärt bleiben.

Insgesamt wiesen die ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren von ¹⁵N-Par10 C40A für einen einzigen Aminosäureaustausch eine zu große Anzahl an Signalverschiebungen im Unterschied zu dem Par10-Spektrum auf. Die linienverbreiterten und überlagerten Signale deuten darüber hinaus auf ein Protein größeren Molekulargewichts hin. Da eine überraschend große Anzahl von Signalveränderungen vor allem im Substratbindungsbereich stattgefunden hat, kann man spekulieren, dass sich möglicherweise zwei Par10 C40A-Moleküle gegenseitig in ihren aktiven Zentren gebunden haben und aufgrund der fehlenden (auto)katalytischen PPIase-Aktivität aneinander gebunden blieben. Mit Methoden der Lichtstreuung, Feldflussfraktionierung [287, 288] und der analytischen Ultrazentrifugation [289] könnte man diesen Vermutungen in weiterführenden Experimenten nachgehen.

Um strukturelle und dynamische Moleküleigenschaften von Par10 C40A zu erfassen, die sich aufgrund der eingeführten Mutation ergeben haben, und um die mit Par10 C40A interagierenden Aminosäureseitenketten prolylhaltiger Substrate identifizieren zu können, wäre eine Zuordnung aller $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -Resonanzen erforderlich gewesen. Weitere Experimente (3D NOESY-, 3D COSY-, 3D TOCSY-HSQC- und 3D HSQC-NOESY-Experimente) könnten in Zukunft zur Lösung der Par10 C40A-Struktur führen.

Der Austausch des zweiten, nicht-konservierten Cys⁶⁸ in Par10 durch ein Alanin führte zu geringen Veränderungen der Proteinstruktur und zu einer marginalen Verringerung der PPlase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Erklärt werden kann dies aufgrund der weit entfernten Position des Cys⁶⁸ von der Substratbindungsstelle des wtPar10. Der Cys⁴⁰ ist für die Integrität der Proteinstruktur in Par10 erkennbar entscheidender als Cys⁶⁸.

Von den fluoreszenzmarkierten Par10-Derivaten zeigte nur Par10 Q80Dap(Abz) eine dem wtPar10 ähnliche Sekundärstruktur und ein beinahe identisches CD-Signal zum Par10 C40A-CD-Spektrum. Diese Ergebnisse bestätigen für Par10Q80Dap(Abz) die erwartete α -helikale und β -Faltblattstruktur des Proteins (Abb. 4-12 D). Dennoch wird auch für Par10 Q80Dap(Abz), wie für die drei übrigen markierten Par10-Derivate, ein deutlich niedrigeres CD-Signal bei 196 nm und eine ausgeprägtere negative Elliptizität um 212 nm als Hinweise auf einen verringerten helikalen und erhöhten Faltblattanteil gewertet [192, 193].

Es ist zudem ein sekundärstrukturbeeinflussender Effekt durch die eingeführten Fluoreszenzsonden festzustellen, von denen nur geringfügige Strukturveränderungen erwartet worden waren. Diese Resultate überraschten, weil mit dem Dap(Abz)-Baustein bewusst ein kleines, hydrophobes Aminosäurederivat gewählt worden war, dass ebenfalls hydrophobe Aminosäureseitenketten ersetzte (mit Ausnahme von Gln⁸⁰).

Durch Vergleiche der Sekundärstrukturen von unmarkierten Par10-Molekülen, die ebenso durch Segmentligationen entstanden sind, wird allerdings deutlich, dass es auch hier zu Strukturabweichungen im Vergleich zum vollständig exprimierten wtPar10 kommt. Dabei zeigen die untersuchten Proben der wtPar10-Varianten, die aus drei Peptidsegmenten synthetisiert wurden (mittels NCL + EL), deutlich verschlechterte CD-Spektren als die Proben der Varianten, die aus zwei Peptidsegmenten hergestellt wurden (Abb. 4-12 C). Vor allem der höhere „synthetische“ Anteil und noch vorhandene, nicht vollständig von den Ligationsprodukten getrennte Ausgangssegmente scheinen für den scheinbaren Sekundärstrukturverlust in diesen Proben verantwortlich zu sein. Die vollständige Abtrennung der Edukte von den ligierten Par10-Molekülen war aufgrund der sehr ähnlichen Retentionszeiten bei der RP-HPLC-Reinigung nicht möglich (Abb. 4-11). Insbesondere die Vollängen-Varianten Par10 M57Dap(Abz)- und Par10 V58Dap(Abz) ließen sich nicht restlos von ihren jeweiligen

57merigen Ausgangssegmenten (Par10 H-36-92-OH M57Dap(Abz), Par10 H-36-92-OH V58Dap(Abz)) trennen.

Wie hoch der Anteil inkorrekt rückgefaltener Par10-Moleküle zu den nativ gefalteten Spezies war, wurde nicht bestimmt. Faltungsstudien an wtPar unter Verwendung von Harnstoff zeigen, dass sich entfaltene Moleküle nahezu vollständig und autokatalysiert in ihre native Struktur zurückfalten [98]. Es kann davon ausgegangen werden, dass mit einer vollständigen Isolierung der ligierten Par10-Varianten auch eine Verbesserung der Fern-UV-CD-Spektren resultieren würde und die Einführung der künstlichen Sonde in die Substratbindungsstelle von Par10 weniger problematisch ist, als die CD-spektroskopischen Daten vermuten lassen.

Die Par10-Einzelsegmente Par10 H-1-67-OH und Par10 H-68-92-OH zeigten die erwarteten CD-Signalkurven für überwiegend ungeordnete Oligopeptide (Abb. 4-12 B). Auch bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Segmente kam es zu keiner „spontanen“ Sekundärstrukturausbildung, wie das Fehlen eines positiven CD-Signals um 195 nm oder eines negativen Ausschlags bei 217 nm zeigten. Allerdings entsprachen diese Spektren auch nicht Spektren mit einem negativen maximalen Minimum bei 195 nm, was eine vollständig aus einem Zufallsknäuel bestehende Proteinstruktur widerspiegeln würde [193].

5.3.2 PPlase-Aktivitäten der Par10-Varianten

Die für die einzelnen Par10-Varianten und Segmente bestimmten Spezifitätskonstanten $k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1}$ wurden mit einem proteasefreien PPlase-Aktivitätstest bestimmt, da hier ein proteolytischer Abbau inkorrekt- oder teilentfalteter Par10-Varianten und damit verfälschte und untereinander nicht vergleichbare $k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1}$ -Werte ausgeschlossen werden konnten (Tab. A 3-1 im Anhang). Die ermittelten PPlase-Aktivitäten der vollständigen Par10-Varianten unterschieden sich zum Teil um mehrere Größenordnungen voneinander, abhängig von vorgenommenen Mutationen oder der Position des eingeführten Fluorophors Dap(Abz). Wie erwartet, zeigte wtPar10 die größte Spezifitätskonstante ($k_{\text{kat}} \cdot K_{\text{M}}^{-1} = 9,9 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) und stimmte mit den zuvor publizierten Daten ($6,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), welche mit einem chymotrypsingekoppelten Test bestimmt wurden, gut überein [26]. Im Unterschied zur proteasegekoppelten Methode setzte sich die eigene gemessene Geschwindigkeit aus der Summe der Teilkonstanten für die *cis*→*trans*- und *trans*→*cis*-Isomerisierung zusammen.

Die Aktivität von Par10 C68A erreichte 96 % der Aktivität des wtPar10. Die PPlase-Aktivität von Par10 C40A war dagegen praktisch nicht mehr vorhanden. Die Inaktivität von Parvulinvarianten, bei denen ein entsprechender Cysteinaustausch stattgefunden hat, konnte zuvor schon an homologen Parvulinen aus *S. cerevisiae* (Cys¹²⁰ in Ess1), *A. thaliana* (Cys⁷⁰ in Pin1At) und *H. sapiens* (Cys¹¹³ in hPin1) gezeigt werden und deutet somit auf eine entscheidende Rolle dieser Cysteinseitenkette für

die Parvulinstruktur oder -aktivität hin [43, 77, 107, 286]. Die Inaktivierung durch die C40A-Mutation spiegelt beispielsweise die Situation in der *hPin1* C113A-Mutante wider, welche einen im Vergleich zur Wildtypform des *hPin1* einen 123-fach niedrigeren $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1}$ -Wert aufweist.

Es ist darüber hinaus bekannt, dass die Modifizierung der beiden Cysteinseitenketten von wtPar10 durch thiolaktive Substanzen zur Inaktivierung des Enzyms führen. Experimente mit Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon), welches nach dem Mechanismus einer MICHAEL-Addition kovalent an die Sulfhydrylgruppen der freien Cysteine von Parvulinen bindet, führten nach der Modifizierungsreaktion zu einer langsamen Entfaltung und Inaktivierung der Parvulinmoleküle [99]. Juglon stellt mit seinen beiden kondensierten Benzolringen ein relativ großes, starres Molekül dar, das für eine (Teil)entfaltung von wtPar10 besonders gut geeignet scheint.

In eigenen Experimenten ist dieser Versuch mit *N*-Ethyl-Maleimid und Iodacetamid als ebenfalls thiolreaktive, wesentlich kleinere monocyclische beziehungsweise aliphatische Verbindungen für wtPar10 und Par10 C68A wiederholt worden. Auch hier konnte bei beiden Varianten nach der erfolgten Modifizierung keine Aktivität mehr gemessen werden. Die Reaktionen mit *N*-Ethyl-maleimid und Iodacetamid, welche beide nur mit der Thiolatform der Cysteinseitenketten reagieren können, verliefen selbst unter leicht sauren bis neutralen pH-Bedingungen (pH 6,00-7,25) und einem nur geringen Überschuss von *N*-Ethyl-Maleimid beziehungsweise Iodacetamid quantitativ (massenspektrometrisch nachgewiesen, Daten nicht gezeigt).

Diese überraschenden Ergebnisse führten zur Untersuchung der pK_S -Werte der beiden in wtPar10 vorliegenden Sulfhydrylgruppen (Abschnitt 5.3.3). Die Frage, ob durch die kovalente Bindung eines *N*-Ethyl-Maleimids oder Iodacetamids der Verlust der katalytische Aktivität durch eine nachfolgende Entfaltung, durch die Besetzung der Substratbindungstasche oder durch das Fehlen eines potenziellen Nukleophils (in Gestalt der Cys⁴⁰-Seitenkette) verursacht wird, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings zeigten die CD- und NMR-spektroskopischen Befunde (Abschnitte 4.4 und 4.2.4), dass allein schon der Cysteinaustausch gegen ein Alanin, ohne Einbringung einer zusätzlichen chemischen Modifikation, zu einer veränderten Sekundärstruktur von Par10 führt.

Durch die Einführung künstlicher Fluorophore gelang es, Par10 zu derivatisieren und neue Untersuchungsobjekte bereitzustellen. Bislang wurden die Seitenketten der ausgetauschten Aminosäuren mit der Substratbindung in Verbindung gebracht. Inwieweit diese Aminosäurereste an einer direkten Substratumsetzung teilnehmen ist nicht bekannt. Fluoreszenzsonden in der unmittelbaren Nähe der Substratbindungstasche von Par10 interessieren besonders, da sich mit ihnen und ebenfalls fluoreszenzmarkierten spezifischen Liganden in fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen Rückschlüsse auf die Parvulin-Ligand-Wechselwirkungen im aktiven Zentrum ableiten lassen.

Von den vier fluoreszenzmarkierten Varianten war nur noch Par10 Q80Dap(Abz) in der Lage, die *cis/trans*-Isomerisierung des Standardsubstrates 2-Abz-AAPF-pNA zu beschleunigen (57%ige Rest-

aktivität, Abb. 4-16). Somit zeigte nur das Par10-Derivat eine katalytische Aktivität, bei dem die Einführung der Sonde zu einer signifikanten Erhöhung der Hydrophobizität innerhalb des Substratbindungsbereiches führte und damit die Bindung und Umsetzung des ebenso hydrophoben 2-Abz-AAPF-*p*NA-Substrats begünstigte. Die Spezifitätskonstante für Par10 Q80Dap(Abz) war sogar etwas größer als die für das unmarkierte Par10, welches ebenfalls aus zwei Einzelsegmenten mittels NCL dargestellt wurde (Tab. A 3-1 im Anhang). Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Aktivitätsverlust von Par10 Q80Dap(Abz) gegenüber wtPar10 auf eine ungewollte Beeinträchtigung der Par10-Raumstruktur aufgrund des „synthetischen Proteinanteils“ zustande kam, wie es die Fern-UV CD-Spektren vermuten lassen (Abschnitt 5.3.1). Beim Austausch von Phe⁸¹ durch Dap(Abz) scheint die schlechtere Substratbindung zu einem zusätzlichen Aktivitätsverlust zu führen. Bei dieser Variante könnten die verloren gegangenen Wechselwirkungen zwischen dem Phenylring von Phe⁸¹ und dem Pyrrolidinring des Substratprolinrests eine wahrscheinliche Erklärung für den Aktivitätsverlust sein (Abschnitt 5.4.1).

Die vollständige Inaktivierung der beiden übrigen fluorophoren Par10-Derivate ist vermutlich direkt auf die ausgetauschten Seitenkettenfunktionen und eine starke strukturelle Veränderung des Substratbindungsbereiches zurückzuführen. Die besondere Bedeutung von Met⁵⁷ und Val⁵⁸ für die Bindung der Substrate in das Katalysezentrum konnten die Ergebnisse der ¹H-¹⁵N-HSQC-Titrationsexperimente mit ¹⁵N-wtPar10 erstmals bestätigen. Beide Seitenketten zeigten in allen Titrationsversuchen die größten chemischen Verschiebungen (Abschnitte 4.2.2 und 5.4.1). Der Austausch der aliphatischen Seitenketten durch die aromatische 2-Abz-Seitenkette gilt deshalb als hauptursächlich für den Verlust der enzymatischen Aktivität. Mutationen von Met⁵⁷, Val⁵⁸, Gln⁸⁰ und Phe⁸¹ könnten Hinweise geben, ob die künstliche Fluoreszenzsonde selbst oder der Verlust der einzelnen Aminosäureseitenkettenfunktionen zum Aktivitätsverlust führt.

Drastische Strukturveränderungen von ortsspezifisch veränderten Par10-Varianten wurden zuvor schon für eine Reihe von Par10-Einzelmutanten beschrieben [108], welche durch eine erhöhte proteolytische Sensitivität für Untersuchungen nicht zugänglich waren. Mit den eigenen derivatisierten Par10-Varianten liegen, wenn auch mehrheitlich katalytisch inaktiv, dennoch Untersuchungsobjekte vor, an denen sich Struktur-/Funktionsbeziehungen einzelner Aminosäurereste bei der Substratbindung und -umsetzung beobachten lassen.

Die erzeugten Par10-Derivate könnten in weiterführenden Studien genauer auf ihre strukturellen, funktionellen und mit Liganden interagierenden Eigenschaften hin untersucht werden. Im Rahmen weiterer Testverfahren wäre die Suche nach natürlichen Substraten oder neuen spezifischen Inhibitoren für Par10 denkbar. Dabei ist der Einsatz substratähnlicher Quencher-moleküle wie 2-Iod-*N*-(alanyl-alanyl-prolyl-phenyl-paranitroanilid)acetamid, welche kovalent an Par10 binden können, oder nicht kovalent bindender Quencher-moleküle denkbar. Auch FRET-Experimente mit Dansyl-,

EDANS (5-[2-Aminoethylamino]naphthalin-1-sulfonsäure), MCA (7-Amino-4-methyl-cumarin oder ACC (7-Amino-4-carbamoylmethyl-cumarin) als Fluoreszenzdonatoren und EDDnp (N-[2,4-Dinitrophenyl]-ethylendiamin), 4-Nitrophenylalanin oder Cumarin 153 als Fluoreszenzakzeptoren sind möglich. Denkbar wäre auch der Einsatz eines FRET-Paares bestehend aus 6-Carboxyfluorescein (Donator) und 5-Carboxyrhodamin (Akzeptor) [290, 291].

Dennoch scheinen eine Verbesserung der Synthese, der Zwischen- und Endproduktreinigung und insbesondere der Rückfaltungsschritte der markierten Par10-Varianten erforderlich. So blieb ungeklärt, wie stark unzulängliche Synthese- und Rückfaltungsschritte zur (teilweisen) Inaktivierung der Par10-Derivate beigetragen haben. Um dies zu überprüfen sollten auch Aminosäuren, welche sich außerhalb der Substratbindungstasche befinden, gegen Dap(Abz) ausgetauscht und die PPIase-Aktivität dieser Par10-Varianten überprüft werden. Auch die Wahl alternativer Ligationstellen, neben den vorgeschlagenen, sollte in Betracht gezogen werden. Die Synthese kleinerer SPPS-Segmente sollte die Integrität dieser Par10-Abschnitte erhöhen und zusammen mit längeren, rekombinant generierten Peptiden zu Par10-Varianten mit einer wtPar10 ähnlichen Sekundärstruktur führen.

5.3.3 pK_S -Werte der Sulfhydrylseitenketten von Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸

Die Funktion von Cysteinseitenketten in Proteinen wird durch ihre Position innerhalb der Proteinstruktur und ihre Wechselwirkungen mit umgebenden Aminosäureresten bestimmt. Cysteinseitenketten sind durch die Bildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken häufig entscheidend für die räumliche und funktionelle Struktur eines Proteins. Freie, nicht disulfidverbrückte Cysteinseitenketten im Proteininneren sind vielfach die katalytisch aktiven Seitenketten in Enzymen. In diesen Fällen weichen die funktionalen pK_S -Werte der Sulfhydrylgruppen oft erheblich vom intrinsischen pK_S -Wert der freien Aminosäure Cystein ab.

Die funktionelle Bedeutung von Cys⁴⁰ in *E. coli* Par10 und der entsprechenden Cysteine in weiteren Parvulinen (Cys¹¹³ in *hPin1*, Cys⁷⁰ in *Pin1At*, Cys¹²⁰ in *Ess1*) wird seit langem diskutiert [43, 77, 107, 286]. Insbesondere katalytisch inaktive Cysteinmutanten und eine hohe Reaktivität von Cys⁴⁰ gegenüber thiolreaktiven Substanzen waren hierfür der Grund. Der Protonierungszustand von Cysteinseitenketten wird durch den tatsächlichen pK_S -Wert der Sulfhydrylgruppe festgelegt und wurde für Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸ erstmals in dieser Arbeit experimentell bestimmt (Abschnitt 4.7). Zusammen mit weiteren Ergebnissen dieser Arbeit werden im Folgenden mögliche strukturelle Gründe für die gefundenen niedrigen Cys⁴⁰- und Cys⁶⁸- pK_S -Werte diskutiert und mögliche Konsequenzen für die katalytische Aktivität von Par10 abgeleitet. Auf Cys⁶⁸ wird aufgrund seiner untergeordneten Bedeutung für die Parvulinstruktur und Enzymaktivität weniger intensiv eingegangen.

Beide Cysteinreste in Par10 sind oberflächenexponiert, lösungsmittelzugänglich und reaktiv gegenüber Alkylierungs- und anderen Modifizierungsreagenzien [99]. Dies ermöglichte die Verwendung zweier spektroskopischer Methoden zur pK_S -Wertbestimmung von Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸, ohne die dreidimensionale Struktur der Parvuline aufzulösen, und den Vergleich mit den ebenfalls bestimmten pK_S -Werten kürzerer unstrukturierter Par10-Segmente (Tab. 4-3). Die starke Abhängigkeit des pK_S -Wertes von seiner unmittelbaren Umgebung zeigt sich in den großen pK_S -Wertunterschieden der Sulfhydrylgruppe in der freien Aminosäure Cystein ($pK_S \sim 8,3$), in kurzen unstrukturierten Peptiden ($pK_S \sim 8,1$) oder in gefalteten Proteinen mit definierter Raumstruktur ($pK_S \sim 5,2$). Die „abgesenkten“ pK_S -Werte von Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸ des Volllängen-Par10 lagen um drei pH-Einheiten niedriger als in den untersuchten kürzeren unstrukturierten Parvulinsegmenten beziehungsweise der freien Cystein-aminosäure.

Tab. 5-1. Ausgewählte Beispiele gemessener pK_S -Werte von Cysteinseitenketten in Proteinen. Die angegebenen pK_S -Werte wurden für gefaltete Proteine unter verschiedenen Bedingungen und mittels unterschiedlicher Methoden experimentell bestimmt. Von den 25 in [292] aufgelisteten Cysteinseitenketten wurden nur solche mit einem $pK_S(\text{Cys}) < 7,0$ untenstehend wiedergegeben. Mit Ausnahme der *humanen* Kreatinkinase fungieren alle gelisteten Cysteinseitenketten als Nukleophile während der Enzymreaktion.

Protein (Aminosäure-einheiten) [Referenz]	pK_S -Wert (Cys) ¹	Cys-Seitenkettenposition	Mechanismus der Thiolatstabilisierung / Enzymfunktion
Ficain/Ficin (~200 AS ²) [293]	2,49	Cys ²⁵	(Cys)-S ⁻ /(His)Im ⁺ H Ionenpaar / Peptidbindungsspaltung
Caricain (216 AS) [293]	2,88	Cys ²⁵	
Papain (212 AS) [293]	3,32	Cys ²⁵	
DsbA (<i>disulfid bond A</i>) (189 AS) [294]	3,5	Cys ³⁰	α -Helix-Makrodipol / Disulfidbrückenbildung
Cathepsin B (254 AS) [295]	3,6	Cys ²⁹	(Cys)-S ⁻ /(His)Im ⁺ H-Ionenpaar und α -Helix-Makrodipol / Peptidbindungsspaltung
GST (Glutathion-S-Transferase) (209 AS) [296]	4,2	Cys ⁴⁷	(Cys)-S ⁻ /(Lys)-NH ₃ ⁺ Ionenpaar und Wasserstoffbrücken / Übertrag. von Glutathion auf Xenobiotika
PDI <i>a</i> (Protein Disulfid Isomerase A) (491 AS) [297]	4,5	Cys ³⁶	(Cys)-S ⁻ /(His)Im ⁺ H Ionenpaar und α -Helix-Makrodipol / Disulfidbrückenbildung
<i>humane</i> Kreatinkinase (380 AS) [298]	5,62	Cys ²⁸²	Wasserstoffbrücken / Phosphorylierung von Kreatin
<i>humanes</i> Thioredoxin (104 AS) [299]	6,3	Cys ³²	Wasserstoffbrücken / Reduzierung von Disulfidbrücken

¹ Der durchschnittliche $pK_S(\text{Cys})$ -Wert für alle in [292] zusammengetragenen Sulfhydrylgruppen betrug $6,8 \pm 2,7$ (für 25 Cysteinseitenketten in 23 Proteinen). ² Keine genauere Angabe vorhanden. Im⁺H = Imidazol.

Damit entsprachen die eigenen mikroskopischen pK_S -Werte in den Volllängen-Par10 ($pK_S(\text{Cys}^{40}) = 5,50 \pm 0,13$ und $pK_S(\text{Cys}^{68}) = 5,44 \pm 0,43$) einigen der 25 experimentell bestimmten pK_S -Werte für Sulfhydrylgruppen anderer Proteine, welche GRIMSLEY *et al.* in einem Übersichtsartikel zusammengetragen haben [292]. Mit einem durchschnittlichen pK_S -Wert von $6,8 \pm 2,7$ lagen einzelne $pK_S(\text{Cys})$ -Werte zum Teil deutlich unterhalb von 5,0. Interessanterweise befinden sich die Sulfhydryl-

gruppen mit stark abgesenkten pK_S -Werten stets in der Nähe der *N*-Termini. Tendenziell ist der pK_S -Wert umso kleiner, je früher die entsprechende Cysteinseitenkette in der Aminosäuresequenz des Proteins zu finden ist (mit Ausnahme von Cys²⁸² der *humanen* Kreatinkinase, siehe Tab. 5-1,). Allerdings wurden überwiegend die pK_S -Werte von Cysteinseitenketten betrachtet, welche vermutlich direkt an einer Substratbindung und/oder –umsetzung beteiligt sind. Die pK_S -Werte von zusätzlich vorhandenen Sulfhydrylgruppen in den in Tab. 5-1 aufgeführten Proteinen wurden meist nicht bestimmt.

Unter physiologischen pH-Bedingungen (pH 7,4) liegen also beide Cysteinseitenketten im Par10 deprotoniert als Thiolatanion vor. Die pK_S -Werte für Cys⁴⁰ in den Peptiden Par10 Ac-29-43-NH₂, Par10 Ac-29-48-NH₂ und Par10 H-1-67-OH (Tab. 4-3) stimmen mit den in Lehrbüchern tabellierten pK_S -Werten für die Seitenkette der freien Aminosäure Cystein (8,37) [9] beziehungsweise der Cysteinseitenkette im Pentapeptid Ac-AACAA-NH₂ (8,55 ± 0,03) [217] überein. Alle untersuchten verkürzten Par10-Peptide zeigten demnach nur sehr geringe Verschiebungen des intrinsischen pK_S -Wertes ihrer Sulfhydrylgruppen, welche durch das Fehlen der nativen Sekundärstrukturausbildung dieser Peptide erklärt werden. Das Absenken der pK_S -Werte in Par10 C40A und Par10 C68A muss demnach auf strukturellen Effekten und auf einer Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen funktionellen Gruppen innerhalb der korrekt ausgebildeten Par10-Raumstruktur beruhen.

Generell ist die Stabilisierung einer negativ geladenen Seitenkette durch die Ausbildung einer Salzbrücke mit einer positiven Ladung möglich. Derart niedrige pK_S -Werte der Sulfhydrylgruppe sind folglich oftmals auf die unmittelbare Nähe zu positiv geladenen Seitenketten anderer Aminosäuren oder auf die Anwesenheit von Metallionen zurückzuführen. So verfügen alle heute bekannten Peroxi-reduktasen (AhpC eingeschlossen) über eine hoch konservierte Argininseitenkette, deren positiv geladene Guanidinogruppe den pK_S -Wert der Sulfhydrylgruppe des peroxidaseaktiven Cysteins stark absenkt und damit die Thiolatform stabilisiert [112]. In der durch NMR-Experimente gelösten Par10-Struktur (PDB-ID: 1JNT) befindet sich keine basische Seitenkette innerhalb der Reichweite für eine Salzbrücke (5 Å-Radius [300]) mit dem an der Proteinoberfläche gelegenen Cys⁴⁰. Gegenwärtig ist auch keine Parvulinstruktur mit einem durch Cysteinseitenketten koordinierten Metallkation bekannt. Eine Stabilisierung der negativen Ladung durch eine Metallionenkomplexierung, wie sie beispielsweise in Zinkfingermotiven vorkommt [301, 302], erscheint demnach gleichermaßen unmöglich. Ein stabiles Thiolat-Imidazolium-Ionenpaar, wie man es in einigen Cysteinproteasen findet ([303] und Tab. 5-1), wird ebenso ausgeschlossen. Wie NMR-Studien an PrsA aus *S. aureus* [65] und Röntgenstrukturanalysen von *hPar14* [284] ergaben, sind die in Frage kommenden Histidinseitenketten unter physiologischen Bedingungen ungeladen und möglicherweise an dem zuvor beschriebenen Wasserstoffbrücken-Ladungsübertragungssystem beteiligt (Abschnitt 5.3.1).

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung zu einer ionisierten Sulfhydrylgruppe deren pK_S -Wert um mehr als eine pH-Einheit absenken kann [304]. Dennoch ist nicht davon auszugehen, dass eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung mit His⁸ für den gefundenen stark erniedrigten pK_S -Wert der Cys⁴⁰-Sulfhydrylgruppe verantwortlich ist. Es scheint wahrscheinlicher, dass der niedrige pK_S -Wert von zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Schwefelatom von Cys⁴⁰ und dem Amidproton von Ser⁴² und zwischen dem Schwefelatom von Cys⁴⁰ und den Hydroxygruppen der Seitenketten von Ser³⁸ und/oder Ser⁴² verursacht wird.

Im Vergleich zu Sauerstoff hat Schwefel eine geringere Elektronegativität und aufgrund seiner zusätzlichen Elektronenschale einen größeren Atomradius. Beide Eigenschaften sollten die Fähigkeit eines Cysteinthiols als Wasserstoffbrückendonator (SH \cdots O) und eines Cysteinthiolats als Wasserstoffbrückenakzeptor (OH \cdots S) zu fungieren, reduzieren. Untersuchungen zeigen aber, dass derartige Bindungen unter Beteiligung eines Schwefelatoms länger als zum Beispiel NH \cdots O- und OH \cdots N-Bindungen sein können [305, 306] und dass das Schwefelatom einen durchaus starken Wasserstoffbrückenakzeptor darstellen kann [307].

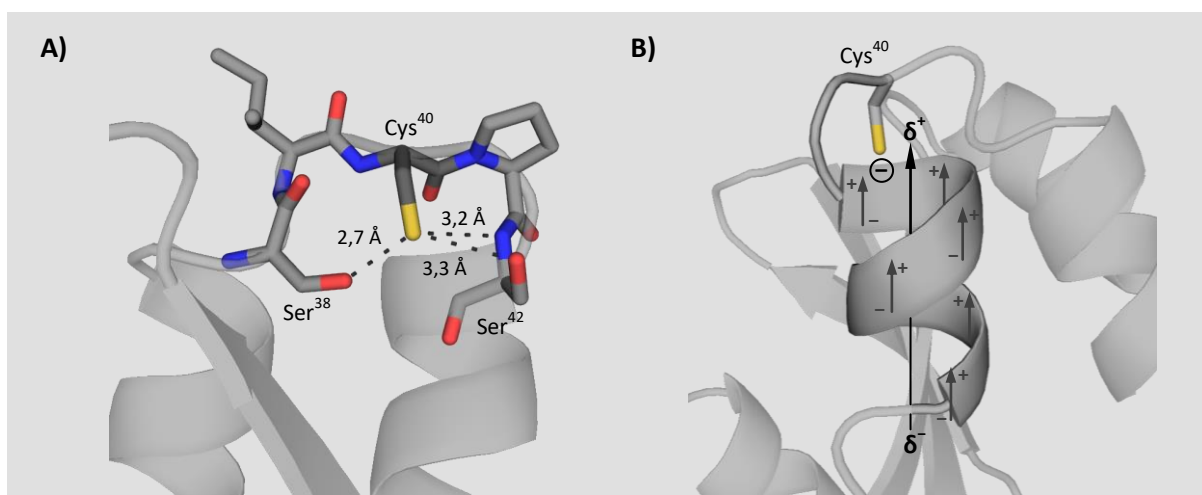


Abb. 5-6. Modell der Stabilisierung des Thiolatanions von Cys⁴⁰ in wtPar10. **A)** Cys⁴⁰-loop zwischen α -Helix 2 und α -Helix 3. Die gestrichelten Linien repräsentieren die vermuteten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem deprotonierten S-Atom des Cys⁴⁰ und den Seitenketten von Ser³⁸ (2,7 Å) und Ser⁴² (3,3 Å) und dem Rückgratamidproton des Ser⁴² (3,2 Å). Nach eigener Auffassung sind die Wasserstoffbrücken zusammen mit einem Helix-Makrodipoleffekt für die Stabilisierung der negativ geladenen Cys⁴⁰-Seitenkette verantwortlich. **B)** Schematische Darstellung des Helix-Makrodipoleffekts [308, 309]. Die negative Ladung des S-Atoms (\ominus) wird durch die Wechselwirkung mit dem partiell positiv geladenen N-Terminus der α -Helix 3 stabilisiert. Das Dipolmoment der Helix ist durch einen langen Vektorpfeil gekennzeichnet mit einem negativ geladenen C- (δ^-) und einem positiv geladenen N-terminalen Ende (δ^+). Der Helix-Makrodipol baut sich aus der Summe der Mikro-dipole einer jeden Peptidbindungseinheit auf (kleine Vektorpfeile). Die positiven bzw. negativen Partialladungen der Amino- und Carbonylbestandteile jeder Peptidbindung sind durch + bzw. - gekennzeichnet. Die Carbonylsauerstoffatome (-) sind parallel zur Helix angeordnet und zeigen zum C-Terminus, die über Wasserstoffbrücken mit den Carbonylsauerstoffatomen verbundenen Amidstickstoffatome (+) zeigen zum N-Terminus der Helix. (Farbcode der Stabdarstellung: Grau = C-Atome, Blau = N-Atome, Rot = O-Atome, Gelb = S-Atome; PDB-ID: 1JNT, Darstellung: PyMol 1.4.1)

Die Abstände zwischen den beteiligten schweren Atomen liegen alle deutlich unterhalb der maximalen Bindungslänge von 4 Å für eine Wasserstoffbrückenbindung [306]. Es wird angenommen, dass ein solches Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen das α -Helix 2-Schleife- α -Helix 3-Motiv in Par10 und anderen Parvulinen auf der gegenüberliegenden Seite der postulierten Substratbindungstasche in starkem Maße stabilisieren kann (Abb. 5-6 A). Das Fehlen dieser Wasserstoffbrückenbindungen würde ebenfalls zu strukturellen Veränderungen in der Proteinstruktur führen und gäbe auch eine Erklärung für die erhöhte Sensitivität der Par10 C40A Mutante gegenüber dem tryptischen Verdau und den veränderten CD-Spektren verglichen mit wtPar10. Ortsgerichtete Mutagenesen von Ser³⁸ und Ser⁴² zusammen mit weiteren pH-Abhängigkeitsmessungen sollten Aussagen zulassen, ob und in welchem Ausmaß die Serinseitenketten den Cys⁴⁰ pK_S-Wert herabsetzen.

Helix 3 in Par10 und die analogen Helices anderer Parvulinvertreter sind ein gemeinsames Strukturmotiv aller in der RCSB Proteindatenbank hinterlegten Parvulinstrukturen und könnten selbst einen Betrag zur Absenkung des pK_S-Werts von Cys⁴⁰ leisten. Wie jede Helix erzeugen sie ein übergreifendes Dipolmoment, einen Helix-Makrodipoleffekt, mit dem sie eine negative Ladung, meist von einer Cystein- oder Serinseitenkette stammend, stabilisieren können [308, 309]. Ein Helix-Makrodipoleffekt (auch α -Helixdipol) baut sich aus der Summe der Mikrodipoleffekte der einzelnen polaren Peptideinheiten (= Mikrodipole, mit einer positiven Partiaalladung am Amidwasserstoff und einer negativen Partiaalladung am Carbonylsauerstoff), aus denen eine Helix gebildet wird, auf. Da sich die aufsummierte positive Ladung am N-Terminus der Helix befindet, wird eine sich in Nachbarschaft dazu befindende negative Ladung (in Par10 die negative Ladung des Cys⁴⁰) durch diesen Effekt stabilisiert (Abb. 5-6 B, für Par10 Cys⁶⁸ siehe Seite 112 ff.). Roos *et al.* haben die pK_S-Wertverschiebung für N-terminale Cysteine in α - und 3_{10} -Helices in Abhängigkeit von der Helixlänge untersucht und fanden, dass sogar Helices von nur drei Aminosäureresten eine pK_S-Werterniedrigung von 1,3 pH-Einheiten in wässrigen Systemen bewirken können [310].

Solche „*active site helices*“ mit einer für die katalytische Funktion wichtigen Cysteinseitenkette, bei denen Helix-Makrodipoleffekte entscheidend für die Stabilisierung der Thiolatanionen sind, findet man beispielsweise in Papain, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Rhodanase und Thioredoxin [309, 311-313]. In den genannten Beispielen verfügen die katalytisch aktiven Cysteinseitenketten über nukleophile Eigenschaften und sind direkt an der Substratumsetzung beteiligt. Der Umstand, dass Cys⁴⁰ in wtPar10 von einer „helixbrechenden“ Prolinseitenkette gefolgt wird, schließt einen stabilisierenden Helix-Makrodipoleffekt nicht aus, wie das Beispiel des gut untersuchten DsbA aus *E. coli* belegt [314]. In DsbA sind Cys³⁰ und Pro³¹ wie Cys⁴⁰ und Pro⁴¹ in Par10 Bestandteil einer Proteinschleife (*loop*). Gleichzeitig schirmt der Prolylring in beiden Proteinen die negative Ladung der Sulfhydrylseitenkette gegenüber dem umgebenden Medium ab.

Die gefundenen pK_s -Werte in einem Zusammenhang mit einem möglichen Katalysemechanismus zu bringen ist schwierig und mit den eigenen Daten nur sehr vage möglich. Damit die Isomerisierung zwischen der *trans*- und *cis*-Konformation einer sekundären und tertiären Peptidbindung stattfinden kann, muss der partielle Doppelbindungscharakter, genauer die π -Elektronenwechselwirkung zwischen dem p-Orbital des Carbonylkohlenstoffs und dem freien Elektronenpaar des Amidstickstoffs zeitweilig aufgehoben sein.

Möglich sind verschiedene Katalysevarianten sowohl kovalenter als auch ionischer Art [315]. Beispielsweise könnte sich ein enzymgebundenes Nukleophil an den Carbonylkohlenstoff addieren oder ein elektrophiler Angriff des Enzyms auf das freie Elektronenpaar des Amidstickstoffatoms stattfinden. Auch eine intra- oder intermolekulare Protonierung des Amidstickstoffs ist denkbar. Bei einer nicht-kovalenten Katalyse wären allein die Bindung und Stabilisierung des orthogonalen Übergangszustandes ($\omega = 90^\circ$) durch die PPIase für die Herabsetzung der Aktivierungsenergie für die *cis/trans*-Interkonversion verantwortlich. Die für die Distorsion des Substrates notwendige Energie liefert in diesem Fall der Transfer des Substrats vom wässrigen Medium in das hydrophobe aktive Zentrum des Enzyms [316, 317].

Aufgrund seiner Lage gegenüber der Substratbindungstasche galt die Cys⁴⁰-Seitenkette als geeignet, das Carbonyl-C-Atom einer Peptidyl-Prolylbindung nukleophil anzugreifen, dessen sp^2 -Hybridisierung und damit den Doppelbindungscharakter der Prolylbindung aufzuheben und somit die *cis/trans*-Isomerisierung zu ermöglichen [99]. Unterstützt wurde diese Vermutung durch die Beobachtung, dass sich ein mit *hPin1* kokristallisiertes Ala-Pro-Dipeptid in sehr guter Position für einen nukleophilen Angriff befindet [43]. Für RANGANATHAN *et al.* bilden die Seitenketten von His⁵⁹, Cys¹¹³, Ser¹⁵⁴ und His¹⁵⁷ in *hPin1* ein funktionelles Cluster, in dem Cys¹¹³ durch His¹⁵⁷ deprotoniert wird und als ein katalytisch aktives Nukleophil wirkt. Sie stützten ihre Vermutung auf eine um den Faktor 20 herabgesetzte PPIase-Aktivität für *hPin1* C113S und eine 123-fach geringere Enzymaktivität für die C113A-Mutante für das Substrat Suc-AEPF-*pNA*. Cys \rightarrow Ala-Austausche und die Modifizierung der Cysteinthiolgruppen in verschiedenen Cyps und FKBP's verringerten die Enzymaktivitäten nur geringfügig und schließen einen kovalenten Mechanismus für diese zwei PPIase-Familien allerdings aus [318-320].

Ein Modell für eine nicht-kovalente Katalyse wurde von BEHRISIN und seinen Kollegen vorgestellt. Es geht von einer Distorsion der Prolylbindung ohne einen nukleophilen Angriff aus und ist mit den eigenen Ergebnissen vereinbar [107]. BEHRISIN *et al.* nehmen an, dass eine von der deprotonierten Cys¹¹³-Seitenkette stammende negative Ladung neben dem Carbonylsauerstoff den Doppelbindungscharakter der Prolylbindung destabilisiert und somit eine *cis/trans*-Isomerisierung ohne Ausbildung eines kovalenten Intermediats erlaubt (Abb. 5-7 A). Umgekehrt ist der Doppelbindungscharakter der Prolylbindung am größten, wenn bei einer gleichzeitigen positiven Ladung am sp^2 -hybridisierten Amidstickstoff das elektronegativere Sauerstoffatom sp^3 -hybridisiert ist und eine negative Ladung

trägt. Das freie Elektronenpaar wird demnach in Richtung Carbonylkohlenstoffatom verschoben. Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoffatom der Prolylbindung und dem Wasserstoffatom einer protonierten Cysteinseitenkette würde diese Form stabilisieren (Abb. 5-7 B). Auch die Erkenntnis, dass andere Parvuline, beispielsweise *hPar14*, eine Aspartatseitenkette anstelle der Cys⁴⁰-Seitenkette aufweisen, stützt diese Hypothese [106].

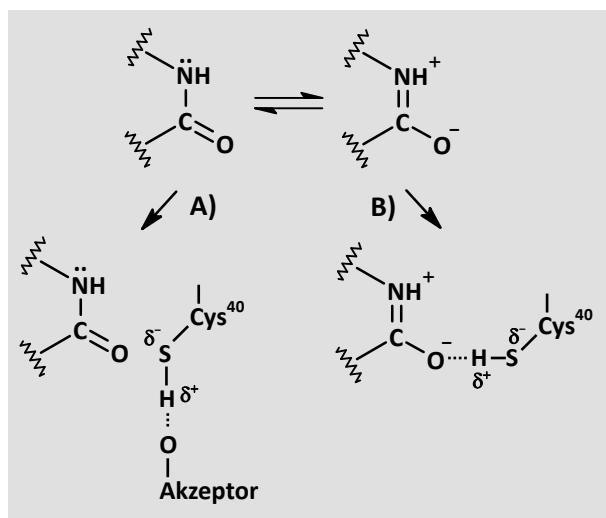


Abb. 5-7. Modell für eine nicht-kovalente Katalyse durch Par10. **A)** Schwächung des Doppelbindungscharakters der Peptid- (oder Prolyl-)bindung durch eine partielle (oder vollständige) negative Ladung in unmittelbarer Umgebung zum Carbonylsauerstoff. **B)** Stärkung des Doppelbindungscharakters durch Stabilisierung des negativ geladenen Carbonylsauerstoffatoms, indem Cys⁴⁰ als Wasserstoffbrückendonator fungiert. Abbildung verändert nach [107].

Bei einem Ersatz von Cys¹¹³ im *hPin1* durch Asp, Ser beziehungsweise Asn wurde eine resultierende Restaktivität von einem Sechstel für die C113D-Mutante, von einem Fünftel für die C113S-Mutante und eine vollständige Inaktivierung für die C113N-Variante gefunden [107]. Mit der Begründung, dass eine (ionisierte) Serinseitenkette (pK_S -Wert = 13) generell ein besseres Nukleophil als eine Aspartatseitenkette darstellt, scheint für diese Autoren ein nukleophiler Angriff auf die *cis/trans*-isomerisierende Prolylbindung ausgeschlossen. Die Beobachtung, dass die kovalente Cys⁴⁰-Modifizierung durch Juglon eine schnellere Kinetik als die nachfolgende Inaktivierung von Par10 zeigt, spricht ebenfalls gegen einen kovalenten Mechanismus [99].

Zusammen mit der Feststellung, dass das Cys⁴⁰ in Par10 einen in den sauren pH-Bereich verschobenen pK_S -Wert aufweist und demzufolge unter physiologischen Bedingungen wie eine Asparaginsäureseitenkette deprotoniert vorliegt, scheint eine negative Ladung in dieser Position für die Enzymfunktion beziehungsweise Enzymstruktur von *hPin1* und Par10 wichtiger zu sein als ein reaktives Nukleophil. Diese Vermutung bestätigt möglicherweise auch eine Ess1 C120R-Variante aus *S. cerevisiae*, welche nahezu inaktiv ist [321]. BEHRISIN *et al.* berechneten zudem einen auffallend niedrigen pK_S -Wert für Cys¹¹³, waren aber aufgrund der geringen Löslichkeit und auftretender Aggregation von *hPin1* bei höheren Proteinkonzentrationen nicht in der Lage, diesen experimentell zu bestimmen [107] (solche Hindernisse wurden für Par10 nicht beobachtet). Sie vermuten, dass His⁵⁹ durch eine Wasserstoffbrückenbindung zu Cys¹¹³ die Sulfhydrylseitenkette im ionisierten Zustand hält.

Der pK_S -Wert von Cys⁶⁸, welches vermeintlich nicht an der Katalyse beteiligt ist, war ebenfalls stark herabgesetzt und stützt damit die Beobachtung, dass der Inhibitor Juglon über eine MICHAEL-Addition an beide Par10-Cysteine kovalent bindet [99]. Der pK_S -Wert von 5,01, welcher durch die direkte spektroskopische Methode bei 240 nm bestimmt wurde, weicht um mehr als 0,8 pH-Einheiten vom pK_S -Wert ab, welcher mit der DTNB-Methode bestimmt worden ist (5,87; Tab. 4-3). Diese Differenz wurde für Cys⁴⁰ nicht beobachtet. Sterische Behinderungen bei der Reaktion von DTNB mit Cys⁶⁸ wie auch mit Cys⁴⁰ können allerdings ausgeschlossen werden. Für Par10 C40A wurde ein deutlich kleinerer $\Delta\epsilon_{240}$ -Wert als für Par10 C68A oder eine freien Sulfhydrylgruppe detektiert (Abschnitt 4.7). Hierfür wird die teilweise Oxidation der freien Thiolatgruppe von Cys⁶⁸ durch Luftsauerstoff während des Pufferaustauschs (DTT-Entfernung) als Ursache vermutet. Thiolate sind gegenüber Sauerstoff reaktiver als ihre entsprechenden Thiole und Par10 C40A schien einer solchen Luftoxidation stärker zu unterliegen als Par10 C68A.

Wie im Fall des Cys⁴⁰ befinden sich keine Lysin- oder Argininseitenketten in unmittelbarer Umgebung zu Cys⁶⁸, um eine negative Ladung zu stabilisieren. Zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Protonen von Ser⁶⁷ und Thr⁷⁴ zum deprotonierten Schwefel von Cys⁶⁸ stabilisieren mutmaßlich diese ionisierte Cysteinseitenkette in wtPar10. Der Abstand zwischen dem Schwefelatom und dem Sauerstoffatom der Ser⁶⁷- und Thr⁷⁴-Hydroxygruppen beträgt 4 Å beziehungsweise 3 Å, ermittelt aus den Koordinaten der Lösungsstruktur von Par10 (PDB-ID: 1JNT).

Es liegen nur wenige vergleichbare experimentelle Daten über Cystein- pK_S -Werte vor. Nur 20 von den mehr als 1400 Einträgen in der *Protein pK_a Database* (PPD [322]; Stand 1. Juni 2015) geben Werte für Cysteinseitenketten wieder. Der durchschnittliche pK_S -Wert liegt mit $6,8 \pm 2,7$ deutlich niedriger als der bestimmte Wert für das Ac-AACAA-NH₂-Pentapeptid ($8,55 \pm 0,03$). Diese kleine Datenmenge erlaubt keinen Rückschluss darauf, ob Cysteine auf der Proteinoberfläche, wie beispielsweise Cys⁴⁰ und Cys⁶⁸ in wtPar10, generell einen abgesenkten pK_S -Wert besitzen. Allerdings ergaben Berechnungen aus 15000 in der RCSB Proteindatenbank und 6500 in der ModBase Datenbank hinterlegten Strukturen, dass Cysteinseitenketten, die auf der Proteinoberfläche exponiert auftreten, einen um durchschnittlich zwei pH-Einheiten niedrigeren pK_S -Wert aufweisen als Cysteinseitenketten, welche „abgeschirmt“ im Proteininneren liegen [323]. Die Cysteinseitenkette gehört in ihrer ungeladenen Form, neben den ungeladenen Seitenketten von Histidin und Tyrosin, aufgrund des hydrophoben Effekts zu der am häufigsten im Inneren von Proteinen lokalisierten ionisierbaren Aminosäureseitenkette. Für auf Proteinoberflächen exponierte und dem wässrigen Milieu zugängliche Cysteinreste scheinen dagegen ausschließlich die deprotonierten Formen vorherrschend zu sein. Zu den Enzymen, bei denen die jeweilige katalytische Aktivität auf eine Cysteinseitenkette mit einem nachweislich stark herabgesetzten pK_S -Wert im Proteininneren zurückgeht ($pK_S(\text{SH}) < 6$), gehören die an anderen Stellen dieser Arbeit bereits erwähnten Cysteinproteasen [324], Peroxi-

reduktasen [325] und Inteine [326]. Bemerkenswerterweise wird die $pK_S(\text{SH})$ -Wertabsenkung des Cys²⁸³ der humanen Muskel-Kreatinkinase auf $5,7 \pm 0,1$ durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb eines konservierten CPS-Motivs (Cys²⁸³-Pro²⁸⁴-Ser²⁸⁵) erklärt [327], und damit durch ein in wtPar10 vorkommendes identisches Sequenz- und Strukturmotiv (Cys⁴⁰-Pro⁴¹-Ser⁴²).

Eine alternative Methode zu den eigenen verwendeten Techniken stellt die pK_S -Wertbestimmung von Cysteinseitenketten über die Bindungsenthalpieänderung während der Iodacetamid-modifizierung der Cysteinseitenketten via ITC dar [328]. Die pH-Wert-abhängige Ionisierung der Sulfhydrylgruppe lässt sich auch mittels 1D ¹H-NMR-Spektroskopie oder anhand von ¹³C-HSQC-Spektren verfolgen, indem die chemischen Verschiebungen der C α - und C β -Protonen beziehungsweise des ¹³C β -Kohlenstoffatoms des Cysteinrests detektiert werden [329, 330]. Eine direkte Betrachtung des Protonierungszustandes der Cysteinseitenketten mittels NMR-Techniken ist aufgrund des Fehlens eines geeigneten sensitiven Schwefelisotops nicht möglich. ³³S als NMR-aktives Schwefelnuklid besitzt einen ungünstigen Kernspin von $3/2 \cdot h \cdot 2\pi$ und ein zu geringes Kernmagnetisches Moment von $0,64 \mu_{\text{mag}}$ [331]. NMR-Messungen mit ⁷⁷Se als Schwefelsurrogat in Kombination mit theoretischen Berechnungen stellen erst in jüngster Zeit einen neuen Ansatz dar, um den Ladungszustand und die Reaktivität von Cysteinseitenketten in Abhängigkeit ihrer Umgebung näher untersuchen zu können [332].

pH-Abhängigkeit der wtPar10 katalysierten *cis/trans*-Isomerisierung

Studien zur pH-Wertabhängigkeit der Spezifitätskonstante $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1}$ wurden für hPin1 bereits zuvor in anderen Arbeitskreisen vorgenommen. RANGANATHAN und Kollegen verwendeten zwei nicht-phosphorylierte Tetrapeptide und damit für hPin1 weniger gut geeignete Peptide, da hPin1 eine ausgeprägte Spezifität für pSer/pThr-Pro enthaltende Substrate aufweist [43]. Sie ermittelten ein glockenförmiges pH-Profil mit einer maximalen Aktivität zwischen pH 6,0 und 7,0 und bestimmten einen apparenten $pK_S(1)$ von 5,6 für den aufsteigenden, im Sauren liegenden Ast, und einen apparenten $pK_S(2)$ von 7,5 für den absteigenden basischen Ast. Im Unterschied dazu erhielten SCHUTKOWSKI *et al.* eine abweichende Kurve für das Substrat Ac-ApSPF-pNA [333], welche dem pH-Katalysegeschwindigkeitsprofil der eigenen Untersuchungen für wtPar10 entspricht, wie es in Abb. 4-18 A gezeigt ist. Diese Kurve zeigte einen Anstieg um mehrere Größenordnungen im Bereich von pH 5,0 bis 6,5 für die $\log(k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1})_{\text{obs}}/\text{pH}$ -Wert-Auftragung mit einem breiten Plateau im alkalischen Bereich (pH 6,5-9,5). Obwohl die Kurve nur einen ansteigenden Ast aufwies, wurde ein Modell mit zwei für die Enzymreaktion relevanten Dissoziationsschritten angenommen und je ein katalytisch wichtiger Deprotonierungsschritt für das phosphorylierte Substrat und einer für das Enzym vermutet. Die Autoren berechneten für beide Dissoziationsschritte ähnliche pK_S -Werte von $5,7 \pm 0,7$ [333].

Beide genannten Arbeitsgruppen verwendeten proteasegekoppelte Aktivitätstests, um die Abhängigkeit der wtPar10-Aktivität von der Protonenkonzentration zu bestimmen. Der in dieser Arbeit

verwendete ungekoppelte, proteasefreie Messansatz vermied mögliche Artefakte, welche zum Beispiel durch den proteolytischen Abbau von wtPar10 oder des Substrates verursacht werden können. So wurde auch eine gegenseitige Beeinflussung der pH-abhängigen Proteolyse- und PPlase-Aktivität ausgeschlossen. Da wtPar10 eine Substratspezifität für unphosphorylierte Peptidsubstrate aufweist, konnte ein Substrat verwendet werden, welches keine ionisierbaren Aminosäureseitenketten besaß, sodass Dissoziationsschritte, ausgenommen der des wtPar10, ebenfalls ausgeschlossen werden konnten.

Das in Abb. 4-18 A bestimmte pH-Profil zeigt einen ansteigenden Kurvenverlauf von pH 2,6-6,0 und ein konstantes Plateau von pH 6,0-9,8. Der apparente pK_5 -Wert für eine vermutete deprotonierbare Gruppe wurde mit $5,48 \pm 0,07$ durch nichtlineare Kurvenanpassung der Messpunkte basierend auf einem Modell für einen einfachen Dissoziationsschritt bestimmt. Ionisierbare Aminosäureseitenketten, welche einen pK_5 -Wert in diesem Bereich aufweisen, sind häufig Histidin- oder Cysteinseitenketten mit stark abgesenkten pK_5 -Werten [334]. SCHUTKOWSKI und Mitarbeiter schlussfolgerten aus korrespondierenden Experimenten mit *hPin1*, dass His⁵⁹ (His⁸ in wtPar10) für den Kurvenverlauf des pH-Profiles verantwortlich ist. Nachfolgende Studien belegten allerdings, dass His⁵⁹ für die PPlase-Aktivität nicht essentiell ist und nicht direkt mit dem Substrat interagiert, sondern die PPlase-Domänen in Parvulinen, wie bereits erwähnt, maßgeblich durch eine über Wasserstoffbrücken verbundene Tetrade (Cys⁴⁰-His⁸-His⁸⁴-Thr⁷⁹ in Par10 bzw. Cys¹¹³-His⁵⁹-His¹⁵⁷-Thr¹⁵² in *hPin1*) strukturell stabilisiert (Abb. 5-5) [107, 284, 286]. Aufgrund seines stark abgesenkten pK_5 -Wertes gilt Cys⁴⁰ als der geeignetere Kandidat, welcher für die pH-Abhängigkeit der PPlase-Aktivität verantwortlich ist.

In dieser Arbeit wird, nach eigenem Kenntnisstand erstmalig, ein experimentell ermittelter pK_5 -Wert eines sich nahe dem aktiven Zentrum befindenden Cysteins in Parvulinen präsentiert. Dabei wurde festgestellt, dass der pK_5 -Wert von Cys⁴⁰ und das pH-Profil der PPlase-Aktivität von wtPar10 zueinander kongruent sind. Es bleibt aber weiterhin offen, ob der Verlust der Par10-Enzymaktivität durch den Austausch von Cys⁴⁰ durch Alanin aufgrund der dadurch ausgelösten strukturellen Veränderungen oder durch den Wegfall der für die Katalyse essentiellen Cysteinseitenkette verursacht wird. Die eigenen Untersuchungen und die zum Teil widersprüchlichen Literaturdaten reichen nicht aus, um diese Fragen abschließend zu beantworten. Ein Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen und ein Helix-Makrodipoleffekt der α -Helix 3 in wtPar10 werden für die Stabilisierung des Thiolatanions des Cys⁴⁰ in Par10 und für die in dieser Position in weiteren Parvulinen stark konservierten Cystein- und Asparaginsäureseitenketten verantwortlich gemacht. Daher ist es erforderlich, die dargestellten Schlussfolgerungen zu den strukturellen und kinetischen Ergebnissen kritisch zu werten und diese durch Kristallstrukturen, vorzugsweise in Ab- und Anwesenheit von Substraten oder Inhibitoren, abzusichern.

5.4 Betrachtung der Par10-AhpC-Interaktion auf atomarer Ebene

5.4.1 Interaktion von Par10 mit der Peroxireduktase AhpC

Nach der Entdeckung der AhpC als potenziellem Par10-Interaktionspartner durch SCHELBERT [108], konnten MALEŠEVIĆ *et al.* drei AhpC-Segmente identifizieren [126], welche direkt mit den Aminosäureresten der putativen Substratbindungstasche von wtPar10 interagierten. Die im IANUS-*screening* eingesetzte Parvulinsequenz beschränkte sich auf den vorgeschlagenen Par10-Substratbindungsbereich von Lys⁴⁹ bis Phe⁶¹, um Interaktionsstellen innerhalb der AhpC zu finden. Für das AhpC-Segment AhpC¹¹⁵⁻¹³² konnte unter Verwendung des PPIase-Substrates 2-Abz-ALPF-*p*NA eine inhibitorische Wirkung auf die katalytische Aktivität von Par10 nachgewiesen werden [126], deren Ursache in dieser Arbeit eingehender untersucht wurde.

Für die Aufnahme multidimensionaler NMR-Spektren konnten die entsprechenden Proteine mit stabilen Isotopen markiert werden. Die eigenen NMR-Studien konnten die Wechselbeziehung zwischen wtPar10 und AhpC bestätigen und ermöglichten erstmals die genaue Untersuchung der Interaktionsbereiche unter Verwendung vollständiger wtPar10- und AhpC-Moleküle. Das Ziel dieser Versuche bestand nicht darin eine Bindekonstante für die Par10-AhpC-Wechselwirkung zu bestimmen, sondern vielmehr sollten die Experimente die miteinander interagierenden wtPar10- und AhpC-Seitenketten identifizieren. Dabei war es möglich, die an der AhpC-Bindung beteiligten Par10-Aminosäureseitenketten zu bestimmen und deren Wechselwirkung zu quantifizieren (Abb. 4-4). Für entsprechende Bereiche der AhpC konnte dies nicht erreicht werden (Abschnitt 5.4.2).

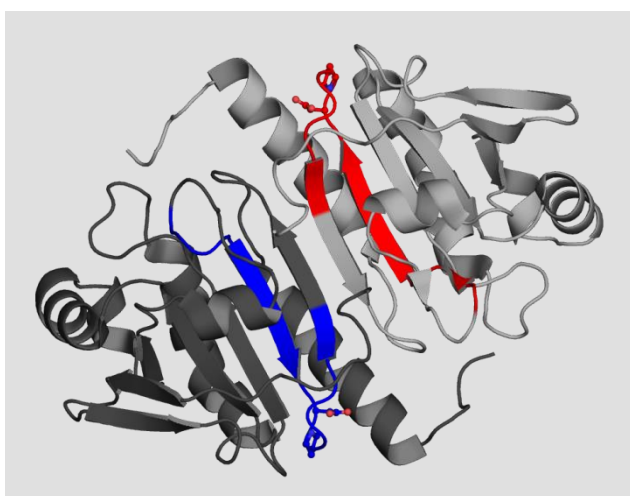


Abb. 5-8. Bändermodell des AhpC-Homodimers. Je ein dunkel- und ein hellgrau dargestelltes Monomer bilden ein AhpC-Dimer. Die blau und rot hervorgehobenen Sekundärstrukturbereiche entsprechen der AhpC¹¹⁵⁻¹³²-Sequenz, welche im IANUS-Peptidarray stark mit dem Substratbindungsbereich von Par10 (Segment 49-61) interagiert. In Kugel-Stab-Darstellung sind die Seitenketten von Asp¹²⁵-Pro¹²⁶ gezeigt, deren Aspartyl-Prolylbindung von wtPar10 als Substrat erkannt und umgesetzt wird. (PDB-ID: 4QL9, Darstellung: PyMol 1.4.1)

Die HSQC-Experimente mit ¹⁵N-wtPar10 und 6xHis-*tag*-AhpC, AhpC_{kurz} oder dem Peptid AhpC¹¹⁵⁻¹³² (Ac-GLADRATFVVDPQGIIQA-NH₂) zeigten, von wenigen Ausnahmen abgesehen, übereinstimmende Muster der ¹H^N-¹⁵N-chemischen Verschiebung der ¹⁵N-wtPar10-Kreuzsignale. Das AhpC¹¹⁵⁻¹³²-Peptid

zeigte die stärksten, AhpC_kurz dazu abgeschwächte und 6xHis-tag-AhpC die schwächsten $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -Verschiebungen (Abschnitt 4.2). Eine Erklärung für diese Längenabhängigkeit ist in dem Oligomerisierungsverhalten der AhpC zu vermuten. Außerdem ist das AhpC¹¹⁵⁻¹³²-Oligopeptid kleiner und flexibler als die AhpC-Proteine, die eine ungleich größere Oberfläche und eine höhere Anzahl möglicher, auch unspezifischer, Kontaktstellen bieten, welche alle um die Bindungsstellen im ^{15}N -wtPar10 konkurrieren. Die langgestrecktere Form eines kurzen Peptids scheint geeigneter, um mit der Par10-Substratbindungstasche in Wechselwirkungen zu treten. Die für einige Aminosäuren ermittelten $\Delta\delta$ $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -Werte größer 0,03 ppm sprechen für eine starke Wechselwirkung der Liganden mit ^{15}N -wtPar10. Bei gleichartigen 2D $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ HSQC-Untersuchungen zwischen Pin1At und einem von Cdc25 abgeleiteten pThr-Peptid war ein deutlich höheres Peptid-Enzym-Verhältnis (40:1) notwendig, um signifikante Verschiebungen im Peptidrückgrat hervorzurufen [77].

Das Oligomerisierungsverhalten der AhpC liefert eine Erklärung für die insgesamt kleineren ppm-Beträge im Falle von 6xHis-tag-AhpC und AhpC_kurz. Unter den geforderten NMR-Messbedingungen (reduzierender Puffer, um ^{15}N -wtPar10-Aggregation zu vermeiden, und [AhpC] = 1-2 mM) war das Vorliegen von AhpC-Dekameren in den untersuchten Proben sichtbar. Die höhermolekularen Dimer-Dimer-Komplexe (fünf Dimere bilden ein Dekamer) waren in den 1D ^1H -NMR-Spektren durch schlecht aufgelöste Feinstrukturen (Abb. 4-2) und in den $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren durch eine zunehmende starke bis sehr starke Linienverbreiterung mit steigender AhpC-Konzentration sichtbar (nicht gezeigt). Dies könnte bedeuten, dass eine AhpC-Interaktionsfläche für Par10 bereits durch ein weiteres AhpC-Molekül besetzt ist und demnach die ^{15}N -wtPar10-Moleküle mit AhpC-Molekülen um die Bindung an andere AhpC-Mono- respektive AhpC-Dimere konkurrieren müssen.

Die Ergebnisse der $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperimente bestätigten, dass im Wesentlichen die Aminosäurereste der Substratbindungsstelle zusammen mit Par10-Seitenketten, denen eine Beteiligung an der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolylbindungen zugeschrieben wird, an der Par10-AhpC-Interaktion beteiligt sind (Abb. 4-5). Die am stärksten verschobenen Signale konnten Ser⁴², Leu⁴⁹, Gly⁵⁰, Arg⁵³, Gln⁵⁴, Met⁵⁷, Val⁵⁸, Ala⁶⁰, Phe⁶¹, Lys⁶³ und Phe⁸¹ zugeordnet werden. Zu den schwächer verschobenen Signalen gehörten jene von His⁸, Cys⁴⁰ und His⁸⁴. Die Seitenketten von Leu⁴⁹, Met⁵⁷, Val⁵⁸, Phe⁶¹ und Phe⁸¹ gehören zu den funktionellen Gruppen, welche die hydrophobe Bindungstasche von Par10 formen. His⁸, Cys⁴⁰, Phe⁶¹ und His⁸⁴ werden in der Literatur als Bestandteile einer katalytischen Kaskade beschrieben, welche vermutlich am Katalysemechanismus von Par10 beteiligt ist [43]. Dabei befinden sich beide Histidinreste am Boden der Bindungstasche und damit tief in der Bindungsfurche des Parvulins.

Dass AhpC¹¹⁵⁻¹³² von ^{15}N -wtPar10 nicht nur gebunden, sondern auch als Substrat erkannt und umgesetzt wurde, konnte auf Basis der von Dr. C. LÜCKE durchgeführten 2D-NOESY-Experimente mit AhpC¹¹⁵⁻¹³² in Ab- und Anwesenheit katalytischer Par10-Mengen belegt werden (Abb. 4-6). Eine

Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung der Asp¹²⁵-Pro¹²⁶-Bindung von AhpC¹¹⁵⁻¹³² wurde anhand neu entstandener Signale für die *cis*-Konformation dieser Bindung in Anwesenheit von wtPar10 nachgewiesen. Die AhpC-Röntgenkristallstruktur und die eigenen NMR-Experimente mit AhpC¹¹⁵⁻¹³² zeigen, dass die Asp¹²⁵-Pro¹²⁶-Prolylbindung *trans* konfiguriert vorliegt.

Auch wenn es nicht gelang, die entsprechenden, mit den Par10-Seitenketten wechselwirkenden AhpC-Aminosäuren zu identifizieren, so lassen die übereinstimmenden Verschiebungsmuster vermuten, dass der AhpC-Abschnitt Gly¹¹⁵ bis Ala¹³² auch im vollständigen AhpC-Molekül den Interaktionsbereich mit Par10 darstellt. Im Falle des bisher als „kompetitiver Inhibitor“ bezeichneten AhpC¹¹⁵⁻¹³²-Peptids kann nun, wie auch für das gesamte AhpC-Molekül, von einem natürlichen Substrat beziehungsweise einem Interaktionspartner von wtPar10 gesprochen werden. ¹H^N-¹⁵N NOESY-Experimente an ¹⁵N-AhpC könnten zukünftig weitere Signalzuordnungen liefern.

In silico Bindungsstudien (durchgeführt von Dr. C. LÜCKE unter Verwendung des Programms HADDOCK [335]) mit dem AhpC-Segment AhpC¹¹⁹⁻¹²⁹ (RATFVVDPQGI)¹² führten zu einem Energieminimum-Modell (Abb. 5-9). In diesem wird Asp¹²⁵ vollständig in der Par10-Bindungstasche zwischen His⁸ und His⁸⁴ eingebunden und vermutlich so in einer für die Katalyse wichtigen Position fixiert. Die Carboxylatseitenkette von Asp¹¹⁵ befindet sich dabei in kurzer Distanz (innerhalb einer Wasserstoffbrückenbindungslänge) zu den Imidazolringen von His⁸ und His⁸⁴. Der Prolylring von Pro¹²⁶ liegt zwischen dem Cys⁴⁰ und Phe⁸¹. Obgleich in allen untersuchten AhpC-Proteinen und dem AhpC¹¹⁵⁻¹³²-Peptid die Aspartyl-Prolylbindungen zwischen Asp¹²⁵ und Pro¹²⁶ *trans*-konfiguriert ist, ergab sich für die beste berechnete Einbindung von Pro¹²⁶ die energetisch ungünstigere *cis*-Konformation und damit die für Parvuline angenommene natürliche Substratkonformation. Hydrophobe Wechselwirkungen oder CH- π -Interaktionen zwischen dem Phenylring (Phe⁸¹) und dem Prolylring des Substrates scheinen die *cis*-Konformation im berechneten Modell zu stabilisieren [11, 230, 231]. Weiterhin hat Val¹²³ des Peptidsubstrats hydrophobe Kontakte zu Leu⁴⁹ und Met⁵⁷ von wtPar10 (in Abb. 5-9 B nicht gezeigt).

Der Abstand zwischen dem Schwefelatom des Cys⁴⁰ und dem Carbonyl-C-Atom der Prolylbindung beträgt 6 Å und scheint für einen nukleophilen Angriff zu weit entfernt. Eine Annäherung beider Atome ist aber aufgrund der Lage des Cys⁴⁰ innerhalb einer flexiblen Schleifenregion denkbar. Aussagen zu einem Katalysemechanismus lassen diese computergestützten Berechnungen nicht zu, sie helfen aber die Einbindung von längeren Peptidsubstraten in die Par10-Bindungstasche zu verstehen.

¹² Eine Simulation anhand von AhpC¹¹⁵⁻¹³² wäre zu rechenintensiv und zeitaufwendig gewesen und machte eine Verkürzung der AhpC-Peptidsequenz notwendig.

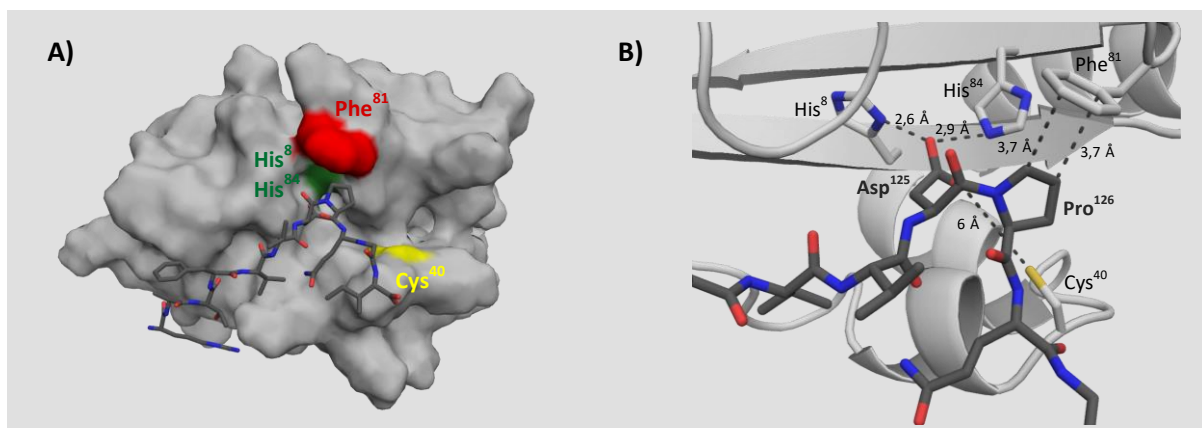


Abb. 5-9. *In silico* Bindungsstudie des wtPar10-AhpC¹¹⁹⁻¹²⁹-Komplexes. Die Abbildung zeigt das energetisch günstigste Modell der Simulationen. Die Prolylbindung des AhpC¹¹⁹⁻¹²⁹-Peptides liegt dabei in der *cis*-Konformation vor. **A)** Modell für die Bindung des AhpC¹¹⁹⁻¹²⁹-Peptides mit der Sequenz RATFVDPQGI (Stabmodell) durch Par10 (Oberflächendarstellung). **B)** Blick in den Substratbindungsbereich von Par10 (hellgrau) mit gebundenem AhpC¹¹⁹⁻¹²⁹-Peptid (dunkelgrau). Wichtige AS-Seitenketten von wtPar10 und AhpC¹¹⁹⁻¹²⁹ sind mit dem Dreibuchstabencode bezeichnet und Abstände zwischen Atomen in Ångström (Å) als gestrichelte Linie gezeigt. Abbildung verändert nach [126]. (PDB-ID: 1JNT, Darstellung: PyMol 1.4.1)

5.4.2 Lösungsstruktur der Peroxireduktase AhpC

Nachdem die Par10-Aminosäurereste, die mit dem Bindungspartner AhpC interagieren, identifiziert werden konnten, sollte Analoges für die entsprechenden Aminosäurereste innerhalb der vollständigen AhpC-Moleküle erfolgen. Die Voraussetzung hierfür wäre die erstmalige Beschreibung einer AhpC-Lösungsstruktur gewesen. Das unter Abschnitt 1.4 kurz beschriebene Oligomerisierungsverhalten der AhpC stellte das größte zu lösende Problem auf dem Weg der Strukturermittlung dar. Die Lösungs-NMR bietet zwar ein hochauflösendes spektroskopisches Verfahren zur Proteinuntersuchung, ist dabei aber eine unempfindliche Untersuchungsmethode mit hohem Materialbedarf verglichen mit anderen Methoden wie der CD-Spektroskopie oder der dynamischen Lichtstreuung. Da die dekamere Form der AhpC mit einer Gesamtmolekülmasse von über 210 kDa zu groß für gegenwärtige Standard-Lösungs-NMR-Untersuchungen ist, musste die Ausbildung von AhpC-Dekameren in den untersuchten Proben minimiert werden. In den NMR-Experimenten sollte die AhpC idealerweise ausschließlich als Dimer vorliegen und eine Monomerisierung vermieden werden, da AhpC-Monomere in *E. coli* nicht-funktional sind.

Wie Untersuchungen mittels analytischer Gelfiltration, dynamischer Lichtstreuung, isothermer Titrationskalorimetrie, Kryoelektronenmikroskopie und analytischer Ultrazentrifugation ergaben, ist das Dimer-Dekamer-Gleichgewicht unter anderem von der Ionenstärke und vom pH-Wert des Puffers, von der Konzentration und dem Redoxzustand der AhpC sowie von der Länge des C-Terminus der AhpC-Moleküle abhängig. Für AhpC existiert ein deutlicher Übergang zwischen seiner

Dimer- und Dekamerform, welcher vermutlich auf zusätzliche kooperative Effekte bei der Oligomerisierung zurückzuführen ist [115, 117, 121, 336-340].

Eine Verschiebung des Dimer-Dekamer-Gleichgewichts durch die genannten Faktoren ist prinzipiell möglich. Dazu durchgeführte Analysen wurden meist für AhpC-Konzentrationen zwischen 1 und 50 μM durchgeführt und damit weit unterhalb der für die eigenen NMR-Untersuchungen benötigten Proteinkonzentrationen. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass bereits bei einer AhpC-Konzentration größer 2,5 μM eine Oligomerisierung reduzierter AhpC-Dimere (beide katalytisch aktiven Cysteinreste liegen in der Thiolatform vor) einsetzt [115, 336].

Auch bei für die konventionelle Lösungs-NMR unzulässig hohen Salzkonzentrationen ($[\text{NaCl}] > 1,5\text{M}$) konnten überwiegend Dimere für die AhpC aus *Pisum sativum* nachgewiesen werden [341]. Hohe Salzkonzentrationen in NMR-Proben führen allerdings zu „elektrischen Störungen“ (*electrical noise*) während der Spektrenaufnahme und verschlechtern das Signal-Rausch-Verhältnis erheblich [342]. Dies trifft besonders im Falle der für die eigenen Messungen verwendeten Kryoprobenköpfe zu. Daher werden üblicherweise NMR-Strukturbestimmungen in ungepufferten Lösungen oder Niedrigsalzpuffern vorgenommen. Solch ein Vorgehen war aber insbesondere in Hinblick auf die geplanten Untersuchungen der Par10- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -AhpC-Interaktion nicht möglich, da in Puffern niedriger Ionenstärke unspezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen zunehmen. Damit war man sehr beschränkt bei der Variation der Pufferbedingungen und Proteinkonzentrationen und gelangte über diese Parameter nicht zum gewünschten Ziel.

Eine Verbesserung der 1D- und 2D-AhpC-Spektren wurde durch die Manipulation der Primärsequenz von AhpC erreicht. Proben der C-terminal um zwölf Aminosäuren verkürzten AhpC_{kurz} zeigten eine erhöhte Signalintensität und eine Signalzunahme im Vergleich zu den 6xHis-getaggten AhpC-Molekülen, welche den kompletten C-Terminus trugen, und ließen auf eine wohl definierte Sekundärstruktur hoffen (Abb. 4-2). Dass die N- und C-terminalen Verkürzungen den Dimer- gegenüber dem Dekameranteil erhöhten, erkannte man zudem an den größeren kombinierten $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -Verschiebungen der Amidprotonenresonanz der ^{15}N -wtPar10-Aminosäurereste verglichen mit den Werten der ungekürzten 6xHis-tag-AhpC-Variante.

Die Länge des C-Terminus ist ein entscheidender Faktor bei der Dimer- und Dekamerbildung. Studien aus dem Jahr 2014 von DIP *et al.* [121, 343] belegen, dass der sehr flexible C-Terminus einer AhpC-Untereinheit über eine zweite Untereinheit reicht und dadurch die Dimere und indirekt die Dekamere stabilisiert. Ein verkürzter C-Terminus schützt die AhpC-Moleküle vor der Überoxidation und unterbindet die Bildung dekamerer AhpC-Spezies maßgeblich [340]. In den meisten Kristallstrukturen ist der C-Terminus aufgrund seiner Beweglichkeit nicht aufgelöst oder wegen seines proteolytischen Abbaus innerhalb der Zelle nicht mehr vorhanden.

Die niedrigere Signalintensität im Bereich 210-228 nm im CD-Spektrum der AhpC_{kurz} wurde so interpretiert, dass dieser Variante aufgrund der vorgenommenen Proteinverkürzungen unstrukturiert

rierte *N*- und *C*-terminale Bereiche im Vergleich zur 6xHis-tag AhpC fehlten. Die Auswertung beider Spektren mit dem Programm CDNN ergab zudem eine leichte Erhöhung des β -Faltblattanteils gegenüber dem α -Helixanteil für AhpC-kurz. Die Ergebnisse der CD-spektroskopischen Untersuchungen ließen vermuten, dass beide AhpC-Varianten für nachfolgende NMR-Messungen, unter Verwendung des identischen Puffersystems generell geeignet waren. Allerdings waren keine Aussagen über die Funktionalität oder das Oligomerisierungsverhalten einzelner AhpC-Varianten bei NMR-relevanten Proteinkonzentrationen (~ 1 mM) möglich.

Eine zusätzliche leichte Verbesserung der NMR-Spektren wurde durch den Austausch von Thr⁷⁷ durch einen Asparaginsäurerest erreicht (nicht gezeigt). Thr⁷⁷ und Thr^{77'} eines AhpC-Dimers befinden sich an der Dimer-Dimer-Grenzfläche und sind sowohl über Wasserstoffbrückenbindungen mit koordinierten Wassermolekülen als auch über VAN-DER-WAALS-Kräfte zwischen dem Thr⁷⁷ und Phe⁴² verbunden [120]. Zusammen mit weiteren Aminosäureseitenketten (je Dimer: Phe²⁰, Phe⁴², Phe⁴⁴, Phe⁷⁶, Ala⁸⁰, Trp⁸¹), welche über hydrophobe Wechselwirkungen interagieren, stabilisieren sie die Dimer-Dimer-Interaktion von AhpC. PARSONAGE *et al.* konnten für AhpC aus *Salmonella typhimurium* die Stabilisierung der Dekamere durch eine T77V-Mutation und die Destabilisierung durch T77I- und T77D-Austausche anhand analytischer Ultrazentrifugationen zeigen [120]. Besonders AhpC T77D zeigte eine deutliche Erhöhung des Anteils der dimeren gegenüber der dekameren Form aufgrund der Abstoßungskräfte der beiden gegenüberliegenden, unkompensierten negativen Ladungen der Asparaginsäureseitenketten. Sie wiesen bis zu einer AhpC-Konzentration von 485 μ M ausschließlich Dimere nach.

Die eigenen 1D ¹H-NMR Spektren der AhpCT77D-Mutante ließen ebenfalls für AhpC-Konzentrationen zwischen 1 und 2 mM einen leicht höheren Dimer-Anteil vermuten. Mit der statischen und der dynamischen Lichtstreuung [287, 288] sowie der analytischen Ultrazentrifugation [289] stehen Methoden bereit, mit denen sich der Anteil und die Größe von Proteinaggregaten in einer Lösung auch bei hohen Proteinkonzentrationen genauer bestimmen lassen. Diese Techniken könnten in weiterführenden Untersuchungen zum Einsatz kommen, um die dominierende Zustandsform verschiedener AhpC-Varianten unter diversen Bedingungen zu ermitteln.

Ein von YAMAMOTO und Kollegen in die AhpC-Sequenz zusätzlich eingeführter Phenylrest zwischen Phe³⁶ und Tyr³⁷ führte ebenfalls zur Unterbindung der Dekamerbildung, allerdings unter erheblichen AhpC-Strukturänderungen, dem Verlust der Peroxidaseaktivität und der Beobachtung einer neuen Disulfidreduktaseaktivität [344], weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Von den getesteten Detergenzien Triton X-100 (nichtionisches Detergens), Natriumdesoxycholat (anionisches Detergens) und Sulfbobetain SB 14 (zwitterionisches Detergens) konnte nur das zwitterionische Detergens CHAPS die Protein-Protein-Interaktionen zwischen einzelnen Dimeren beeinflussen, wie eine leichte Verbesserung der in Voruntersuchungen aufgenommenen 1D ¹H-NMR-

Spektren zeigte (Abb. 4-2 B). Bereits in den 1980er Jahren konnte CHAPS zur Isolierung von Proteinen im nativen Zustand und unter nur geringem Aktivitätsverlust sowie zur Auftrennung höhermolekularer Proteinkomplexe erfolgreich eingesetzt werden [345-347]. Dabei wurde es in Konzentrationen von 1-13 mM in einem für physiologische Prozesse günstigen pH-Bereich von 5-8 eingesetzt. Es galt daher als vielversprechend, um die AhpC-Dekamere zu disaggregieren und deren Reaggregation zu unterbinden, ohne dabei denaturierend auf die AhpC-Struktur zu wirken. Aber auch hier war die erreichte Verbesserung der 1D-¹H-NMR-Testspektren ungenügend. Als ein gravierender Nachteil der eingesetzten hohen CHAPS-Konzentrationen erwiesen sich die zusätzlichen störenden Aliphatenprotonensignale (Abb. 4-2).

Die uniforme Markierung der ausgewählter AhpC-Proteine mit den Isotopen ¹⁵N (¹H^N-¹⁵N-HSQC-Spektren) respektive ¹³C und ¹⁵N (Triple-Resonanz-Spektren) und ein benötigter Reinheitsgrad der Proteine von über 95 % konnte genauso gewährleistet werden, wie die Stabilität der Proteine, welche über viele Stunden bis mehrere Tage bei Raumtemperatur gemessen werden mussten. Es wurden aber keine geeigneten Bedingungen gefunden, um die Oligomerisierung der AhpC bei den für NMR-Experimente erforderlichen hohen Proteinkonzentrationen (1-2 mM) zu unterbinden. Das Ziel, erstmals eine Lösungs-NMR-Struktur der AhpC unter Verwendung von ¹³C/¹⁵N-markierter AhpC_{kurz} aufzuklären, wurde nicht erreicht. Ebenso blieben die funktionellen Gruppen unidentifiziert, welche eine chemische Verschiebungsänderung zeigen, wenn unmarkiertes wtPar10 zur AhpC zutitriert wird. Daher war die genaue Bestimmung des Par10-Bindungsbereiches auf der AhpC-Oberfläche nicht möglich. Dazu hätten stabile AhpC-Dimere vorliegen müssen. Es gelang aber vermutlich nur eine teilweise Auflösung der Dekamerringstruktur.

Die Struktur und Dynamik großer Proteinkomplexe (und anderer Biomakromoleküle) in flüssiger Umgebung sind mit kleinen Magnetfeldern nicht oder nur sehr schwer lösbar. Der Grund hierfür liegt in der größeren Anzahl sich überlagernder Signale, die mit der Molekülgröße wächst. Man benötigt daher oft stärkere Magnetfelder, spezielle Kryoprobenköpfe oder Festkörper-NMR-Experimente [348], um größere Proteine oder ganze Proteinkomplexe untersuchen zu können. Eine Verstärkung des Magnetfeldes verbessert in vielen Fällen die Auflösung und das Signal-Rausch-Verhältnis der detektierten Signale. Die Aufnahme von AhpC-Spektren an leistungsfähigeren 900 MHz NMR-Geräten könnte zu insgesamt verbesserten Signalmustern und einfacheren Interpretationen der experimentellen Daten führen. In Zukunft könnte sich die Empfindlichkeit vorhandener und neuer NMR-Spektrometer so weit verbessern, dass sich die dreidimensionale Struktur der AhpC-Dekamere und die Par10-AhpC-Wechselwirkungen in Lösung und sogar kinetische Untersuchungen an beiden Proteinen, genauer untersuchen lassen.

Die Spektrenkomplexität großer Proteine lässt sich auch durch segmental isotope markierte Proteine signifikant verringern. Unter Verwendung der NCL, EPL oder des Transsspleißens lassen sich

beispielsweise einzelne Proteinsegmente mit NMR-aktiven Isotopen (^2H , ^{13}C , ^{15}N) markieren und selektiv mittels NMR untersuchen [349-351]. Diese Methode ist bereits erfolgreich bei der Einführung NMR-inaktiver, Löslichkeitserhöhender Proteinerweiterungen [352], bei der Untersuchung von Interdomänen-Wechselwirkungen [353] und Konformationsänderungen von Proteinen [354] sowie bei der Strukturaufklärung großer Multidomänenproteinen [355, 356] eingesetzt worden und bietet damit einen vielversprechenden Ansatz bei der Aufklärung einer AhpC-Lösungsstruktur und der Analyse der Par10-AhpC-Interaktion.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Fokus dieser Arbeit stand das Zytoplasmprotein Parvulin 10 (Par10) des gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli*. Par10 ist eine aus lediglich 92 AS bestehende Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase) und gilt als Prototyp der Parvulinfamilie, zu der auch die *humanen* Vertreter *hPar14*, *hPar17* und *hPin1* gehören. Par10 ist eines der kleinsten bekannten, als Monomer aktiven Enzyme und katalysiert die *cis/trans*-Isomerisierung von Xaa-Pro-Bindungen in Peptiden und Proteinen. Im Unterschied zu anderen Parvulinen verfügt Par10 über eine einzelne PPIase-Domäne ohne zusätzliche *N*- oder *C*-terminale Erweiterungen. Parvuline sind an Prozessen der Proteinfaltung, Zellzykluskontrolle, Signaltransduktion sowie des Transports und Abbaus von Proteinen beteiligt. Sie werden mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert (u. a. Her2-positiver Brustkrebs, *Morbus ALZHEIMER*) und sind deshalb von hohem therapeutischem Interesse.

Der bislang einzige vermutete zelluläre Bindungspartner von Par10, die Alkylhydroperoxid-Reduktase Untereinheit C (AhpC), konnte vor dieser Arbeit nur unzureichend als natürlicher Interaktionspartner bestätigt werden. Insbesondere der Substratbindungsbereich von Par10 und die Wechselbeziehungen zwischen Par10 und der AhpC wurden in der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht. Weiterhin wurden verschiedene Verfahren zur Synthese und Manipulierung von Parvulinsequenzen in der vorliegenden Studie angewendet, um den Substratbindungsbereich von Par10 selektiv mit Fluoreszenzsonden zu markieren. Für beide in Par10 vorkommenden Cysteinseitenketten konnten die jeweiligen pK_S -Werte erstmals experimentell bestimmt werden. Vor allem der für die Umsetzung von Standardsubstraten essentielle Cys⁴⁰-Aminosäurerest war zuvor hinsichtlich seiner nukleophilen Eigenschaften und seiner Bedeutung für die Parvulinstruktur ungenügend untersucht worden.

Die Ergebnisse der experimentellen Arbeiten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Um zu den modifizierten Par10-Molekülen zu gelangen, wurde ein Semisyntheseweg vorgeschlagen, welcher die inteinvermittelte Synthese von Peptid- α -thioestern und die Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zusammen mit der Natürlich Chemischen Ligation (NCL) und der Enzymatischen Ligation (EL) verband. Insgesamt sechs chemisch (25 bzw. 32 AS) und zwei rekombinant erzeugte Peptid-beziehungsweise Peptid- α -thioestersegmente (35 bzw. 67 AS) wurden synthetisiert und entsprechend der Par10-Primärsequenz erfolgreich zu 10 kDa großen, fluoreszenzmarkierten Par10-Derivaten miteinander ligiert.

Die Einführung des Fluoreszenzbausteins in Form des nicht kanonischen Aminosäurederivats Dap(Abz) erfolgte nahe der Substratbindungstasche von Par10 in vier Positionen (Met⁵⁷, Val⁵⁸, Gln⁸⁰ und Phe⁸¹) mittels Festphasenpeptidsynthese. Unter Verwendung der NCL konnten die Peptide

Par10 H-36-92-OH M57Dap(Abz) und Par10 H-36-92-OH V58Dap(Abz) sowie die vollständigen Par10-Derivate Par10 Q80Dap(Abz) und Par10 F81Dap(Abz) aufgebaut werden.

Die Darstellung eines Substratmimetikums als Ausgangssegment für die EL war durch eine inteinvermittelte Par10 H-1-35-MESNa-Synthese und eine anschließende Umesterung zu Par10 H-1-35-SBn realisierbar. Die in das Substratmimetikum eingebrachte Esterabgangsgruppe (-SBn) wurde von der verwendeten Trypsiligase erkannt und in einer „reversen Proteolyse“ mit markierten Par10 H-36-92-OH-Segmenten zu den vollständigen Par10-Derivaten Par10 M57Dap(Abz) und Par10 V58Dap(Abz) umgesetzt.

Erste enzymkinetische und strukturelle Charakterisierungen der in dieser Arbeit modifizierten Parvuline deuten bereits das Potential derartiger Varianten an. Die an unterschiedlichen Positionen in Par10 eingebrachten Fluoreszenzsonden schaffen somit eine erste Grundlage für zukünftige Untersuchungen und könnten helfen, die Substraterkennung, -bindung und den Katalysemechanismus von Parvulinen zu verstehen. Weitere Synthese- und Ligationsstrategien in Kombination mit biophysikalischen Sonden an anderen geeigneten Par10-Aminosäurepositionen könnten Ausgangspunkte für eine Reihe von neuen Par10-Derivaten sein und wichtige neuartige Untersuchungsobjekte liefern.

Entsprechende Varianten könnten in weiterführenden Fluoreszenzpolarisations- oder in Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Studien zusammen mit ebenfalls fluoreszenzmarkierten, potenziellen Par10-Substraten oder Par10-Inhibitoren eingesetzt werden. Über die Bindung unterschiedlicher Fluorophore an mögliche Par10-Liganden ließen sich nach der Beobachtung eines möglichen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers neue Informationen zu den dynamischen Prozessen während einer Par10-Ligandbindung ableiten. Die hieraus erhaltenen Erkenntnisse könnten beispielsweise helfen, antibakterielle Substanzen zu identifizieren. Die andauernde Zunahme von multiresistenten Keimen erfordert die stetige Entwicklung neuartiger Antibiotika und die Inhibierung der für einige prokaryotische Organismen essentiellen Parvuline stellt dabei einen vielversprechenden Ansatz dar.

Anhand durchgeführter pK_S -Wertbestimmungen an den synthetisierten Par10 C40A und Par10 C68A wurde festgestellt, dass sowohl Cys⁴⁰ als auch Cys⁶⁸ einen in den sauren pH-Bereich verschobenen pK_S -Wert aufweisen ($pK_S(\text{Cys}^{40}) = 5,50 \pm 0,13$ und $pK_S(\text{Cys}^{68}) = 5,44 \pm 0,43$) und demzufolge unter physiologischen Bedingungen (pH-Wert = 7,4) deprotoniert vorliegen. Bislang gab es ausschließlich theoretisch berechnete pK_S -Werte und wenige geeignete Untersuchungsobjekte.

In vorangegangenen Studien ist die Beteiligung der Sulfhydrylgruppe des in Parvulinen konservierten Cys⁴⁰ (Cys¹¹³ in *hPin1*) am Katalysemechanismus wiederholt diskutiert worden. Dennoch konnte die mechanistische Bedeutung dieser Aminosäure für die Enzymfunktion noch nicht zweifelsfrei gezeigt werden. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit lassen keine Aussage zu, ob die Cys⁴⁰-Seitenkette als Nukleophil agiert und direkt an einem kovalent verlaufenden Katalysemechanismus

der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolylbindungen beteiligt ist. Eigene Fern-UV-CD-Untersuchungen, limitierte Proteolysen und zweidimensionale NMR-Experimente deuten auf einen tertiärstruktur-stabilisierenden Einfluss der negativen Ladung von Cys⁴⁰ über die Beteiligung an einer über Wasserstoffbrücken verbundenen Tetrade hin (Cys⁴⁰-His⁸-His⁸⁴-Thr⁷⁹). Ein weiteres von Cys⁴⁰ ausgehendes Wasserstoffbrückennetzwerk und ein möglicher Helix-Makrodipoleffekt scheinen an der Thiolat-stabilisierung des Cys⁴⁰ beteiligt zu sein.

In zukünftigen Mutationsstudien sollten vor allem die mit Cys⁴⁰ wechselwirkenden Aminosäure-seitenketten (mutmaßlich Ser³⁸, Ser⁴², His⁸) ausgetauscht werden. Damit ließen sich die strukturellen Beziehungen zwischen einzelnen Aminosäuren im Substratbindungsbereich von Par10 nachvollziehen und die Beträge der pK_S -Wertabsenkung durch die einzelnen Seitenketten abschätzen.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen erlaubten eine genauere Untersuchung der Par10-AhpC-Wechselbeziehung auf atomarer Ebene und gaben Hinweise auf die Raumstruktur der PPIase-inaktiven Par10 C40A-Variante. Die durchgeführten NMR-Studien konnten Par10 und AhpC als Interaktionspartner bestätigen und zusätzlich ein von der AhpC-Sequenz abgeleitetes Peptid (AhpC¹¹⁵⁻¹³²) als ein Par10-Substrat ausmachen, bei dem eine *cis/trans*-Isomerisierung der Prolylbindung zwischen Asp¹²⁵-Pro¹²⁶ stattfindet. Anhand der ¹H^N-¹⁵N-Korrelationen von Par10 gelang es, die an der Bindung von AhpC beteiligten Par10-Aminosäureseitenketten zu identifizieren und deren Wechselwirkungen zu quantifizieren. Damit konnte die zunächst nur putative Substratbindungstasche von Par10 als tatsächlicher Bindungsbereich für Substrate verifiziert werden.

Auf diesen experimentellen Daten aufbauende Dockingstudien ergaben ein Modell des Par10-AhpC-Komplexes, bei dem in der energetisch günstigsten Form die C-N-Bindung zwischen Asp¹²⁵ und Pro¹²⁶ in der *cis*-Konformation vorliegt. Pro¹²⁶ taucht demnach völlig in die Bindungstasche von Par10 ein und die Carboxyseitenkette von Asp¹²⁵ liegt innerhalb einer Wasserstoffbrückenbindungs-distanz zu den Imidazolringen von His⁸ und His⁸⁴.

Mit einer Lösungs-NMR-Struktur der AhpC sollte die Voraussetzung geschaffen werden, um auch die AhpC-Seitenketten, welche ihrerseits mit den Par10-Aminosäuren der Substratbindungstasche interagieren, eindeutig benennen zu können. Anhand von 1D- und 2D-NMR-Experimenten konnten AhpC-Varianten mit einer definierten Tertiärstruktur ausgewählt und unter verschiedenen Bedingungen auf die beabsichtigte Auflösung ihrer dekameren Ringstruktur hin untersucht werden. Allerdings blieben diese Versuche bei den für die NMR-Versuche benötigten hohen Proteinkonzentrationen bislang erfolglos. Aufgenommene Spektren deuteten darauf hin, dass die AhpC-Moleküle unter den getesteten Bedingungen überwiegend in ihrer dekameren Form vorlagen. Die daraus resultierende große Molekülmasse von mehr als 210 kDa sorgte für lange Korrelationszeiten τ_c (aufgrund einer langsamen Brownschen Molekularbewegung) und in deren Konsequenz zu einer zunehmenden Linienverbreiterung mit einer starken Überlagerung einzelner NMR-Messsignale. Der

damit einhergehende Informationsverlust führte zu ungenügend aufgelösten Spektren, aus denen keine Raumstruktur der AhpC in Lösung abgeleitet werden konnte.

Die Aufnahme von verbesserten AhpC-Spektren an modernen, leistungsfähigeren NMR-Geräten könnte zu einer einfacheren Signalzuordnung und Interpretation der experimentellen Daten führen. Mit Unterstützung von segmental isotopenmarkierten AhpC-Molekülen könnten Lösungsstrukturen einzelner AhpC-Segmente schrittweise erhalten werden. Es wird vorgeschlagen, sich zunächst auf den C-terminalen Bereich zu konzentrieren, da hier, wie gezeigt werden konnte, die Bindung durch Par10 erfolgt. Es könnten mehrere auf diese Weise erhaltene Teilstrukturen *in silico* zu einer Gesamtstruktur zusammengefügt werden, die dann detailliertere Strukturinformationen über die AhpC in Lösung ergäbe. Die sich daran anschließenden Titrationsexperimente mit ^{13}C - und ^{15}N -teilmarkierten AhpC-Chimären könnten Rückschlüsse auf die AhpC-Seitenketten, welche an der Bindung mit Par10 beteiligt sind, zulassen.

Die genauen Abläufe bei der Erkennung der zu isomerisierenden Prolylbindungen bleiben unverständlich. Folglich erlauben die derzeit bekannten Daten weiterhin keine Rückschlüsse auf die native Enzymfunktion von Par10. Da auch Studien mit anderen PPlasen diesbezüglich erfolglos verliefen, sind grundlegende Fragen hinsichtlich des Katalysemechanismus, natürlicher *in vivo* Substrate und der genauen zellulären Funktion der Parvuline bislang unbeantwortet und erfordern weiterführende Untersuchungen.

7 Literaturverzeichnis

1. Doherty, E.A. and J.A. Doudna, *Ribozyme structures and mechanisms*. Annual Review of Biochemistry, 2000. **69**: p. 597-615.
2. Radzicka, A. and R. Wolfenden, *A Proficient Enzyme*. Science, 1995. **267**(5194): p. 90-93.
3. Wolfenden, R., *Degrees of difficulty of water-consuming reactions in the absence of enzymes*. Chemical Reviews, 2006. **106**(8): p. 3379-3396.
4. Chen, L.H., G.L. Kenyon, F. Curtin, S. Harayama, M.E. Bembenek, G. Hajipour, and C.P. Whitman, *4-Oxalocrotonate Tautomerase, an Enzyme Composed of 62 Amino-Acid-Residues Per Monomer*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(25): p. 17716-17721.
5. Jayakumar, A., M.H. Tai, W.Y. Huang, W. al-Feel, M. Hsu, L. Abu-Elheiga, S.S. Chirala, and S.J. Wakil, *Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(19): p. 8695-9.
6. Tiessen, A., P. Perez-Rodriguez, and L.J. Delaye-Arredondo, *Mathematical modeling and comparison of protein size distribution in different plant, animal, fungal and microbial species reveals a negative correlation between protein size and protein number, thus providing insight into the evolution of proteomes*. BMC Research Notes, 2012. **5**: p. 85.
7. Allen, G. and G. Lowe, *Investigation of the active site of papain with fluorescent probes*. The Biochemical Journal, 1973. **133**(4): p. 679-86.
8. Wang, J., Y.F. Xiang, and C. Lim, *The double catalytic triad, Cys25-His159-Asp158 and Cys25-His159-Asn175, in papain catalysis: role of Asp158 and Asn175*. Protein Eng, 1994. **7**(1): p. 75-82.
9. Voet, D., Voet, J. G., *Biochemistry*. 3rd ed. 2004: John Wiley & Sons, Inc.
10. Corey, R.B. and L. Pauling, *Fundamental Dimensions of Polypeptide Chains*. Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences, 1953. **141**(902): p. 10-20.
11. Pal, D. and P. Chakrabarti, *Cis peptide bonds in proteins: Residues involved, their conformations, interactions and locations*. Journal of Molecular Biology, 1999. **294**(1): p. 271-288.
12. Scherer, G., M.L. Kramer, M. Schutkowski, U. Reimer, and G. Fischer, *Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(22): p. 5568-5574.
13. Reimer, U., G. Scherer, M. Drewello, S. Kruber, M. Schutkowski, and G. Fischer, *Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation*. Journal of Molecular Biology, 1998. **279**(2): p. 449-60.
14. Schiene-Fischer, C., J. Habazettl, F.X. Schmid, and G. Fischer, *The hsp70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond cis-trans isomerase*. Nature Structural Biology, 2002. **9**(6): p. 419-424.
15. Stewart, D.E., A. Sarkar, and J.E. Wampler, *Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures*. Journal of Molecular Biology, 1990. **214**(1): p. 253-60.
16. Jabs, A., M.S. Weiss, and R. Hilgenfeld, *Non-proline cis peptide bonds in proteins*. Journal of Molecular Biology, 1999. **286**(1): p. 291-304.
17. Maigret, B., D. Perahia, and B. Pullman, *Molecular orbital calculations on the conformation of polypeptides and proteins. IV. The conformation of the prolyl and hydroxyprolyl residues*. Journal of Theoretical Biology, 1970. **29**(2): p. 275-91.
18. Greenwood, A.I., M.J. Rogals, S. De, K.P. Lu, E.L. Kovrigin, and L.K. Nicholson, *Complete determination of the Pin1 catalytic domain thermodynamic cycle by NMR lineshape analysis*. Journal of Biomolecular NMR, 2011. **51**(1-2): p. 21-34.
19. Brandts, J.F., H.R. Halvorson, and M. Brennan, *Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues*. Biochemistry, 1975. **14**(22): p. 4953-63.
20. Lang, K., F.X. Schmid, and G. Fischer, *Catalysis of protein folding by prolyl isomerase*. Nature, 1987. **329**(6136): p. 268-70.
21. Kiefhaber, T., H.P. Grunert, U. Hahn, and F.X. Schmid, *Replacement of a cis proline simplifies the mechanism of ribonuclease T1 folding*. Biochemistry, 1990. **29**(27): p. 6475-80.
22. Fischer, G., H. Bang, and C. Mech, *Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides*. Biomed Biochim Acta, 1984. **43**(10): p. 1101-11.
23. Nagradova, N., *Enzymes catalyzing protein folding and their cellular functions*. Current Protein & Peptide Science, 2007. **8**(3): p. 273-282.
24. Fischer, G., B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber, and F.X. Schmid, *Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins*. Nature, 1989. **337**(6206): p. 476-8.
25. Harding, M.W., A. Galat, D.E. Uehling, and S.L. Schreiber, *A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase*. Nature, 1989. **341**(6244): p. 758-60.

26. Rahfeld, J.U., A. Schierhorn, K. Mann, and G. Fischer, *A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from Escherichia coli*. FEBS Letters, 1994. **343**(1): p. 65-9.
27. Sudol, M., P. Bork, A. Einbond, K. Kastury, T. Druck, M. Negrini, K. Huebner, and D. Lehman, *Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(24): p. 14733-41.
28. Quistgaard, E.M., P. Nordlund, and C. Low, *High-resolution insights into binding of unfolded polypeptides by the PPIase chaperone SlpA*. FASEB Journal, 2012. **26**(10): p. 4003-13.
29. Liu, C.P., Q.M. Zhou, D.J. Fan, and J.M. Zhou, *PPIase domain of trigger factor acts as auxiliary chaperone site to assist the folding of protein substrates bound to the crevice of trigger factor*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010. **42**(6): p. 890-901.
30. Fischer, G. and T. Aumuller, *Regulation of peptide bond cis/trans isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes*. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol 148, 2004. **148**: p. 105-150.
31. Pirkl, F., E. Fischer, S. Modrow, and J. Buchner, *Localization of the chaperone domain of FKBP52*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(40): p. 37034-37041.
32. Behrens, S., R. Maier, H. de Cock, F.X. Schmid, and C.A. Gross, *The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity*. EMBO Journal, 2001. **20**(1-2): p. 285-94.
33. Schmid, F.X., C. Frech, C. Scholz, and S. Walter, *Catalyzed and assisted protein folding of ribonuclease T1*. Biological Chemistry, 1996. **377**(7-8): p. 417-24.
34. Aumuller, T. and G. Fischer, *Bioactivity of folding intermediates studied by the recovery of enzymatic activity during refolding*. Journal of Molecular Biology, 2008. **376**(5): p. 1478-92.
35. Fanghanel, J. and G. Fischer, *Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases*. Free Radical Biology & Medicine, 2004. **9**: p. 3453-78.
36. Howard, B.A., R. Furumai, M.J. Campa, Z.N. Rabbani, Z. Vujaskovic, X.F. Wang, and E.F. Patz, *Stable RNA interference-mediated suppression of Cyclophilin A diminishes non-small-cell lung tumor growth in vivo*. Cancer Research, 2005. **65**(19): p. 8853-8860.
37. Chambraud, B., E. Sardin, J. Giustiniani, O. Dounane, M. Schumacher, M. Goedert, and E.E. Baulieu, *A role for FKBP52 in Tau protein function*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **107**(6): p. 2658-63.
38. Luban, J., K.L. Bossolt, E.K. Franke, G.V. Kalpana, and S.P. Goff, *Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1067-78.
39. Bosco, D.A., E.Z. Eisenmesser, S. Pochapsky, W.I. Sundquist, and D. Kern, *Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(8): p. 5247-5252.
40. Flisiak, R., A. Horban, P. Gallay, M. Bobardt, S. Selvarajah, A. Wiercinska-Drapalo, E. Siwak, I. Cielniak, J. Higersberger, J. Kierkus, C. Aeschlimann, P. Groscurin, V. Nicolas-Metral, J.M. Dumont, H. Porchet, R. Crabbe, and P. Scalfaro, *The cyclophilin inhibitor debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus*. Hepatology, 2008. **47**(3): p. 817-826.
41. Hopkins, S., B. DiMassimo, P. Rusnak, D. Heuman, J. Lalezari, A. Sluder, B. Scorneaux, S. Mosier, P. Kowalczyk, Y. Ribeill, J. Baugh, and P. Gallay, *The cyclophilin inhibitor SCY-635 suppresses viral replication and induces endogenous interferons in patients with chronic HCV genotype 1 infection*. Journal of Hepatology, 2012. **57**(1): p. 47-54.
42. Lawitz, E., E. Godofsky, R. Rouzier, T. Marbury, N. Tuan, J. Ke, M.M. Huang, J. Praestgaard, D. Serra, and T.G. Evans, *Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of the cyclophilin inhibitor NIM811 alone or in combination with pegylated interferon in HCV-infected patients receiving 14 days of therapy*. Antiviral Research, 2011. **89**(3): p. 238-245.
43. Ranganathan, R., K.P. Lu, T. Hunter, and J.P. Noel, *Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent*. Cell, 1997. **89**(6): p. 875-86.
44. Rangasamy, V., R. Mishra, G. Sondarva, S. Das, T.H. Lee, J.C. Bakowska, G. Tzivion, J.S. Malter, B. Rana, K.P. Lu, A. Kanthasamy, and A. Rana, *Mixed-lineage kinase 3 phosphorylates prolyl-isomerase Pin1 to regulate its nuclear translocation and cellular function*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(21): p. 8149-8154.
45. Zhou, X.Z., O. Kops, A. Werner, P.J. Lu, M. Shen, G. Stoller, G. Kullertz, M. Stark, G. Fischer, and K.P. Lu, *Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins*. Molecular Cell, 2000. **6**(4): p. 873-83.
46. Yaffe, M.B., M. Schutkowski, M. Shen, X.Z. Zhou, P.T. Stukenberg, J.U. Rahfeld, J. Xu, J. Kuang, M.W. Kirschner, G. Fischer, L.C. Cantley, and K.P. Lu, *Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism*. Science, 1997. **278**(5345): p. 1957-60.

47. Bao, L., A. Kimzey, G. Sauter, J.M. Sowadski, K.P. Lu, and D.G. Wang, *Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers*. American Journal of Pathology, 2004. **164**(5): p. 1727-1737.
48. Wulf, G., P. Garg, Y.C. Liou, D. Iglehart, and K.P. Lu, *Modeling breast cancer in vivo and ex vivo reveals an essential role of Pin1 in tumorigenesis*. Embo Journal, 2004. **23**(16): p. 3397-3407.
49. Lu, Z. and T. Hunter, *Prolyl isomerase Pin1 in cancer*. Cell Research, 2014. **24**(9): p. 1033-49.
50. Lam, P.B., L.N. Burga, B.P. Wu, E.W. Hofstatter, K.P. Lu, and G.M. Wulf, *Prolyl isomerase Pin1 is highly expressed in Her2-positive breast cancer and regulates erbB2 protein stability*. Mol. Cancer, 2008. **7**.
51. Rippmann, J.F., S. Hobbie, C. Daiber, B. Guilliard, M. Bauer, J. Birk, H. Nar, P. Garin-Chesa, W.J. Rettig, and A. Schnapp, *Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis*. Cell Growth & Differentiation, 2000. **11**(7): p. 409-416.
52. Shen, Z.J., S. Esnault, and J.S. Malter, *The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates the stability of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA in activated eosinophils*. Nature Immunology, 2005. **6**(12): p. 1280-1287.
53. Thorpe, J.R., S. Mosaheb, L. Hashemzadeh-Bonehi, N.J. Cairns, J.E. Kay, S.J. Morley, and S.L. Rulten, *Shortfalls in the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase protein Pin1 in neurons are associated with frontotemporal dementias*. Neurobiology of Disease, 2004. **17**(2): p. 237-249.
54. Lu, P.J., G. Wulf, X.Z. Zhou, P. Davies, and K.P. Lu, *The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein*. Nature, 1999. **399**(6738): p. 784-8.
55. Liou, Y.C., A. Sun, A. Ryo, X.Z. Zhou, Z.X. Yu, H.K. Huang, T. Uchida, R. Bronson, G. Bing, X. Li, T. Hunter, and K.P. Lu, *Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration*. Nature, 2003. **424**(6948): p. 556-61.
56. Pastorino, L., A. Sun, P.J. Lu, X.Z. Zhou, M. Balastik, G. Finn, G. Wulf, J. Lim, S.H. Li, X. Li, W. Xia, L.K. Nicholson, and K.P. Lu, *The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production (vol 440, 528, 2006)*. Nature, 2007. **446**(7133): p. 342-342.
57. Pastorino, L., S.L. Ma, M. Balastik, P. Huang, D. Pandya, L. Nicholson, and K.P. Lu, *Alzheimer's disease-related loss of Pin1 function influences the intracellular localization and the processing of AbetaPP*. Journal of Alzheimer's disease, 2012. **30**(2): p. 277-97.
58. Holzer, M., U. Gartner, A. Stobe, W. Hartig, H. Gruschka, M.K. Bruckner, and T. Arendt, *Inverse association of Pin1 and tau accumulation in Alzheimer's disease hippocampus*. Acta Neuropathologica, 2002. **104**(5): p. 471-481.
59. Ryo, A., T. Togo, T. Nakai, A. Hirai, M. Nishi, A. Yamaguchi, K. Suzuki, Y. Hirayasu, H. Kobayashi, K. Perrem, Y.C. Liou, and I. Aoki, *Prolyl-isomerase Pin1 accumulates in lewy bodies of parkinson disease and facilitates formation of alpha-synuclein inclusions*. Journal of Biol. Chemistry, 2006. **281**(7): p. 4117-25.
60. Rouviere, P.E. and C.A. Gross, *SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins*. Genes & Development, 1996. **10**(24): p. 3170-3182.
61. Tormo, A., M. Almiron, and R. Kolter, *surA, an Escherichia coli gene essential for survival in stationary phase*. Journal of Bacteriology, 1990. **172**(8): p. 4339-47.
62. Dartigalongue, C. and S. Raina, *A new heat-shock gene, ppiD, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in Escherichia coli*. EMBO Journal, 1998. **17**(14): p. 3968-80.
63. Wahlstrom, E., M. Vitikainen, V.P. Kontinen, and M. Sarvas, *The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in Bacillus subtilis*. Microbiology-Sgm, 2003. **149**: p. 569-577.
64. Kontinen, V.P. and M. Sarvas, *The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in Bacillus subtilis and sets a limit for high-level secretion*. Molecular Microbiology, 1993. **8**(4): p. 727-37.
65. Heikkinen, O., R. Seppala, H. Tossavainen, S. Heikkinen, H. Koskela, P. Permi, and I. Kilpelainen, *Solution structure of the parvulin-type PPIase domain of Staphylococcus aureus PrsA--implications for the catalytic mechanism of parvulins*. BMC Structural Biology, 2009. **9**: p. 17.
66. Hani, J., G. Stumpf, and H. Domdey, *Ptf1 Encodes an Essential Protein in Saccharomyces-Cerevisiae, Which Shows Strong Homology with a New Putative Family of Ppiases*. FEBS Letters, 1995. **365**(2-3): p. 198-202.
67. Hani, J., B. Schelbert, A. Bernhardt, H. Domdey, G. Fischer, K. Wiebauer, and J.U. Rahfeld, *Mutations in a peptidylprolyl-cis/trans-isomerase gene lead to a defect in 3' end formation of a pre-mRNA in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(1): p. 108-116.
68. Landrieu, I., L. De Veylder, J.S. Fruchart, B. Odaert, P. Casteels, D. Portetelle, M. Van Montagu, D. Inze, and G. Lippens, *The Arabidopsis thaliana PIN1At gene encodes a single-domain phosphorylation-dependent peptidyl prolyl cis/trans isomerase*. Journal of Biol. Chemistry, 2000. **275**(14): p. 10577-81.
69. Wang, Y., C. Liu, D.W. Yang, H. Yu, and Y.C. Liou, *Pin1At Encoding a Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase Regulates Flowering Time in Arabidopsis*. Molecular Cell, 2010. **37**(1): p. 112-122.

70. Maleszka, R., A. Lupas, S.D. Hanes, and G.L. Miklos, *The dodo gene family encodes a novel protein involved in signal transduction and protein folding*. *Gene*, 1997. **203**(2): p. 89-93.
71. Hsu, T., D. McRackan, T.S. Vincent, and H. Gert de Couet, *Drosophila Pin1 prolyl isomerase Dodo is a MAP kinase signal responder during oogenesis*. *Nature Cell Biology*, 2001. **3**(6): p. 538-43.
72. Lu, K.P., S.D. Hanes, and T. Hunter, *A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis*. *Nature*, 1996. **380**(6574): p. 544-7.
73. Surmacz, T.A., E. Bayer, J.U. Rahfeld, G. Fischer, and P. Bayer, *The N-terminal basic domain of human parvulin hPar14 is responsible for the entry to the nucleus and high-affinity DNA-binding*. *Journal of Molecular Biology*, 2002. **321**(2): p. 235-247.
74. Saningong, A.D. and P. Bayer, *Human DNA-binding peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Par14 is cell cycle dependently expressed and associates with chromatin in vivo*. *BMC Biochemistry*, 2015. **16**(1): p. 4.
75. Kessler, D., P. Papatheodorou, T. Stratmann, E.A. Dian, C. Hartmann-Fatu, J. Rassow, P. Bayer, and J.W. Mueller, *The DNA binding parvulin Par17 is targeted to the mitochondrial matrix by a recently evolved prepeptide uniquely present in Hominidae*. *BMC Biology*, 2007. **5**: p. 37.
76. Thiele, A., K. Krentzlin, F. Erdmann, D. Rauh, G. Hause, J. Zerweck, S. Kilka, S. Posel, G. Fischer, M. Schutkowski, and M. Weiwad, *Parvulin 17 Promotes Microtubule Assembly by Its Peptidyl-Prolyl Cis/Trans Isomerase Activity*. *Journal of Molecular Biology*, 2011. **411**(4): p. 896-909.
77. Landrieu, I., J.M. Wieruszkeski, R. Wintjens, D. Inze, and G. Lippens, *Solution structure of the single-domain prolyl cis/trans isomerase PIN1At from Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Biology*, 2002. **320**(2): p. 321-32.
78. Hanes, S.D., P.R. Shank, and K.A. Bostian, *Sequence and Mutational Analysis of Ess1, a Gene Essential for Growth in Saccharomyces-Cerevisiae*. *Yeast*, 1989. **5**(1): p. 55-72.
79. Maleszka, R., S.D. Hanes, R.L. Hackett, H.G. deCouet, and G.L.G. Miklos, *The Drosophila melanogaster dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. **93**(1): p. 447-451.
80. Dolinski, K., S. Muir, M. Cardenas, and J. Heitman, *All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. **94**(24): p. 13093-13098.
81. Vitikainen, M., I. Lappalainen, R. Seppala, H. Antelmann, H. Boer, S. Taira, H. Savilahti, M. Hecker, M. Vihinen, M. Sarvas, and V.P. Kontinen, *Structure-function analysis of PrsA reveals roles for the parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(18): p. 19302-19314.
82. Sarvas, M., C.R. Harwood, S. Bron, and J.M. van Dijl, *Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004. **1694**(1-3): p. 311-27.
83. Waness, A., *Revisiting Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections*. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2010. **2**(1): p. 49-56.
84. Rubinstein, E., M.H. Kollef, and D. Nathwani, *Pneumonia Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 2008. **46**(Supplement 5): p. S378-S385.
85. Reinert, R.R., *The antimicrobial resistance profile of Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2009. **15**: p. 7-11.
86. Xu, G.G. and F.A. Etkorn, *Convergent synthesis of alpha-ketoamide inhibitors of Pin1*. *Organic Letters*, 2010. **12**(4): p. 696-9.
87. Moore, J.D. and A. Potter, *Pin1 inhibitors: Pitfalls, progress and cellular pharmacology*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013. **23**(15): p. 4283-4291.
88. Xu, G.G., Y. Zhang, A.Y. Mercedes-Camacho, and F.A. Etkorn, *A reduced-amide inhibitor of Pin1 binds in a conformation resembling a twisted-amide transition state*. *Biochemistry*, 2011. **50**(44): p. 9545-50.
89. Justice, S.S., D.A. Hunstad, J.R. Harper, A.R. Duguay, J.S. Pinkner, J. Bann, C. Frieden, T.J. Silhavy, and S.J. Hultgren, *Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2005. **187**(22): p. 7680-6.
90. Liu, J. and C.T. Walsh, *Peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from Escherichia coli: a periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. **87**(11): p. 4028-32.
91. Hayano, T., N. Takahashi, S. Kato, N. Maki, and M. Suzuki, *Two distinct forms of peptidylprolyl-cis-trans-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of Escherichia coli cells*. *Biochemistry*, 1991. **30**(12): p. 3041-8.
92. Scholz, C., B. Eckert, F. Hagn, P. Schaarschmidt, J. Balbach, and F.X. Schmid, *SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities*. *Biochemistry*, 2006. **45**(1): p. 20-33.

93. Horne, S.M. and K.D. Young, *Escherichia coli and other species of the Enterobacteriaceae encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins*. Archives of Microbiology, 1995. **163**(5): p. 357-65.
94. Callebaut, I. and J.P. Morion, *Trigger factor, one of the Escherichia coli chaperone proteins, is an original member of the FKBP family*. FEBS Letters, 1995. **374**(2): p. 211-5.
95. Ferbitz, L., T. Maier, H. Patzelt, B. Bukau, E. Deuerling, and N. Ban, *Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins*. Nature, 2004. **431**(7008): p. 590-6.
96. Rahfeld, J.U., K.P. Rucknagel, B. Schelbert, B. Ludwig, J. Hacker, K. Mann, and G. Fischer, *Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin*. FEBS Letters, 1994. **352**(2): p. 180-4.
97. Kuhlewein, A., G. Voll, B. Hernandez Alvarez, H. Kessler, G. Fischer, J.U. Rahfeld, and G. Gemmecker, *Solution structure of Escherichia coli Par10: The prototypic member of the Parvulin family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases*. Protein Science, 2004. **13**(9): p. 2378-87.
98. Scholz, C., J. Rahfeld, G. Fischer, and F.X. Schmid, *Catalysis of protein folding by parvulin*. Journal of Molecular Biology, 1997. **273**(3): p. 752-62.
99. Hennig, L., C. Christner, M. Kipping, B. Schelbert, K.P. Rucknagel, S. Grabley, G. Kullertz, and G. Fischer, *Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone*. Biochemistry, 1998. **37**(17): p. 5953-60.
100. Chao, S.H., A.L. Greenleaf, and D.H. Price, *Juglone, an inhibitor of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1, also directly blocks transcription*. Nucleic Acids Research, 2001. **29**(3): p. 767-73.
101. Uchida, T., M. Takamiya, M. Takahashi, H. Miyashita, H. Ikeda, T. Terada, Y. Matsuo, M. Shirouzu, S. Yokoyama, F. Fujimori, and T. Hunter, *Pin1 and Par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation*. Chemistry & Biology, 2003. **10**(1): p. 15-24.
102. Wildemann, D., F. Erdmann, B.H. Alvarez, G. Stoller, X.Z. Zhou, J. Fanghanel, M. Schutkowski, K.P. Lu, and G. Fischer, *Nanomolar inhibitors of the peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1 from combinatorial peptide libraries*. Journal of Medicinal Chemistry, 2006. **49**(7): p. 2147-50.
103. Zhang, Y., S. Daum, D. Wildemann, X.Z. Zhou, M.A. Verdecia, M.E. Bowman, C. Lucke, T. Hunter, K.P. Lu, G. Fischer, and J.P. Noel, *Structural basis for high-affinity peptide inhibition of human Pin1*. ACS Chemical Biology, 2007. **2**(5): p. 320-328.
104. Zhang, Y.X., S. Füssel, U. Reimer, M. Schutkowski, and G. Fischer, *Substrate-based design of reversible Pin1 inhibitors*. Biochemistry, 2002. **41**(39): p. 11868-11877.
105. Daum, S., F. Erdmann, G. Fischer, B. Feaux de Lacroix, A. Hessamian-Alinejad, S. Houben, W. Frank, and M. Braun, *Aryl indanyl ketones: efficient inhibitors of the human peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1*. Angewandte Chemie, International Edition, 2006. **45**(44): p. 7454-8.
106. Sekerina, E., J.U. Rahfeld, J. Muller, J. Fanghanel, C. Rascher, G. Fischer, and P. Bayer, *NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein*. Journal of Molecular Biology, 2000. **301**(4): p. 1003-17.
107. Behrsin, C.D., M.L. Bailey, K.S. Bateman, K.S. Hamilton, L.M. Wahl, C.J. Brandl, B.H. Shilton, and D.W. Litchfield, *Functionally Important Residues in the Peptidyl-prolyl Isomerase Pin1 Revealed by Unigenic Evolution*. Journal of Molecular Biology, 2007. **365**(4): p. 1143-1162.
108. Schelbert, B., *Untersuchungen zur Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase Parvulin aus Escherichia coli und dem homologen Protein PTF1 aus Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D. Thesis, in Institute of Biochemistry and Biotechnology. 1998, Martin Luther University Halle-Wittenberg: Halle (Saale), Germany. p. 127.
109. Waris, G. and H. Ahsan, *Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions*. Journal of Carcinogenesis, 2006. **5**: p. 14.
110. Liochev, S.I., *Reactive oxygen species and the free radical theory of aging*. Free Radical Biology & Medicine, 2013. **60**: p. 1-4.
111. Sabharwal, S.S. and P.T. Schumacker, *Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?* Nature Reviews Cancer, 2014. **14**(11): p. 709-21.
112. Wood, Z.A., E. Schroder, J. Robin Harris, and L.B. Poole, *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends in Biochemical Sciences, 2003. **28**(1): p. 32-40.
113. Storz, G., F.S. Jacobson, L.A. Tartaglia, R.W. Morgan, L.A. Silveira, and B.N. Ames, *An Alkyl Hydroperoxide Reductase Induced by Oxidative Stress in Salmonella-Typhimurium and Escherichia-Coli - Genetic-Characterization and Cloning of Ahp*. Journal of Bacteriology, 1989. **171**(4): p. 2049-2055.
114. Link, A.J., K. Robison, and G.M. Church, *Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of Escherichia coli K-12*. Electrophoresis, 1997. **18**(8): p. 1259-313.
115. Wood, Z.A., L.B. Poole, R.R. Hantgan, and P.A. Karplus, *Dimers to doughnuts: Redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins*. Biochemistry, 2002. **41**(17): p. 5493-5504.

116. Parsonage, D., P.A. Karplus, and L.B. Poole, *Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(24): p. 8209-14.
117. Chauhan, R. and S.C. Mande, *Characterization of the Mycobacterium tuberculosis H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity*. The Biochemical Journal, 2001. **354**(Pt 1): p. 209-15.
118. Wood, Z.A., L.B. Poole, and P.A. Karplus, *Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling*. Science, 2003. **300**(5619): p. 650-653.
119. Rabilloud, T., M. Heller, F. Gasnier, S. Luche, C. Rey, R. Aebersold, M. Benahmed, P. Louisot, and J. Lunardi, *Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(22): p. 19396-401.
120. Parsonage, D., D.S. Youngblood, G.N. Sarma, Z.A. Wood, P.A. Karplus, and L.B. Poole, *Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin*. Biochemistry, 2005. **44**(31): p. 10583-92.
121. Dip, P.V., N. Kamariah, W. Nartey, C. Beushausen, V.A. Kostyuchenko, T.S. Ng, S.M. Lok, W.G. Saw, F. Eisenhaber, B. Eisenhaber, and G. Gruber, *Key roles of the Escherichia coli AhpC C-terminus in assembly and catalysis of alkylhydroperoxide reductase, an enzyme essential for the alleviation of oxidative stress*. Biochimica et Biophysica Acta, 2014. **1837**(12): p. 1932-43.
122. Hall, A., P.A. Karplus, and L.B. Poole, *Typical 2-Cys peroxiredoxins - structures, mechanisms and functions*. Febs Journal, 2009. **276**(9): p. 2469-2477.
123. Jonsson, T.J. and W.T. Lowther, *The peroxiredoxin repair proteins*. Sub-cellular Biochemistry, 2007. **44**: p. 115-41.
124. Lee, S.P., Y.S. Hwang, Y.J. Kim, K.S. Kwon, H.J. Kim, K. Kim, and H.Z. Chae, *Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(32): p. 29826-32.
125. Gonzalez-Flecha, B. and B. Dimple, *Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1997. **179**(2): p. 382-8.
126. Malesevic, M., A. Poehlmann, B. Hernandez Alvarez, A. Diessner, M. Trager, J.U. Rahfeld, G. Jahreis, S. Liebscher, F. Bordusa, G. Fischer, and C. Lucke, *The Protein-Free IANUS Peptide Array Uncovers Interaction Sites between Escherichia coli Parvulin 10 and Alkyl Hydroperoxide Reductase*. Biochemistry, 2010. **49**.
127. Yu, C., M. Malesevic, G. Jahreis, M. Schutkowski, G. Fischer, and C. Schiene-Fischer, *The Architecture of Protein-Ligand Binding Sites Revealed through Template-Assisted Intramolecular Peptide-Peptide Interactions*. Angewandte Chemie International Edition, 2005. **44**(9): p. 1408-1412.
128. Whittaker, J.W., *Cell-free protein synthesis: the state of the art*. Biotech. Letters, 2013. **35**(2): p. 143-152.
129. Nehete, J.Y., R.S. Bhambar, M.R. Narkhede, and S.R. Gawali, *Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications*. Pharmacognosy Reviews, 2013. **7**(14): p. 107-116.
130. Terpe, K., *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **72**(2): p. 211-222.
131. Schmidt, F.R., *Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. **65**(4): p. 363-372.
132. He, M.Y., Y.Z. He, Q. Luo, and M.R. Wang, *From DNA to protein: No living cells required*. Process Biochemistry, 2011. **46**(3): p. 615-620.
133. Machova, Z., R. von Eggelkraut-Gottanka, N. Wehofsky, F. Bordusa, and A.G. Beck-Sickinger, *Expressed enzymatic ligation for the semisynthesis of chemically modified proteins*. Angewandte Chemie, International Edition, 2003. **42**(40): p. 4916-8.
134. Chandrudu, S., P. Simerska, and I. Toth, *Chemical Methods for Peptide and Protein Production*. Molecules, 2013. **18**(4): p. 4373-4388.
135. Noren, C., S. Anthony-Cahill, M. Griffith, and P. Schultz, *A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins*. Science, 1989. **244**(4901): p. 182-188.
136. Budisa, N., C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. Dong, L. Moroder, and R. Huber, *Toward the experimental codon reassignment in vivo: protein building with an expanded amino acid repertoire*. The FASEB Journal, 1999. **13**(1): p. 41-51.
137. Hendrickson, T.L., V. de Crecy-Lagard, and P. Schimmel, *Incorporation of nonnatural amino acids into proteins*. Annual Review of Biochemistry, 2004. **73**: p. 147-76.
138. Walsh, C.T., S. Garneau-Tsodikova, and G.J. Gatto, *Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications*. Angewandte Chemie-International Edition, 2005. **44**(45): p. 7342-7372.

139. Huang, Y., G. Jahreis, G. Fischer, and C. Lucke, *Atomic Polarizability Dominates the Electronic Properties of Peptide Bonds upon Thioxo or Selenoxo Substitution*. *Chemistry-a European Journal*, 2012. **18**(32): p. 9841-9848.
140. David, R., M.P. Richter, and A.G. Beck-Sickinger, *Expressed protein ligation. Method and applications*. *European Biophysics Journal*, 2004. **271**(4): p. 663-77.
141. Sewald, N. and H.D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*. Weinheim, 2002: Wiley-VCH.
142. Merrifield, R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide*. *Journal of the American Chemical Society*, 1963. **85**(14): p. 2149-&.
143. Baca, M., T.W. Muir, M. Schnolzer, and S.B.H. Kent, *Chemical Ligation of Cysteine-Containing Peptides - Synthesis of a 22-Kda Tethered Dimer of Hiv-1 Protease*. *Journal of the American Chemical Society*, 1995. **117**(7): p. 1881-1887.
144. Kochendoerfer, G.G., S.Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H.Y. Shao, C.L. Hunter, D.W. Low, E.N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguian, P.J. Keogh, H. Porter, S.M. Stratton, M.C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J.J. Levy, L.P. Miranda, M.M. Crnogorac, S. Kalbag, P. Botti, J. Schindler-Horvat, L. Savatski, J.W. Adamson, A. Kung, S.B.H. Kent, and J.A. Bradburne, *Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein*. *Science*, 2003. **299**(5608): p. 884-887.
145. Schmohl, L. and D. Schwarzer, *Chemo-enzymatic three-fragment assembly of semisynthetic proteins*. *Journal of Peptide Science*, 2014.
146. Dawson, P.E., T.W. Muir, I. Clark-Lewis, and S.B. Kent, *Synthesis of proteins by native chemical ligation*. *Science*, 1994. **266**(5186): p. 776-9.
147. Bordusa, F., D. Ullmann, C. Elsner, and H.D. Jakubke, *Substrate mimetic mediated peptide synthesis: An irreversible ligation strategy that is independent of substrate specificity*. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 1997. **36**(22): p. 2473-2475.
148. Muir, T.W., D. Sondhi, and P.A. Cole, *Expressed protein ligation: a general method for protein engineering*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(12): p. 6705-10.
149. Evans, T.C., Jr., J. Benner, and M.Q. Xu, *The in vitro ligation of bacterially expressed proteins using an intein from Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. of Biol. Chemistry*, 1999. **274**(7): p. 3923-6.
150. Saxon, E., J.I. Armstrong, and C.R. Bertozzi, *A Traceless Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds*. *Organic Letters*, 2000. **2**(14): p. 2141-2143.
151. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001. **40**(11): p. 2004-2021.
152. Palomo, J.M., *Diels-Alder Cycloaddition in Protein Chemistry*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2010. **2010**(33): p. 6303-6314.
153. Smyth, D.G., O.O. Blumenfeld, and W. Konigsberg, *Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids*. *Biochemical Journal*, 1964. **91**(3): p. 589-595.
154. Rose, K., *Facile Synthesis of Homogeneous Artificial Proteins*. *Journal of the American Chemical Society*, 1994. **116**(1): p. 30-33.
155. Schnolzer, M. and S.B. Kent, *Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease*. *Science*, 1992. **256**(5054): p. 221-5.
156. Bordusa, F., *Nonconventional amide bond formation catalysis: programming enzyme specificity with substrate mimetics*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000. **33**(5): p. 469-85.
157. Bordusa, F., *Substrate mimetics in protease catalysis: characteristics, kinetics, and synthetic utility*. *Current Protein & Peptide Science*, 2002. **3**(2): p. 159-80.
158. Sekizaki, H., K. Itoh, E. Toyota, and K. Tanizawa, *Trypsin-catalyzed peptide synthesis and various p-guanidinophenyl esters as acyl donors*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1996. **44**(8): p. 1585-7.
159. Chang, T.K., D.Y. Jackson, J.P. Burnier, and J.A. Wells, *Subtiligase - a Tool for Semisynthesis of Proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994. **91**(26): p. 12544-12548.
160. Jackson, D.Y., J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, and J.A. Wells, *A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues*. *Science*, 1994. **266**(5183): p. 243-7.
161. Cerovsky, V. and F. Bordusa, *Protease-catalyzed fragment condensation via substrate mimetic strategy: a useful combination of solid-phase peptide synthesis with enzymatic methods*. *Journal of Peptide Research*, 2000. **55**(4): p. 325-9.
162. Hanahan, D., *Studies on Transformation of Escherichia-Coli with Plasmids*. *Journal of Molecular Biology*, 1983. **166**(4): p. 557-580.
163. Villarej, Mr and I. Zabin, *Beta-Galactosidase from Termination and Deletion Mutant Strains*. *Journal of Bacteriology*, 1974. **120**(1): p. 466-474.
164. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of Bacteriophage-T7 Rna-Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes*. *Journal of Molecular Biology*, 1986. **189**(1): p. 113-130.

165. Bertani, G., *Studies on Lysogenesis. 1. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia-Coli*. Journal of Bacteriology, 1951. **62**(3): p. 293-300.
166. Harwood, C.R., *Chemically defined growth media and supplements*, in *Molecular Biological Methods for Bacillus*, S.M. Cutting, Editor. 1990, John Wiley & Sons Ltd: Chichester, United Kingdom.
167. Walker, J., E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S.e. Duvaud, M. Wilkins, R. Appel, and A. Bairoch, *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, in *The Proteomics Protocols Handbook*. 2005, Humana Press. p. 571-607.
168. Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J.H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**(17): p. 3389-3402.
169. Green, R.M. and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Fourth Edition ed. 2012, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
170. Hochuli, E., W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, and D. Stuber, *Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent*. Nature Biotechnology, 1988. **6**(11): p. 1321-1325.
171. Hengen, P., *Purification of His-Tag fusion proteins from Escherichia coli*. Trends in Biochemical Sciences, 1995. **20**(7): p. 285-6.
172. Lathe, G.H. and C.R.J. Ruthven, *The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water*. Biochemical Journal, 1956. **62**(4): p. 665-674.
173. Evans, T.J.T. and M.Q. Xu, *Mechanistic and kinetic considerations of protein splicing*. Chemical Preview, 2002. **102**(12): p. 4869-84.
174. Xu, M.Q. and F.B. Perler, *The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation*. EMBO Journal, 1996. **15**(19): p. 5146-53.
175. NEB, *New England Biolabs IMPACT™-TWIN Purification, Ligation and Cyclization of Recombinant Proteins Using Self-Cleavable Affinity Tags*. Catalog #E6950S, 2008. **Version 1.5**(1): p. 64.
176. Chong, S., F.B. Mersha, D.G. Comb, M.E. Scott, D. Landry, L.M. Vence, F.B. Perler, J. Benner, R.B. Kucera, C.A. Hirvonen, J.J. Pelletier, H. Paulus, and M.Q. Xu, *Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element*. Gene, 1997. **192**(2): p. 271-81.
177. Chang, W.C. and P.D. White, *Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. 2000, Oxford, UK: Oxford University Press.
178. *Peptide Synthesis and Applications*. Methods in Molecular Biology, ed. J. Howl. Vol. 298. 2005, New York, NY: Humana Press Inc.
179. Benoiton, N.L., *Chemistry of Peptide Synthesis*. 2005, Ottawa, Ontario: CRC Press.
180. Bollhagen, R., M. Schmiedberger, K. Barlos, and E. Grell, *A New Reagent for the Cleavage of Fully Protected Peptides Synthesized on 2-Chlorotriyl Chloride Resin*. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 1994(22): p. 2559-2560.
181. Egelkraut-Gottanka, *Peptide thioester formation using standard Fmoc-chemistry*. Tetrahedron Letters, 2003. **44**: p. 3551-3554.
182. Bordusa, F., *Proteases in organic synthesis*. Chemical Preview, 2002. **102**(12): p. 4817-68.
183. Liebscher, S., M. Schopf, T. Aumuller, A. Sharkhuukhen, A. Pech, E. Hoss, C. Parthier, G. Jahreis, M.T. Stubbs, and F. Bordusa, *N-terminal protein modification by substrate-activated reverse proteolysis*. Angewandte Chemie, International Edition, 2014. **53**(11): p. 3024-8.
184. Dawson, *Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(19): p. 4325-4329.
185. Thormann, M., S. Thust, H.J. Hofmann, and F. Bordusa, *Protease-catalyzed hydrolysis of substrate mimetics (inverse substrates): A new approach reveals a new mechanism*. Biochemistry, 1999. **38**(19): p. 6056-62.
186. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
187. Syrový, I. and Z. Hodný, *Staining and Quantification of Proteins Separated by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis*. Journal of Chromatography-Biomedical Applications, 1991. **569**(1-2): p. 175-196.
188. Nesterenko, M.V., M. Tilley, and S.J. Upton, *A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1994. **28**(3): p. 239-42.
189. Schagger, H. and G. von Jagow, *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form*. Analytical Biochemistry, 1991. **199**(2): p. 223-31.
190. Fenn, J.B., M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse, *Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.

191. Ferrige, A.G., M.J. Seddon, J. Skilling, and N. Ordsmith, *The Application of Maxent to High-Resolution Mass-Spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1992. **6**(12): p. 765-770.
192. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2005. **1751**(2): p. 119-139.
193. Greenfield, N.J., *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. Nature Protocols, 2006. **1**(6): p. 2876-90.
194. Myers, J.K., C.N. Pace, and J.M. Scholtz, *Helix propensities are identical in proteins and peptides*. Biochemistry, 1997. **36**(36): p. 10923-10929.
195. Bohm, G., R. Muhr, and R. Jaenicke, *Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks*. Protein Engineering, 1992. **5**(3): p. 191-5.
196. Noda, L.H., S.A. Kuby, and H.A. Lardy, *Properties of Thioesters - Kinetics of Hydrolysis in Dilute Aqueous Media*. Journal of the American Chemical Society, 1953. **75**(4): p. 913-917.
197. Benesch, R.E. and R. Benesch, *The Acid Strength of the -Sh Group in Cysteine and Related Compounds*. Journal of the American Chemical Society, 1955. **77**(22): p. 5877-5881.
198. Polgar, L., *Spectrophotometric Determination of Mercaptide Ion, an Activated Form of Sh-Group in Thiol Enzymes*. FEBS Letters, 1974. **38**(2): p. 187-190.
199. Donovan, J.W., *Spectrophotometric Titration of Sulfhydryl + Phenolic Groups of Aldolase*. Biochemistry, 1964. **3**(1): p. 67-&.
200. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959. **82**(1): p. 70-7.
201. Riddles, P.W., R.L. Blakeley, and B. Zerner, *Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)-a reexamination*. Analytical Biochemistry, 1979. **94**(1): p. 75-81.
202. Cheng, Y. and W.H. Prusoff, *Relationship between Inhibition Constant (K1) and Concentration of Inhibitor Which Causes 50 Per Cent Inhibition (I50) of an Enzymatic-Reaction*. Biochemical Pharmacology, 1973. **22**(23): p. 3099-3108.
203. Wishart, D.S., C.G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H.J. Dyson, E. Oldfield, J.L. Markley, and B.D. Sykes, *H-1, C-13 and N-15 Chemical-Shift Referencing in Biomolecular Nmr*. Journal of Biomolecular NMR, 1995. **6**(2): p. 135-140.
204. Piotto, M., V. Saudek, and V. Sklenar, *Gradient-Tailored Excitation for Single-Quantum Nmr-Spectroscopy of Aqueous-Solutions*. Journal of Biomolecular NMR, 1992. **2**(6): p. 661-665.
205. Mulder, F.A.A., D. Schipper, R. Bott, and R. Boelens, *Altered flexibility in the substrate-binding site of related native and engineered high-alkaline Bacillus subtilisins*. Journal of Molecular Biology, 1999. **292**(1): p. 111-123.
206. Brown, A.J., *Enzyme action*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1902. **81**(0): p. 373-388.
207. Michaelis, L., Menten, M. L., *Die Kinetik der Invertinwirkung*. Biochem. Zeitschrift, 1913. **49**: p. 333-369.
208. Garcia-Echeverria, C., J.L. Kofron, P. Kuzmic, V. Kishore, and D.H. Rich, *Continuous fluorimetric direct (uncoupled) assay for peptidyl prolyl cis-trans isomerases*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(7): p. 2758-2759.
209. Hillas, P.J., F.S. del Alba, J. Oyarzabal, A. Wilks, and P.R. Ortiz De Montellano, *The AhpC and AhpD antioxidant defense system of Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(25): p. 18801-9.
210. Iyer, K.S. and W.A. Klee, *Direct spectrophotometric measurement of the rate of reduction of disulfide bonds. The reactivity of the disulfide bonds of bovine -lactalbumin*. Journal of Biological Chemistry, 1973. **248**(2): p. 707-10.
211. Shuker, S.B., P.J. Hajduk, R.P. Meadows, and S.W. Fesik, *Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR*. Science, 1996. **274**(5292): p. 1531-4.
212. Gay, G.D., *Spectroscopic characterization of the growing polypeptide chain of the barley chymotrypsin inhibitor-2*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **335**(1): p. 1-7.
213. Paz, A., T. Zeev-Ben-Mordehai, M. Lundqvist, E. Sherman, E. Mylonas, L. Weiner, G. Haran, D.I. Svergun, F.A.A. Mulder, J.L. Sussman, and I. Silman, *Biophysical characterization of the unstructured cytoplasmic domain of the human neuronal adhesion protein neuroligin 3*. Biophysical Journal, 2008. **95**(4): p. 1928-1944.
214. Kofron, J.L., P. Kuzmic, V. Kishore, G. Gemmecker, S.W. Fesik, and D.H. Rich, *Lithium-Chloride Perturbation of Cis-Trans Peptide-Bond Equilibria - Effect on Conformational Equilibria in Cyclosporine-a and on Time-Dependent Inhibition of Cyclophilin*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(7): p. 2670-2675.
215. Garcia-Echeverria, C., J.L. Kofron, P. Kuzmic, and D.H. Rich, *A continuous spectrophotometric direct assay for peptidyl prolyl cis-trans isomerases*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993. **191**(1): p. 70-5.
216. Cleland, W.W., *The use of pH studies to determine chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions*. Methods in Enzymology, 1982. **87**: p. 390-405.

217. Thurlkill, R.L., G.R. Grimsley, J.M. Scholtz, and C.N. Pace, *pK values of the ionizable groups of proteins*. Protein Science, 2006. **15**(5): p. 1214-1218.
218. Whitesides, G.M., J.E. Lilburn, and R.P. Szajewski, *Rates of Thiol-Disulfide Interchange Reactions between Mono- and Dithiols and Ellmans Reagent*. Journal of Organic Chemistry, 1977. **42**(2): p. 332-338.
219. Zoldak, G., T. Aumuller, C. Lucke, J. Hritz, C. Ostenbrink, G. Fischer, and F.X. Schmid, *A Library of Fluorescent Peptides for Exploring the Substrate Specificities of Prolyl Isomerases*. Biochemistry, 2009. **48**(43): p. 10423-10436.
220. Rhee, S.G., *Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger*. Experimental & Molecular Medicine, 1999. **31**: p. 53-59.
221. Sastry, M.S.R., W.B. Zhou, and F. Baneyx, *Integrity of N- and C-termini is important for E. coli Hsp31 chaperone activity*. Protein Science, 2009. **18**(7): p. 1439-1447.
222. Jacobson, F.S., R.W. Morgan, M.F. Christman, and B.N. Ames, *An Alkyl Hydroperoxide Reductase from Salmonella-Typhimurium Involved in the Defense of DNA against Oxidative Damage - Purification and Properties*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(3): p. 1488-1496.
223. Evans, T.C., Jr., J. Benner, and M.Q. Xu, *The cyclization and polymerization of bacterially expressed proteins using modified self-splicing inteins*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(26): p. 18359-63.
224. Pezza, J.A., K.N. Allen, and D.R. Tolan, *Intein-mediated purification of a recombinantly expressed peptide*. Chemical Communications (Cambridge, England), 2004(21): p. 2412-3.
225. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. 2006, New York: Springer-Verlag.
226. Yaron, A., A. Carmel, and E. Katchalskikatzir, *Intramolecularly Quenched Fluorogenic Substrates for Hydrolytic Enzymes*. Analytical Biochemistry, 1979. **95**(1): p. 228-235.
227. Turchiello, R.F., M.T. Lamy-Freund, I.Y. Hirata, L. Juliano, and A.S. Ito, *Ortho-aminobenzoic acid as a fluorescent probe for the interaction between peptides and micelles*. Biophysical Chemistry, 1998. **73**(3): p. 217-25.
228. Ito, A.S., R.D.F. Turchiello, I.Y. Hirata, M.H.S. Cezari, M. Meldal, and L. Juliano, *Fluorescent properties of amino acids labeled with ortho-aminobenzoic acid*. Biospectroscopy, 1998. **4**(6): p. 395-402.
229. Diessner, A., *Semisynthese fluoreszenzmarkierter Parvulin 10 Derivate, Diploma Thesis*, in Institute of Biochemistry and Biotechnology. 2008, Martin Luther University Halle-Wittenberg: Halle (Saale), Germany.
230. Thomas, K.M., D. Naduthambi, and N.J. Zondlo, *Electronic Control of Amide cis-trans Isomerism via the Aromatic-Prolyl Interaction*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(7): p. 2216-2217.
231. Bhattacharyya, R. and P. Chakrabarti, *Stereospecific interactions of proline residues in protein structures and complexes*. Journal of Molecular Biology, 2003. **331**(4): p. 925-40.
232. Fields, G.B., Z. Tian, and G. Barany, *Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis*. In "Synthetic Peptides: A User's Guide", ed. E. G.A. Grant. 1992, New York: W.H. Freeman & Co.
233. Merrifield, B., *The chemical synthesis of proteins*. Protein Science, 1996. **5**(9): p. 1947-51.
234. Swain, A.L., M.M. Miller, J. Green, D.H. Rich, J. Schneider, S.B. Kent, and A. Wlodawer, *X-ray crystallographic structure of a complex between a synthetic protease of human immunodeficiency virus 1 and a substrate-based hydroxyethylamine inhibitor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(22): p. 8805-9.
235. Nishiuchi, Y., T. Inui, H. Nishio, J. Bodi, T. Kimura, F.I. Tsuji, and S. Sakakibara, *Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(23): p. 13549-54.
236. Dawson, P.E. and S.B. Kent, *Synthesis of native proteins by chemical ligation*. Annual Review of Biochemistry, 2000. **69**: p. 923-60.
237. Tam, J.P. and Q.T. Yu, *Methionine ligation strategy in the biomimetic synthesis of parathyroid hormones*. Biopolymers, 1998. **46**(5): p. 319-327.
238. Alves, D.A., D. Esser, R.J. Broadbridge, A.P. Beevers, C.P. Chapman, C.E. Winsor, and J.R. Betley, *Synthesis and use of a pseudo-cysteine for native chemical ligation*. Journal of Pep. Science, 2003. **9**(4): p. 221-8.
239. Yan, L.Z. and P.E. Dawson, *Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(4): p. 526-533.
240. Crich, D. and A. Banerjee, *Native Chemical Ligation at Phenylalanine*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(33): p. 10064-10065.
241. Quaderer, R., A. Sewing, and D. Hilvert, *Selenocysteine-Mediated Native Chemical Ligation*. Helvetica Chimica Acta, 2001. **84**(5): p. 1197-1206.
242. Schechter, I. and A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967. **27**(2): p. 157-162.

243. Chang, C.D. and J. Meienhofer, *Solid-Phase Peptide-Synthesis Using Mild Base Cleavage of Nalpha-Fluorenylmethyloxycarbonylamino Acids, Exemplified by a Synthesis of Dihydrosomatostatin*. International Journal of Peptide and Protein Research, 1978. **11**(3): p. 246-249.
244. Barlos, K., O. Chatzi, D. Gatos, and G. Stavropoulos, *2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage*. International Journal of Peptide & Protein Research, 1991. **37**(6): p. 513-20.
245. Barlos, K., D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, W.Q. Yao, and W. Schafer, *Synthesis of Protected Peptide-Fragments Using Substituted Triphenylmethyl Resins*. Tetrahedron Letters, 1989. **30**(30): p. 3943-3946.
246. Barlos, K., D. Gatos, S. Kapos, C. Poulos, W. Schafer, and W.Q. Yao, *Application of 2-chlorotrityl resin in solid phase synthesis of (Leu15)-gastrin I and unsulfated cholecystokinin octapeptide. Selective O-deprotection of tyrosine*. International Journal of Peptide & Protein Research, 1991. **38**(6): p. 555-61.
247. Barlos, K., D. Gatos, G. Papaphotiu, and W. Schafer, *Synthesis of Calcitonin Derivatives by Fragment Condensation in Solution and on 2-Chlorotrityl Resin*. Liebigs Annalen Der Chemie, 1993(3): p. 215-220.
248. Quaderer, R. and D. Hilvert, *Improved synthesis of C-terminal peptide thioesters on "safety-catch" resins using LiBr/THF*. Organic Letters, 2001. **3**(20): p. 3181-4.
249. Ollivier, N., J.-B. Behr, O.a. El-Mahdi, A. Blanpain, and O. Melnyk, *Fmoc Solid-Phase Synthesis of Peptide Thioesters Using an Intramolecular N,S-Acyl Shift*. Organic Letters, 2005. **7**(13): p. 2647-2650.
250. Shin, Y., K.A. Winans, B.J. Backes, S.B.H. Kent, J.A. Ellman, and C.R. Bertozzi, *Fmoc-based synthesis of peptide-(alpha)thioesters: Application to the total chemical synthesis of a glycoprotein by native chemical ligation*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(50): p. 11684-11689.
251. Kenner, G.W., J.R. McDermott, and R.C. Sheppard, *The safety catch principle in solid phase peptide synthesis*. Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications, 1971(12): p. 636-637.
252. Alsina, J., T.S. Yokum, F. Albericio, and G. Barany, *Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for N \pm -9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Solid-Phase Synthesis of Unprotected Peptide p-Nitroanilides and Thioesters1*. The Journal of Organic Chemistry, 1999. **64**(24): p. 8761-8769.
253. Sewing, A. and D. Hilvert, *Fmoc-Compatible Solid-Phase Peptide Synthesis of Long C-Terminal Peptide Thioesters The authors are grateful to the ETH-Zurich and Novartis Pharma AG for support of this work. Fmoc=9-fluorenylmethoxycarbonyl*. Angewandte Chemie, Int. Edition, 2001. **40**(18): p. 3395-3396.
254. Swinnen, D. and D. Hilvert, *Facile, Fmoc-compatible solid-phase synthesis of peptide C-terminal thioesters*. Organic Letters, 2000. **2**(16): p. 2439-2442.
255. Hyde, C., T. Johnson, D. Owen, M. Quibell, and R.C. Sheppard, *Some 'difficult sequences' made easy. A study of interchain association in solid-phase peptide synthesis*. Int J Pept Protein Res, 1994. **43**(5): p. 431-40.
256. Krchnak, V., Z. Flegelova, and J. Vagner, *Aggregation of resin-bound peptides during solid-phase peptide synthesis. Prediction of difficult sequences*. International Journal of Peptide & Protein Research, 1993. **42**(5): p. 450-4.
257. Bedford, J., C. Hyde, T. Johnson, W. Jun, D. Owen, M. Quibell, and R.C. Sheppard, *Amino acid structure and "difficult sequences" in solid phase peptide synthesis*. International Journal of Peptide & Protein Research, 1992. **40**(3-4): p. 300-7.
258. Wöhr, T., F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X.C. Sun, and M. Mutter, *Pseudo-prolines as a solubilizing, structure-disrupting protection technique in peptide synthesis*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(39): p. 9218-9227.
259. Sampson, W.R., H. Patsiouras, and N.J. Ede, *The synthesis of 'difficult' peptides using 2-hydroxy-4-methoxybenzyl or pseudoproline amino acid building blocks: a comparative study*. Journal of Peptide Science, 1999. **5**(9): p. 403-409.
260. White, P., J.W. Keyte, K. Bailey, and G. Bloomberg, *Expediting the Fmoc solid phase synthesis of long peptides through the application of dimethylloxazolidine dipeptides*. Journal of Peptide Science, 2004. **10**(1): p. 18-26.
261. Chao, H.G., M.S. Bernatowicz, and G.R. Matsueda, *Preparation and Use of the 4-[1-[N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-Amino]-2-(Trimethylsilyl)Ethyl]Phenoxyacetic Acid Linkage Agent for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal Peptide Amides - Improved Yields of Tryptophan-Containing Peptides*. Journal of Organic Chemistry, 1993. **58**(9): p. 2640-2644.
262. Grieco, P., *The use of microwave irradiation in peptide chemistry*. Chimica Oggi-Chemistry Today, 2004. **22**(7-8): p. 18-20.
263. Karas, J.A., M. Boland, V. Wall, S. Collins, K. Barnham, and D. Scanlon, *Investigation of the Structure of the N-terminal Region of Prion Protein (PrP) via the Microwave Synthesis of Peptide Fragments up to 111 Amino Acids in Length*. Journal of Peptide Science, 2008. **14**(S1): p. 47-194.
264. Marder, O., Y. Shvo, and F. Albericio, *HCTU and TCTU. New coupling reagents: Development and industrial aspects*. Chimica Oggi-Chemistry Today, 2002. **20**(7-8): p. 37-41.

265. Carpino, L.A., A. Elfaham, and F. Albericio, *Racemization Studies during Solid-Phase Peptide-Synthesis Using Azabenzotriazole-Based Coupling Reagents*. Tetrahedron Letters, 1994. **35**(15): p. 2279-2282.
266. Sabatino, G., B. Mulinacci, M.C. Alcaro, M. Chelli, P. Rovero, and A.M. Papini, *Assessment of new 6-Cl-HOBt based coupling reagents for peptide synthesis. Part 1: Coupling efficiency study*. Letters in Peptide Science, 2002. **9**(2-3): p. 119-123.
267. Di Fenza, A. and P. Rovero, *Assessment of new 6-Cl-HOBt based coupling reagents for peptide synthesis. Part 2: Racemization studies*. Letters in Peptide Science, 2002. **9**(2-3): p. 125-129.
268. Raibaut, L., N. Ollivier, and O. Melnyk, *Sequential native peptide ligation strategies for total chemical protein synthesis*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(21): p. 7001-7015.
269. Hackeng, T.M., J.H. Griffin, and P.E. Dawson, *Protein synthesis by native chemical ligation: expanded scope by using straightforward methodology*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(18): p. 10068-73.
270. Johnson, E.C.B. and S.B.H. Kent, *Insights into the Mechanism and Catalysis of the Native Chemical Ligation Reaction*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(20): p. 6640-6646.
271. Bracher, P.J., P.W. Snyder, B.R. Bohall, and G.M. Whitesides, *The Relative Rates of Thiol-Thioester Exchange and Hydrolysis for Alkyl and Aryl Thioalkanoates in Water*. Origins of Life and Evolution of Biospheres, 2011. **41**(5): p. 399-412.
272. Burns, J.A., J.C. Butler, J. Moran, and G.M. Whitesides, *Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine*. Journal of Organic Chemistry, 1991. **56**(8): p. 2648-2650.
273. Wallace, C.J., *Peptide ligation and semisynthesis*. Current Opinion in Biotechnology, 1995. **6**(4): p. 403-10.
274. Englebretsen, D.R., B.G. Garnham, D.A. Bergman, and P.F. Alewood, *A Novel Thioether Linker - Chemical Synthesis of a Hiv-1 Protease Analog by Thioether Ligation*. Tetrahedron Letters, 1995. **36**(48): p. 8871-8874.
275. Gaertner, H.F., R.E. Offord, R. Cotton, D. Timms, R. Camble, and K. Rose, *Chemo-enzymic backbone engineering of proteins. Site-specific incorporation of synthetic peptides that mimic the 64-74 disulfide loop of granulocyte colony-stimulating factor*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(10): p. 7224-30.
276. Wehofsky, N., C. Wespe, V. Cerovsky, A. Pech, E. Hoess, R. Rudolph, and F. Bordusa, *Ionic liquids and proteases: a clean alliance for semisynthesis*. ChemBioChem, 2008. **9**(9): p. 1493-9.
277. Wehofsky, N., A. Pech, S. Liebscher, S. Schmidt, H. Komeda, Y. Asano, and F. Bordusa, *D-amino acid specific proteases and native all-L-proteins: a convenient combination for semisynthesis*. Angewandte Chemie, International Edition, 2008. **47**(29): p. 5456-60.
278. Elfaki, I., A. Knitsch, A. Matena, and P. Bayer, *Identification and characterization of peptides that bind the PPLase domain of Parvulin17*. Journal of Peptide Science, 2013. **19**(6): p. 362-369.
279. Ahmad, F., S. Yadav, and S. Taneja, *Determining stability of proteins from guanidinium chloride transition curves*. Biochemical Journal, 1992. **287**(Pt 2): p. 481-485.
280. Romero, P., Z. Obradovic, C. Kissinger, J.E. Villafranca, and A.K. Dunker. *Identifying disordered regions in proteins from amino acid sequence*. in *Neural Networks, 1997., International Conference on*. 1997.
281. Li, X., P. Romero, M. Rani, A.K. Dunker, and Z. Obradovic, *Predicting Protein Disorder for N-, C-, and Internal Regions*. Genome Inform Ser Workshop Genome Inform, 1999. **10**: p. 30-40.
282. Zhang, T., E. Faraggi, B. Xue, A.K. Dunker, V.N. Uversky, and Y. Zhou, *SPINE-D: accurate prediction of short and long disordered regions by a single neural-network based method*. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2012. **29**(4): p. 799-813.
283. Habchi, J., P. Tompa, S. Longhi, and V.N. Uversky, *Introducing protein intrinsic disorder*. Chemical Preview, 2014. **114**(13): p. 6561-88.
284. Mueller, J.W., N.M. Link, A. Matena, L. Hoppstock, A. Ruppel, P. Bayer, and W. Blankenfeldt, *Crystallographic Proof for an Extended Hydrogen-Bonding Network in Small Prolyl Isomerases*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(50): p. 20096-20099.
285. McNaught, A.D. and A. Wilkinson, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. 2nd ed. 1997, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
286. Bailey, M.L., B.H. Shilton, C.J. Brandl, and D.W. Litchfield, *The dual histidine motif in the active site of Pin1 has a structural rather than catalytic role*. Biochemistry, 2008. **47**(44): p. 11481-9.
287. Lorber, B., F. Fischer, M. Bailly, H. Roy, and D. Kern, *Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2012. **40**(6): p. 372-382.
288. Amin, S., G.V. Barnett, J.A. Pathak, C.J. Roberts, and P.S. Sarangapani, *Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2014. **19**(5): p. 438-449.
289. Erickson, H.P., *Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy*. Biol. Procedures Online, 2009. **11**(1): p. 32-51.

290. Kruger, R.G., P. Dostal, and D.G. McCafferty, *An economical and preparative orthogonal solid phase synthesis of fluorescein and rhodamine derivatized peptides: FRET substrates for the Staphylococcus aureus sortase SrtA transpeptidase reaction*. Chemical Communications (Cambridge, England), 2002(18): p. 2092-3.
291. Wang, L., A.K. Gaigalas, J. Blasic, M.J. Holden, D.T. Gallagher, and R. Pires, *Fluorescence resonance energy transfer between donor-acceptor pair on two oligonucleotides hybridized adjacently to DNA template*. Biopolymers, 2003. **72**(6): p. 401-12.
292. Grimsley, G.R., J.M. Scholtz, and C.N. Pace, *A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins*. Protein Science, 2009. **18**(1): p. 247-251, Supplementary Table 1
293. Noble, M.A., S. Gul, C.S. Verma, and K. Brocklehurst, *Ionization characteristics and chemical influences of aspartic acid residue 158 of papain and caricain determined by structure-related kinetic and computational techniques: multiple electrostatic modulators of active-centre chemistry*. The Biochemical Journal, 2000. **351 Pt 3**: p. 723-33.
294. Nelson, J.W. and T.E. Creighton, *Reactivity and Ionization of the Active-Site Cysteine Residues of Dsba, a Protein Required for Disulfide Bond Formation in-Vivo*. Biochemistry, 1994. **33**(19): p. 5974-5983.
295. Hasnain, S., T. Hiram, A. Tam, and J.S. Mort, *Characterization of recombinant rat cathepsin B and nonglycosylated mutants expressed in yeast. New insights into the pH dependence of cathepsin B-catalyzed hydrolyses*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(7): p. 4713-21.
296. Lo Bello, M., M.W. Parker, A. Desideri, F. Polticelli, M. Falconi, G. Del Boccio, A. Pennelli, G. Federici, and G. Ricci, *Peculiar spectroscopic and kinetic properties of Cys-47 in human placental glutathione transferase. Evidence for an atypical thiolate ion pair near the active site*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(25): p. 19033-8.
297. Kortemme, T., N.J. Darby, and T.E. Creighton, *Electrostatic interactions in the active site of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase*. Biochemistry, 1996. **35**(46): p. 14503-11.
298. Wang, P.F., M.J. McLeish, M.M. Kneen, G. Lee, and G.L. Kenyon, *An unusually low pK(a) for Cys282 in the active site of human muscle creatine kinase*. Biochemistry, 2001. **40**(39): p. 11698-705.
299. Qin, J., G.M. Clore, and A.M. Gronenborn, *Ionization equilibria for side-chain carboxyl groups in oxidized and reduced human thioredoxin and in the complex with its target peptide from the transcription factor NF kappa B*. Biochemistry, 1996. **35**(1): p. 7-13.
300. Kumar, S. and R. Nussinov, *Salt bridge stability in monomeric proteins1*. Journal of Molecular Biology, 1999. **293**(5): p. 1241-1255.
301. Pavletich, N.P., Pabo, C.O., *Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 A*. Science, 1991. **10**(252 (5007)): p. 809-17.
302. Pace, N.J. and E. Weerapana, *Zinc-Binding Cysteines: Diverse Functions and Structural Motifs*. Biomolecules, 2014. **4**(2): p. 419-434.
303. Polgar, L., *Mercaptide - Imidazolium Ion-Pair - Reactive Nucleophile in Papain Catalysis*. FEBS Letters, 1974. **47**(1): p. 15-18.
304. Li, H., A.D. Robertson, and J.H. Jensen, *Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK(a) values*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2005. **61**(4): p. 704-721.
305. Gregoret, L.M., S.D. Rader, R.J. Fletterick, and F.E. Cohen, *Hydrogen-Bonds Involving Sulfur-Atoms in Proteins*. Proteins-Structure Function and Genetics, 1991. **9**(2): p. 99-107.
306. Zhou, P., F.F. Tian, F.L. Lv, and Z.C. Shang, *Geometric characteristics of hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2009. **76**(1): p. 151-163.
307. Roos, G., N. Foloppe, and J. Messens, *Understanding the pK(a) of Redox Cysteines: The Key Role of Hydrogen Bonding*. Antioxidants & Redox Signaling, 2013. **18**(1): p. 94-127.
308. Hol, W.G., P.T. van Duijnen, and H.J. Berendsen, *The alpha-helix dipole and the properties of proteins*. Nature, 1978. **273**(5662): p. 443-6.
309. Hol, W.G.J., *The Role of the Alpha-Helix Dipole in Protein Function and Structure*. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 1985. **45**(3): p. 149-195.
310. Roos, G., S. Loverix, and P. Geerlings, *Origin of the pKa perturbation of N-terminal cysteine in alpha- and 3(10)-helices: a computational DFT study*. The Journal of Physical Chemistry. B, 2006. **110**(1): p. 557-62.
311. Miranda, J.J.L., *Position-dependent interactions between cysteine residues and the helix dipole*. Protein Science, 2003. **12**(1): p. 73-81.
312. van Duijnen, P.T., B.T. Thole, and W.G. Hol, *On the role of the active site helix in papain, an ab initio molecular orbital study*. Biophysical Chemistry, 1979. **9**(3): p. 273-80.
313. Gliubich, F., M. Gazerro, G. Zanotti, S. Delbono, G. Bombieri, and R. Berni, *Active site structural features for chemically modified forms of rhodanese*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(35): p. 21054-61.
314. Schirra, H.J., C. Renner, M. Czisch, M. Huber-Wunderlich, T.A. Holak, and R. Glockshuber, *Structure of reduced Dsba from Escherichia coli in solution*. Biochemistry, 1998. **37**(18): p. 6263-6276.

315. Fischer, G., *Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerases and Their Effectors*. Angewandte Chemie, International Edition, 1994. **33**: p. 1415-1436.
316. Harrison, R.K. and R.L. Stein, *Mechanistic studies of peptidyl prolyl cis-trans isomerase: evidence for catalysis by distortion*. Biochemistry, 1990. **29**(7): p. 1684-9.
317. Stein, R.L., *Mechanism of Enzymatic and Nonenzymatic Prolyl Cis-Trans Isomerization*. Advances in Protein Chemistry, Vol 44, 1993. **44**: p. 1-24.
318. Liu, J., M.W. Albers, C.M. Chen, S.L. Schreiber, and C.T. Walsh, *Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in Escherichia coli and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(6): p. 2304-8.
319. Park, S.T., R.A. Aldape, O. Futer, M.T. Decenzo, and D.J. Livingston, *PPIase Catalysis by Human Fk506-Binding Protein Proceeds through a Conformational Twist Mechanism*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(5): p. 3316-3324.
320. Tocci, M.J., D.A. Matkovich, K.A. Collier, P. Kwok, F. Dumont, S. Lin, S. Degudicibus, J.J. Siekierka, J. Chin, and N.I. Hutchinson, *The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes*. Journal of Immunology, 1989. **143**(2): p. 718-26.
321. Gemmill, T.R., X.Y. Wu, and S.D. Hanes, *Vanishingly low levels of Ess1 prolyl-isomerase activity are sufficient for growth in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(16): p. 15510-15517.
322. Toseland, C.P., H. McSparron, M.N. Davies, and D.R. Flower, *PPD v1.0 - an integrated, web-accessible database of experimentally determined protein pK(a) values*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**: p. D199-D203.
323. Marino, S.M. and V.N. Gladyshev, *Cysteine Function Governs Its Conservation and Degeneration and Restricts Its Utilization on Protein Surfaces*. Journal of Molecular Biology, 2010. **404**(5): p. 902-916.
324. Pinitglang, S., A.B. Watts, M. Patel, J.D. Reid, M.A. Noble, S. Gul, A. Bokth, A. Naeem, H. Patel, E.W. Thomas, S.K. Sreedharan, C. Verma, and K. Brocklehurst, *A classical enzyme active center motif lacks catalytic competence until modulated electrostatically*. Biochemistry, 1997. **36**(33): p. 9968-9982.
325. Nelson, K.J., D. Parsonage, A. Hall, P.A. Karplus, and L.B. Poole, *Cysteine pK(a) Values for the Bacterial Peroxiredoxin AhpC*. Biochemistry, 2008. **47**(48): p. 12860-12868.
326. Shingledecker, K., S. Jiang, and H. Paulus, *Reactivity of the cysteine residues in the protein splicing active center of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000. **375**(1): p. 138-44.
327. Wang, P.F., A.J. Flynn, M.M. Naor, J.H. Jensen, G. Cui, K.M. Merz, Jr., G.L. Kenyon, and M.J. McLeish, *Exploring the role of the active site cysteine in human muscle creatine kinase*. Biochemistry, 2006. **45**(38): p. 11464-72.
328. Tajc, S.G., B.S. Tolbert, R. Basavappa, and B.L. Miller, *Direct determination of thiol pKa by isothermal titration microcalorimetry*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(34): p. 10508-9.
329. Kortemme, T. and T.E. Creighton, *Ionization of Cysteine Residues at the Termini of Model Alpha-Helical Peptides - Relevance to Unusual Thiol Pk(a) Values in Proteins of the Thioredoxin Family*. Journal of Molecular Biology, 1995. **253**(5): p. 799-812.
330. Nordstrand, K., F. Aslund, S. Meunier, A. Holmgren, G. Otting, and K.D. Berndt, *Direct NMR observation of the Cys-14 thiol proton of reduced Escherichia coli glutaredoxin-3 supports the presence of an active site thiol-thiolate hydrogen bond*. FEBS Letters, 1999. **449**(2-3): p. 196-200.
331. Stone, N.J., *Table of nuclear magnetic dipole and electric quadrupole moments*. Atomic Data and Nuclear Data Tables, 2005. **90**(1): p. 75-176.
332. Schaefer, S.A., M. Dong, R.P. Rubenstein, W.A. Wilkie, B.J. Bahnson, C. Thorpe, and S. Rozovsky, *(77)Se enrichment of proteins expands the biological NMR toolbox*. Journal of Molecular Biology, 2013. **425**(2): p. 222-31.
333. Schutkowski, M., A. Bernhardt, X.Z. Zhou, M.H. Shen, U. Reimer, J.U. Rahfeld, K.P. Lu, and G. Fischer, *Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition*. Biochemistry, 1998. **37**(16): p. 5566-5575.
334. Harris, T.K. and G.J. Turner, *Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites*. IUBMB Life, 2002. **53**(2): p. 85-98.
335. Dominguez, C., R. Boelens, and A.M.J.J. Bonvin, *HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(7): p. 1731-1737.
336. Barranco-Medina, S., S. Kakorin, J.J. Lazaro, and K.J. Dietz, *Thermodynamics of the dimer-decamer transition of reduced human and plant 2-cys peroxiredoxin*. Biochemistry, 2008. **47**(27): p. 7196-204.

337. Kitano, K., Y. Niimura, Y. Nishiyama, and K. Miki, *Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from Amphibacillus xylanus*. *Journal of Biochemistry*, 1999. **126**(2): p. 313-319.
338. Schroder, E., J.A. Littlechild, A.A. Lebedev, N. Errington, A.A. Vagin, and M.N. Isupov, *Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution*. *Structure*, 2000. **8**(6): p. 605-15.
339. Kristensen, P., D.E. Rasmussen, and B.I. Kristensen, *Properties of thiol-specific anti-oxidant protein or calpromotin in solution*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **262**(1): p. 127-31.
340. Koo, K.H., S. Lee, S.Y. Jeong, E.T. Kim, H.J. Kim, K. Kim, K. Song, and H.Z. Chae, *Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002. **397**(2): p. 312-8.
341. Bernier-Villamor, L., E. Navarro, F. Sevilla, and J.J. Lazaro, *Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*, 2004. **55**(406): p. 2191-2199.
342. Kelly, A.E., H.D. Ou, R. Withers, and V. DÅ¶tsch, *Low-Conductivity Buffers for High-Sensitivity NMR Measurements*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(40): p. 12013-12019.
343. Dip, P.V., N. Kamariah, M.S. Subramanian Manimekalai, W. Nartey, A.M. Balakrishna, F. Eisenhaber, B. Eisenhaber, and G. Gruber, *Structure, mechanism and ensemble formation of the alkylhydroperoxide reductase subunits AhpC and AhpF from Escherichia coli*. *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography*, 2014. **70**(Pt 11): p. 2848-62.
344. Yamamoto, Y., D. Ritz, A.G. Planson, T.J. Jonsson, M.J. Faulkner, D. Boyd, J. Beckwith, and L.B. Poole, *Mutant AhpC peroxiredoxins suppress thiol-disulfide redox deficiencies and acquire deglutathionylating activity*. *Molecular Cell*, 2008. **29**(1): p. 36-45.
345. Simonds, W.F., *Isolierung des aktiven Opiat-Rezeptors mit CHAPS*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980. **77**: p. 4623-4627.
346. Hjelmeland, L.M., *A Non-Denaturing Zwitterionic Detergent for Membrane Biochemistry - Design and Synthesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 1980. **77**(11): p. 6368-6370.
347. Bitonti, A.J., *Auflösung und Aktivität der Adenylatzyklase-Komponenten in CHAPS*. *Biochemistry*, 1982. **21**: p. 3650-3653.
348. Böckmann, A., *3D Protein Structures by Solid-State NMR Spectroscopy: Ready for High Resolution*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008. **47**(33): p. 6110-6113.
349. Xu, R., B. Ayers, D. Cowburn, and T.W. Muir, *Chemical ligation of folded recombinant proteins: segmental isotopic labeling of domains for NMR studies*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(2): p. 388-93.
350. Dongsheng, L., R. Xu, and D. Cowburn, *Segmental Isotopic Labeling of Proteins for Nuclear Magnetic Resonance*. *Methods in Enzymology*, 2009. **462**: p. 151-175.
351. Skrisovska, L., M. Schubert, and F.d.r.T. Allain, *Recent advances in segmental isotope labeling of proteins: NMR applications to large proteins and glycoproteins*. *Journal of Biomolecular NMR*, 2010. **46**(1): p. 51-65.
352. Zhou, P., A. Lugovskoy, and G. Wagner, *A solubility-enhancement tag (SET) for NMR studies of poorly behaving proteins*. *Journal of Biomolecular NMR*, 2001. **20**(1): p. 11-14.
353. Camarero, J.A., A. Shekhtman, E.A. Campbell, M. Chlenov, T.M. Gruber, D.A. Bryant, S.A. Darst, D. Cowburn, and T.W. Muir, *Autoregulation of a bacterial sigma factor explored by using segmental isotopic labeling and NMR*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(13): p. 8536-8541.
354. Anderson, L.L., G.R. Marshall, E. Crocker, S.O. Smith, and T.J. Baranski, *Motion of Carboxyl Terminus of Gα Is Restricted upon G Protein Activation: A Solution NMR Study Using Semisynthetic Gα Subunits*. *The Journal of biological chemistry*, 2005. **280**(35): p. 31019-31026.
355. Vitali, F., A. Henning, F.C. Oberstrass, Y. Hargous, S.D. Auweter, M.I. Erat, and F.d.r.H.T. Allain, *Structure of the two most C-terminal RNA recognition motifs of PTB using segmental isotope labeling*. *The EMBO Journal*, 2006. **25**(1): p. 150-162.
356. Yagi, H., T. Tsujimoto, T. Yamazaki, M. Yoshida, and H. Akutsu, *Conformational Change of H⁺-ATPase beta Monomer Revealed on Segmental Isotope Labeling NMR Spectroscopy*. *Journal of the American Chemical Society*, 2004. **126**(50): p. 16632-16638.

III Anhang

A 1 Sequenzierungen und abgeleitete Primärsequenzen

Par10 1-35 – Mth-RIR1-Intein – CBD Fusionsprotein

ATGGCAAAAACAGCAGCAGCACTGCATATCCTTGATAAAGAAGAGAAACTGGCTCTGGATCTTCTCGAGCAGAT
TAAGAACGGGGCCGATTTCCGGCAAGCTGGCGAAGTGCATATCCGGTGACACCATTGTAATGACTAGTGGCGGTC
 CGCGCACTGTGGCTGAACTGGAGGGCAAACCGTTCACCGCACTGATTCGCGGCTCTGGCTACCCATGCCCTCA
 GGTTTCTTCCGCACCTGTGAACGTGACGTATATGATCTGCGTACACGTGAGGGTCATTGCTTACGTTTGACCCA
 TGATCACCGTGTCTGGTGTGGATGGTGGCCTGGAATGGCGTGCCGCGGGTGAACCTGGAACGCGGGCAGCCGCC
 TGGTGTGGATGATGCAGCTGGCGAGTTTCCGGCACTGGCAACCTTCCGTGGCCTGCGTGGCGCTGGCCGCCAG
 GATGTTTATGACGCTACTGTTACGGTGTAGCGCATTCACTGCTAATGGCTTCATTGTACACGCATGCGGCGA
 GCAGCCCGGGACCGGTCTGAACTCAGGCCTCACGACAAATCCTGGTGTATCCGCTTGGCAGGTCAACACAGCTT
 AACTGCGGGACAATTGGTACATATAACGGCAAGACGTATAAATGTTTGCAGCCCCACACCTCCTTGGCAGGA
 TGGGAACCATCCAACGTTCTGCCTTGTGGCAGCTTCAATGA

MAKTAALHI LVKEEKALD LLEQIKNGAD FGKLAKCVSG DTIVMTSGGP RTVAELEGKP
 FTALIRGSY PCPSGFFRC ERDVYDLRTR EGHCLRLTHD HRVLVMDGGL EWRAAGELER
 GDRLVMDAA GEFPALATFR GLRGAGRQDV YDATVYGASA FTANGFIVHA CGEQPGTGLN
 SGLTTNPGVS AWQVNTAYTA GQLVITYNGKT YKCLQPHTSL AGWEPSNVPA LWQLQ Stop

Par10 1-67 – Mth-RIR1-Intein – CBD Fusionsprotein

ATGGCAAAAACAGCAGCAGCACTGCATATCCTTGATAAAGAAGAGAAACTGGCTCTGGATCTTCTCGAGCAGAT
TAAGAACGGGGCCGATTTCCGGCAAGCTGGCGAAGAAACTCCATTTGCCATCAGGCAAACGCGGCGGTGATT
TAGGTGAATTCCGCCAGGGTCAGATGGTCCGGCGTTCGATAAAGTGGTTTTCTT TGCGTATCCGGTGACACC
 ATTGTAATGACTAGTGGCGGTCCGCGCACTGTGGCTGAACTGGAGGGCAAACCGTTCACCGCACTGATTCGCGG
 CTCTGGCTACCCATGCCCTCAGTTTCTTCCGCACCTGTGAACGTGACGTATATGATCTGCGTACACGTGAGG
 GTCATTGCTTACGTTTGACCCATGATCACCGTGTCTGGTGTGGATGGTGGCCTGGAATGGCGTGCCGCGGGT
 GAACTGGAACGCGGCGACCGCCTGGTGTGGATGATGCAGCTGGCGAGTTTCCGGCACTGGCAACCTTCCGTGG
 CCTGCGTGGCGCTGGCCGCCAGGATGTTTATGACGCTACTGTTTACGGTGTAGCGCATTCACTGCTAATGGCT
 TCATTGTACACGCATGCGGGCAGCAGCCCGGGACCGGTCTGAACTCAGGCCTCACGACAAATCCTGGTGTATCC
 GCTTGGCAGGTCAACACAGCTTATACTGCGGGACAATTGGTACATATAACGGCAAGACGTATAAATGTTTGA
 CCCCCACACCTCCTTGGCAGGATGGGAACCATCCAACGTTCTGCCTTGTGGCAGCTTCAATGA

MAKTAALHI LVKEEKALD LLEQIKNGAD FGKLAKKHSI CPSGKRGGDL GEFRQGMVP
 AFDKVVFCV SGDTIVMTSG GPRTVAELEG KPFTALIRGS GYPCPSGFFR TCERDVYDLR
 TREGHCLRLT HDHRVLVMDG GLEWRAAGEL ERGDRLVMDD AAGEFPALAT FRGLRGAGRQ
 DVYDATVYGA SAFTANGFIV HACGEQPGTG LNSGLTTNPG VSAWQVNTAY TAGQLVITYNG
 KTYKCLQPHT SLAGWEPSNV PALWQLQ Stop

Par10 wt

ATGGCAAAAACAGCAGCAGCACTGCATATCCTTGATAAAGAAGAGAAACTGGCTCTGGATCTTCTCGAGCAGAT
TAAGAACGGGGCCGATTTCCGCAAGCTGGCGAAGAAACACTCCATTTGCCATCAGGCAAACGCGGCGGTGATT
TAGGTGAATTCCGCCAGGGTCAGATGGTCCGGCGTTCGATAAAGTGGTTTTCTTTGTCCGGTACTGGAGCCG
ACCGGCCCCTGCACACCCAGTTCGGATATCACATCATTAAGGTGCTGTACCGCAACTAA

MAKTAAALHI LVKEEKLALD LLEQIKNGAD FGKLAKKHSI CPSGKRGGDL GEFRQGMVP
 AFDKVFSCP VLEPTGPLHT QFGYHIKVL YRN Stop

Par10 C40A

ATGGCAAAAACAGCAGCAGCACTGCATATCCTTGATAAAGAAGAGAAACTGGCTCTGGATCTTCTCGAGCAGAT
TAAGAACGGGGCCGATTTCCGCAAGCTGGCGAAGAAACACTCCATTGCCCCATCAGGCAAACGCGGCGGTGATT
TAGGTGAATTCCGCCAGGGTCAGATGGTCCGGCGTTCGATAAAGTGGTTTTCTTTGTCCGGTACTGGAGCCG
ACCGGCCCCTGCACACCCAGTTCGGATATCACATCATTAAGGTGCTGTACCGCAACTAA

MAKTAAALHI LVKEEKLALD LLEQIKNGAD FGKLAKKHSI APSGKRGGDL GEFRQGMVP
 AFDKVFSCP VLEPTGPLHT QFGYHIKVL YRN Stop

Par10 C68A

ATGGCAAAAACAGCAGCAGCACTGCATATCCTTGATAAAGAAGAGAAACTGGCTCTGGATCTTCTCGAGCAGAT
TAAGAACGGGGCCGATTTCCGCAAGCTGGCGAAGAAACACTCCATTTGCCATCAGGCAAACGCGGCGGTGATT
TAGGTGAATTCCGCCAGGGTCAGATGGTCCGGCGTTCGATAAAGTGGTTTTCTTGCTCCGGTACTGGAGCCG
ACCGGCCCCTGCACACCCAGTTCGGATATCACATCATTAAGGTGCTGTACCGCAACTAA

MAKTAAALHI LVKEEKLALD LLEQIKNGAD FGKLAKKHSI CPSGKRGGDL GEFRQGMVP
 AFDKVFSAP VLEPTGPLHT QFGYHIKVL YRN Stop

6xHis-tag-AhpC (AhpC-Sequenz, ohne spaltbarem His-tag und mit vollständigem C-Terminus)

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCTTGATTAACACCAAATTAACCTTTTTAAAACCAGGC
ATTCAAAAACGGCGAATTCATCGAAATCACCGAAAAAGATACCGAAGGCCGCTGGAGCGTCTTCTTTCTTACC
CGGCTGACTTTACTTTTCGTATGCCCCACCGAACTGGGTGACGTTGCTGACCACTACGAAGAACTGCAGAACTG
GGCGTAGACGTATACGCAGTATCTACCGATACTCACTTACCCACAAAGCATGGCACAGCAGCTCCGAAACCAT
CGCTAAAATCAAATATGCGATGATCGGCGACCCGACTGGCGCCCTGACCCGTAACCTTCGACAACATGCGTGAAG
ATGAAGGTCTGGCTGACCGTGCACCTTCGTTGTTGACCCGAGGGTATCATCCAGGCAATCGAAGTTACCGCT
GAAGGCATTGGCCGTGACGCGTCTGACCTGCTGCGTAAAATCAAAGCAGCACAGTACGTAGCTTCTCACCCAGG
TGAAGTTTGCCCGCTAAATGGAAAGAAGGTGAAGCAACTCTGGCTCCGTCTCTGGACCTGGTTGGTAAAATCI
AA

MRGSHHHHHH GSLINTKIKP FKNQAFKNGE FIEITEKDTE GRWSVFFFYP ADFTFVCPTE
 LGDVADHYEE LQKLGVDVYA VSTDTHFTHK AWHSSSETIA KIKYAMIGDP TGALTRNFDN
 MREDEGLADR ATFVVDPOGI IQAIEVTAEG IGRDASDLLR KIKAAQYVAS HPGEVCPAKW
 KEGEATLAPS LDLVGKI Stop

6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz (AhpC-Sequenz, mit spaltbarem His-tag und verkürztem C-Terminus)

ATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCCTGCTGCTAA
ATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGGATCCTTGATTA

ACACCAAAATTAACCTTTTAAAAACCAGGCATTCAAAAACGGCGAATTCATCGAAATCACCGAAAAAGATACC
 GAAGGCCGCTGGAGCGTCTTCTTCTTCTACCCGGCTGACTTTACTTTTCGTATGCCCGACCGAACTGGGTGACGT
 TGCTGACCACTACGAAGAAGTGCAGAACTGGGCGTAGACGTATACGCAGTATCTACCGATACTCACTTCACCC
 ACAAAGCATGGCACAGCAGCTCCGAAACCATCGCTAAAATCAAATATGCGATGATCGGCGACCCGACTGGCGCC
 CTGACCCGTAACCTCGACAACATGCGTGAAGATGAAGGTCTGGCTGACCGTGCGACCTTCGTTGTTGACCCGCA
 GGGTATCATCCAGGCAATCGAAGTTACCGCTGAAGGCATTGGCCGTGACGCGTCTGACCTGCTGCGTAAAATCA
 AAGCAGCACAGTACGTAGCTTCTACCCAGGTGAAGTTTGCCCGGCTAAATGGAAAGAAGGTGAAGCATAA

MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAKFERQH MDSPDLGTD DDKAMGSLIN TKIKPFKNQA
 FKNGEFIEIT EKDEGRWSV FFFYPADFTF VCPTLGDVA DHYEELQKLG VDVYAVSTDT
 HFTHKAHSS SETIAKIKYA MIGDPTGALT RNFDMREDE GLADRATFVV DPQGIIQAI
 VTAEGIGRDA SDLLRRIKAA QYVASHPEV CPAKWKEGEA Stop

6xHis-tag-AhpC T77D (AhpC-Sequenz, ohne spaltbarem His-tag und vollständigem C-Terminus, Mutation Thr⁷⁷Asp)

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCTTGATTAACACCAAAATTAACCTTTTAAAAACCAGGC
 ATTCAAAAACGGCGAATTCATCGAAATCACCGAAAAAGATACCGAAGGCCGCTGGAGCGTCTTCTTCTTCTACC
 CGGCTGACTTTACTTTTCGTATGCCCGACCGAACTGGGTGACGTTGCTGACCACTACGAAGAAGTGCAGAACTG
 GCGTAGACGTATACGCAGTATCTACCGATACTCACTTCGACCCACAAAGCATGGCACAGCAGCTCCGAAACCAT
 CGCTAAAATCAAATATGCGATGATCGGCGACCCGACTGGCGCCCTGACCCGTAACCTCGACAACATGCGTGAAG
 ATGAAGGTCTGGCTGACCGTGCGACCTTCGTTGTTGACCCGAGGGTATCATCCAGGCAATCGAAGTTACCGCT
 GAAGGCATTGGCCGTGACGCGTCTGACCTGCTGCGTAAAATCAAAGCAGCACAGTACGTAGCTTCTACCCAGG
 TGAAGTTTGCCCGGCTAAATGGAAAGAAGGTGAAGCAACTCTGGCTCCGTCTCTGGACCTGGTTGGTAAAATCI
AA

MRGSHHHHHH GSLINTKIKP FKNQAFKNGE FIEITEKDTE GRWSVFFFYP ADFTFVCPTE
 LGDVADHYEE LQKLGVDVYA VSTDTHFDHK AWHSSSETIA KIKYAMIGDP T GALTRNFDN
 MREDEGLADR ATFVVDPQGI IQAIEVTAEG IGRDASDLLR KIKAAQYVAS HPGEVCPAKW
 KEGEATLAPS LDLVGKI Stop

6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz T77D (AhpC-Sequenz, mit spaltbarem His-tag und verkürztem C-Terminus, Mutation Thr⁷⁷Asp)

ATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAA
 ATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACACAAGGCCATGGGATCCTTGATTA
 ACACCAAAATTAACCTTTTAAAAACCAGGCATTCAAAAACGGCGAATTCATCGAAATCACCGAAAAAGATACC
 GAAGGCCGCTGGAGCGTCTTCTTCTTCTACCCGGCTGACTTTACTTTTCGTATGCCCGACCGAACTGGGTGACGT
 TGCTGACCACTACGAAGAAGTGCAGAACTGGGCGTAGACGTATACGCAGTATCTACCGATACTCACTTCGACC
 ACAAAGCATGGCACAGCAGCTCCGAAACCATCGCTAAAATCAAATATGCGATGATCGGCGACCCGACTGGCGCC
 CTGACCCGTAACCTCGACAACATGCGTGAAGATGAAGGTCTGGCTGACCGTGCGACCTTCGTTGTTGACCCGCA
 GGGTATCATCCAGGCAATCGAAGTTACCGCTGAAGGCATTGGCCGTGACGCGTCTGACCTGCTGCGTAAAATCA
 AAGCAGCACAGTACGTAGCTTCTACCCAGGTGAAGTTTGCCCGGCTAAATGGAAAGAAGGTGAAGCATAA

MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAKFERQH MDSPDLGTD DDKAMGSLIN TKIKPFKNQA
 FKNGEFIEIT EKDEGRWSV FFFYPADFTF VCPTLGDVA DHYEELQKLG VDVYAVSTDT
 HFDHKAHSS SETIAKIKYA MIGDPTGALT RNFDMREDE GLADRATFVV DPQGIIQAI
 VTAEGIGRDA SDLLRRIKAA QYVASHPEV CPAKWKEGEA Stop

A 2 Experimentell bestimmte Molekülmassen

Tab. A 2-1. Übersicht der experimentell bestimmten Molekülmassen. Aufgelistet sind die in dieser Arbeit synthetisierten Protein und Parvulinsegmente mit ihren berechneten und bestimmten Molekülmassen.

Peptid/Protein	berechnet ¹	bestimmt ²
Par10 H-1-35-MESNa	3884,6 Da	3886 [M+H] ⁺
Par10 H-1-35-SBn	3867,6 Da	3869 [M+H] ⁺
Par10 H-1-35-OH	3761,4 Da	3762 [M+H] ⁺
Par10 H-1-67-MESNa	7345,6 Da	7347 [M+H] ⁺
Par10 H-1-67-OH	7222,4 Da	7224 [M+H] ⁺
Par10 wt	10100,8 Da	10103 [M+H] ⁺
¹⁵ N Par10 wt	10224,9 Da	10228 [M+H] ⁺
Par10 C40A	10068,7 Da	10071 [M+H] ⁺
¹⁵ N Par10 C40A	10192,8 Da	10199 [M+H] ⁺
Par10 C68A	10068,7 Da	10070 [M+H] ⁺
Par10 H-36-67-MESNa	3602,2 Da	3603 [M+H] ⁺
Par10 H-36-67-OH	3479,0 Da	3480 [M+H] ⁺
Par10 H-36-67-MESNa M57Dap(Abz)	3675,2 Da	3677 [M+H] ⁺
Par10 H-36-67-MESNa V58Dap(Abz)	3707,3 Da	3708 [M+H] ⁺
Par10 H-68-92-OH	2896,4 Da	2898 [M+H] ⁺
Par10 H-68-92-OH Q80Dap(Abz)	2973,5 Da	2975 [M+H] ⁺
Par10 H-68-92-OH F81Dap(Abz)	2953,4 Da	2955 [M+H] ⁺
Par10 H-36-92-OH	6357,4 Da	6459 [M+H] ⁺
Par10 H-36-92-OH M57Dap(Abz)	6430,4 Da	6432 [M+H] ⁺
Par10 H-36-92-OH V58Dap(Abz)	6462,5 Da	6464 [M+H] ⁺
Par10 H-36-92-OH Q80Dap(Abz)	6434,5 Da	6437 [M+H] ⁺
Par10 H-36-92-OH F81Dap(Abz)	6414,4 Da	6416 [M+H] ⁺
Par10 H-1-92-OH	10100,8 Da	10103 [M+H] ⁺
Par10 H-1-92-OH M57Dap(Abz)	10173,8 Da	10175 [M+H] ⁺
Par10 H-1-92-OH V58Dap(Abz)	10205,9 Da	10207 [M+H] ⁺
Par10 H-1-92-OH Q80Dap(Abz)	10177,9 Da	10180 [M+H] ⁺
Par10 H-1-92-OH F81Dap(Abz)	10157,8 Da	10160 [M+H] ⁺
6xHis-tag-AhpC	21941,6 Da	21944 [M+H] ⁺
6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz	24467,3 Da	24469 [M+H] ⁺
AhpC ¹⁻¹⁶	1918,3 Da	1919 [M+H] ⁺
AhpC ¹¹⁵⁻¹³²	1912,2 Da	1914 [M+H] ⁺
AhpC_kurz	19681,1 Da	19683 [M+H] ⁺
¹³ C/ ¹⁵ N 6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz	25837,1 Da	25839 [M+H] ⁺
¹³ C/ ¹⁵ N AhpC_kurz	20786,9 Da	20789 [M+H] ⁺
6xHis-tag-AhpC T77D	21955,6 Da	21958 [M+H] ⁺
6xHis-tag-DDDDK-AhpC_kurz T77D	24481,4 Da	24483 [M+H] ⁺
AhpC_kurz T77D	19695,0 Da	19697 [M+H] ⁺

¹ durchschnittliche Molekülmasse der unprotonierten Spezies berechnet mit dem Programm ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/> [167]), Isotopen-markierte Proteinvarianten berechnet mit Protein Calculator v3.4 (<http://protcalc.sourceforge.net/>) ² berechnet mit der MassLynx 4.0 Software (Waters) unter Verwendung des MaxEnt-Algorithmus [191].

A 3 Absolute und relative Spezifitätskonstanten

Tab. A 3-1. Absolute und relative Spezifitätskonstanten der für die Arbeit hergestellten Par10-Varianten bzw. Par10-Segmente für das Substrat 2-Abz-AAPF-pNA. Für die relativen Spezifitätskonstanten in Prozent wurde die absolute Spezifitätskonstante von wtPar10 (Wildtypaktivität) 100 % gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Die angegebenen absoluten und relativen Fehler sind die Standardfehler der Regressionsanalysen zur Ermittlung der Spezifitätskonstanten, welche anhand von mindestens sechs Datenpunkten bestimmt wurden. Die Bedingungen des Aktivitätstests sind in Abschnitt 3.7.1 näher erläutert.

Par10-Variante/ Par10-Segment(e)	absolute Spezifitätskonstante $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	relative Spezifitätskonstante $k_{\text{kat}} \cdot K_M^{-1} (\%)$
wtPar10	$9,9 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^5$	$100 \pm 2,63$
wtPar10 (aus zwei Segmenten)	$4,9 \times 10^6 \pm 2,3 \times 10^5$	$49,5 \pm 2,32$
wtPar10 (aus drei Segmenten)	$8,2 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4$	$8,3 \pm 0,33$
Par10 C40A	$5,0 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^2$	$0,5 \pm 0,01$
Par10 C68A	$9,5 \times 10^6 \pm 4,1 \times 10^5$	$96,0 \pm 4,14$
Par10 M57Dap(Abz)	0	0
Par10 V58Dap(Abz)	0	0
Par10 Q80Dap(Abz)	$5,6 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5$	$56,6 \pm 1,72$
Par10 F81Dap(Abz)	$3,6 \times 10^4 \pm 9,3 \times 10^3$	$0,36 \pm 0,09$
1-35 ^r	0	0
36-67 ^c	$4,0 \times 10^3 \pm 1,9 \times 10^3$	$0,04 \pm 0,02$
68-92 ^c	$5,5 \times 10^2 \pm 1,3 \times 10^2$	$0,01 \pm 0,002$
1-67 ^r	$4,7 \times 10^3 \pm 7,4 \times 10^2$	$0,05 \pm 0,01$
36-92 ^c	$3,3 \times 10^2 \pm 6,8 \times 10^1$	~0
1-35 ^r + 36-92 ^c	$4,4 \times 10^2 \pm 1,1 \times 10^2$	~0
1-67 ^r + 68-92 ^c	$1,0 \times 10^5 \pm 4,6 \times 10^3$	$1,0 \pm 0,05$
36-67 ^c + 68-92 ^c	$2,2 \times 10^3 \pm 3,3 \times 10^2$	$0,02 \pm 0,003$
1-35 ^r + 36-67 ^c + 68-92 ^c	$4,4 \times 10^2 \pm 7,9 \times 10^1$	~0

^r = rekombinant erhaltenes Par10-Segment, ^c = chemisch synthetisiertes Par10-Segment

A 4 Schema der Festphasenpeptidsynthese

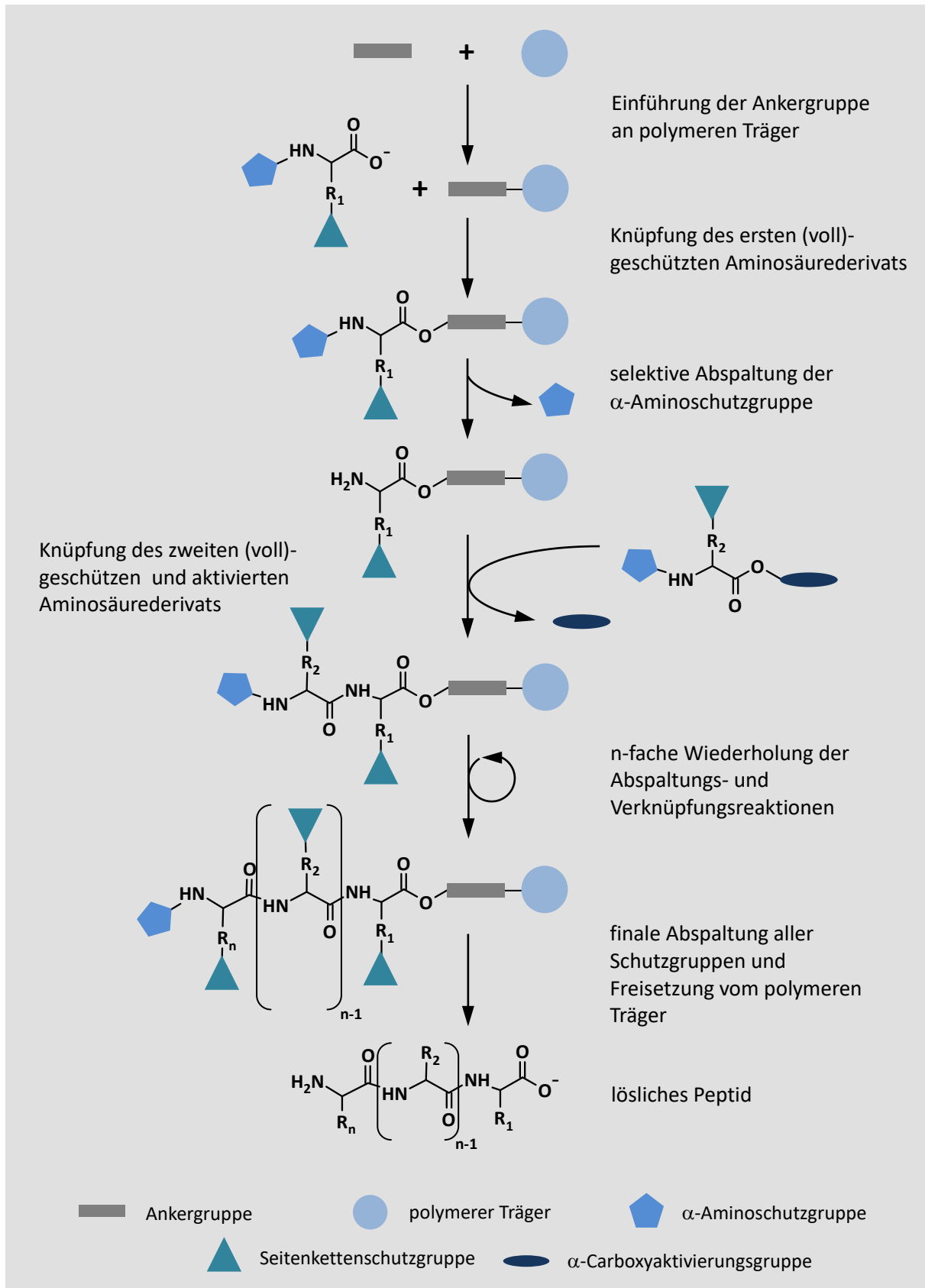


Abb. A 4-1. Allgemeines Schema der Festphasenpeptidsynthese (SPPS).

A 5 Schema der Natürlich Chemischen Ligation

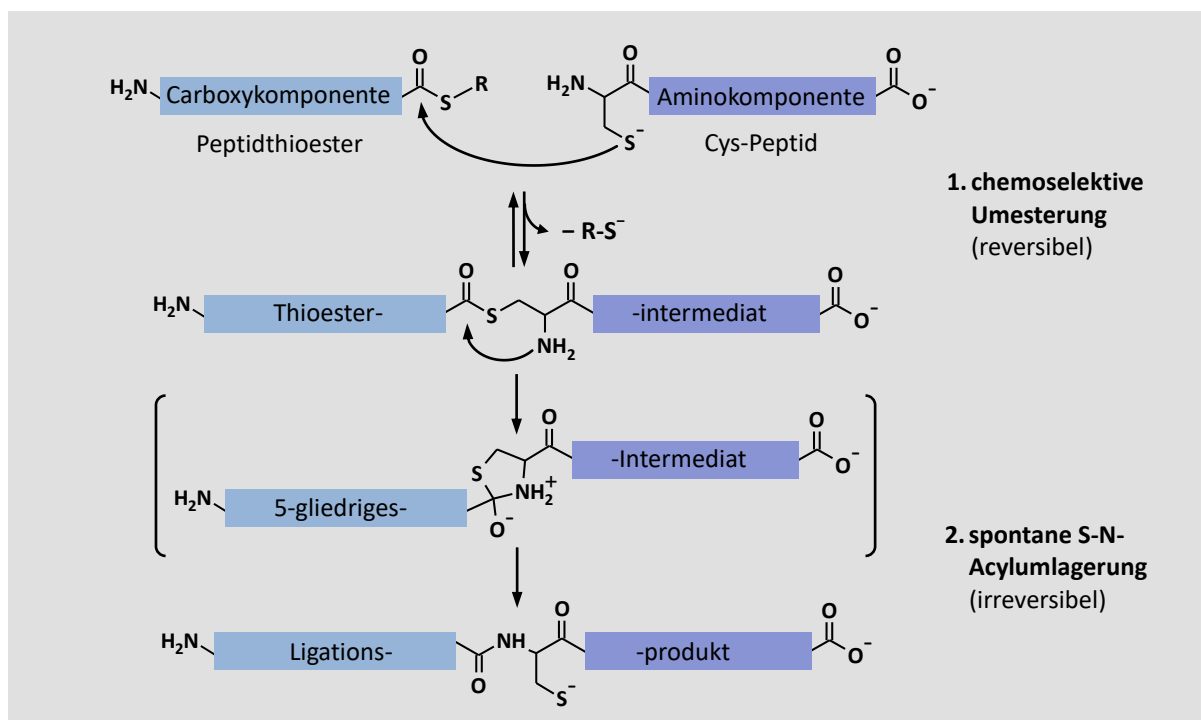


Abb. A 5-1. Allgemeines Prinzip der Natürlich Chemischen Ligation (NCL). Übliche Reaktionsbedingungen: pH-Wert ~ 8 , Verwendung von Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid als Denaturierungsmittel, Zugabe der Additive Thiophenol oder 4-Mercapto-phenyllessigsäure als Katalysator und TCEP als thioolfreies Reduktionsmittel. $R = -CH_2-CH_2-SO_3^-$, $-C_6H_5$, $-CH_2-C_6H_5$. Abbildung verändert nach [268].

A 6 Schema der proteasekatalysierten Peptidsynthese

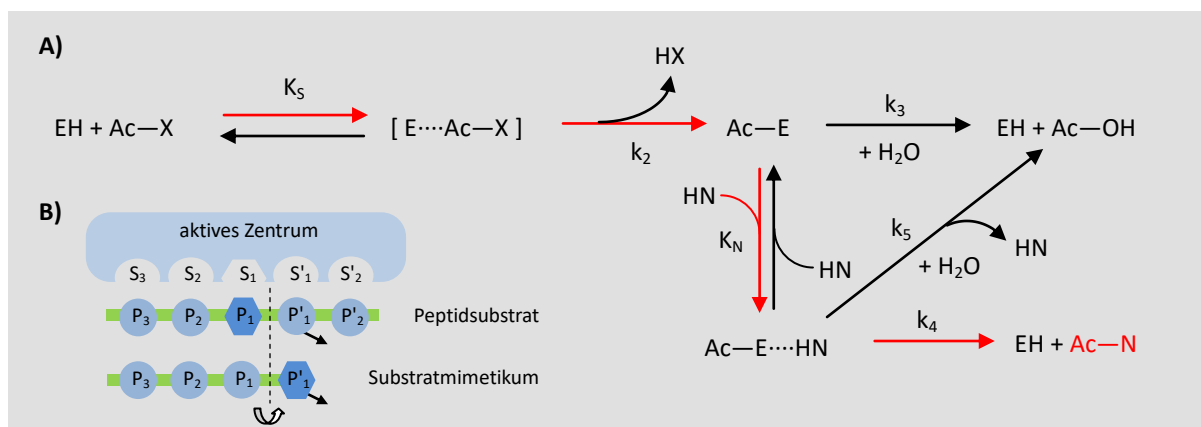


Abb. A 6-1. Modell der kinetisch kontrollierten serin-/cysteinproteasekatalysierten Acyltransferreaktion. **A)** EH = freies Enzym; $Ac-X$ = Acyldonator/Carboxykomponente/Substratmimetikum; HX = Abgangsgruppe; $Ac-E$ = Acyl-Enzym-Intermediat/MICHAELIS-MENTEN-Komplex; $Ac-OH$ = Hydrolyseprodukt; HN = Acylakzeptor/ Aminokomponente/Nukleophil; $Ac-N$ = Aminolyseprodukt/geknüpftes Peptid/Protein; K_S, K_N = Gleichgewichtskonstanten; k_2, k_3, k_4, k_5 = Geschwindigkeitskonstanten; rote Pfeile kennzeichnen den Weg zum gewünschten Ligationsprodukt $Ac-N$. **B)** Unterschiedliche Einbindung von Peptidsubstrat und Substratmimetikum in das aktive Zentrum einer Protease. Die spezifitätsvermittelnde Aminosäureseitenkette (P_1) des Peptidsubstrats ist beim Mimetikum in die C-terminale Esterabgangsgruppe verschoben (P'_1) und im Ligationsprodukt nicht mehr vorhanden. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Abgangsgruppen, der gebogene Pfeil die Verschiebung des Spezifitätszentrums in die Abgangsgruppe, Kreise stellen Aminosäuren dar und gestrichelte Linie die Substratspaltstellen. Nomenklatur nach SCHECHTER und BERGER [242]. Abbildungen verändert nach [157].

A 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1. <i>Cis/trans</i> -Isomerisierung.....	4
Abb. 1-2. NMR-Struktur des <i>E. coli</i> Parvulin 10.....	9
Abb. 3-1. Das IMPACT-TWIN-System.	30
Abb. 3-2. DTT-Oxidationstest zur Bestimmung der AhpC-Enzymaktivität.....	43
Abb. 4-1. Ausgewählte Ergebnisse der Reinigung von wtPar10, Par10 C40A, Par10 C68A und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -AhpC_kurz.	46
Abb. 4-2. 1D- ^1H -NMR-Experimente an AhpC-Varianten.	48
Abb. 4-3. Ausschnitt der $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -wtPar10 und Val 58 -Signalverfolgung.....	50
Abb. 4-4. Änderung der $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ chemischen Verschiebung der ^{15}N -wtPar10-Kreuzsignale nach AhpC-Zugabe.....	51
Abb. 4-5. Visualisierung der Interaktionsbereiche von ^{15}N -wtPar10 nach Bindung von AhpC $^{115-132}$	52
Abb. 4-6. Ausschnitte der $^1\text{H}/^1\text{H}$ 2D-NOESY-Spektren von AhpC $^{115-132}$	53
Abb. 4-7. Vergleich der $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -wtPar10 und ^{15}N -Par10 C40A.....	55
Abb. 4-8. Schemata der Semisynthesen zur Darstellung der fluoreszenzmarkierten Parvulin 10-Derivate.	56
Abb. 4-9. Synthese des Fluoreszenzsondenbausteins Fmoc-L-Dap(Boc-Abz)-OH.	57
Abb. 4-10. HPLC-Chromatogramme und ESI-Massenspektren ausgewählter Par10-Segmente.	59
Abb. 4-11. Segmentkondensationsreaktionen zur Generierung fluoreszenzmarkierter Par10-Varianten.	62
Abb. 4-12. Vergleich der Fern-UV CD-Spektren der Par10-Varianten und ausgewählter Par10-Segmente.....	64
Abb. 4-13. Vergleich der Fern-UV CD-Spektren von 6xHis-tag-AhpC und AhpC_kurz.....	66
Abb. 4-14. Untersuchung zur Stabilität der Parvulinvarianten mittels limitierter Proteolyse.....	67
Abb. 4-15. Proteasefreie PPLase-Aktivitätstests.....	68
Abb. 4-16. Übersicht über die relativen Spezifitätskonstanten $k_{\text{kat}}\cdot K_{\text{M}}^{-1}$	68
Abb. 4-17. AhpC-Aktivitätstest.....	69
Abb. 4-18. pH-Aktivitätsprofil von wtPar10 und pK_{S} -Werte der Sulfhydrylgruppen von Cys 40 und Cys 68	71
Abb. 4-19. Synthese und Verwendung des Quenchers 2-INPA.....	73
Abb. 4-20. Par10-Suc-AAPF-pNA-Bindungskurven.....	75
Abb. 4-21. Kompetitive Verdrängungskurven.....	76
Abb. 4-22. Inhibierungsstudien.....	77
Abb. 5-1. Vorhersage schwierig zu synthetisierender Peptidabschnitte.	86
Abb. 5-2. <i>In situ</i> Thiol-Thioesteraustausch während einer NCL.....	88
Abb. 5-3. Fluoreszenzlöschung der markierten Par10-Derivate.	93
Abb. 5-4. Vorhersage ungeordneter oder flexibler Bereiche von wtPar10, Par10 C40A und Par10 C68A.	98
Abb. 5-5. Über Wasserstoffbrücken verbundene Tetraden in Parvulinen.....	99

Abb. 5-6. Modell der Stabilisierung des Thiolatanions von Cys ⁴⁰ in wtPar10.	108
Abb. 5-7. Modell für eine nicht-kovalente Katalyse durch Par10.	111
Abb. 5-8. Bändermodell des AhpC-Homodimers.	115
Abb. 5-9. <i>In silico</i> Bindungsstudie des wtPar10-AhpC ¹¹⁹⁻¹²⁹ -Komplexes.	118
Abb. A 4-1. Allgemeines Schema der Festphasenpeptidsynthese (SPPS).	vi
Abb. A 5-1. Allgemeines Prinzip der Natürlich Chemischen Ligation (NCL).	vii
Abb. A 6-1. Modell der kinetisch kontrollierten serin-/cysteinproteasekatalysierten Acyltransferreaktion.	vii

A 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1. Ausgewählte Mitglieder der Parvulinfamilie.	7
Tab. 3-1. Primersequenzen für ortsgerechte Mutagenesen, Einführung von Restriktionsschnittstellen und Sequenzierungen.	20
Tab. 3-2. Übersicht der verwendeten Plasmide, eingefügten Genabschnitte und Expressionsstämme.	21
Tab. 3-3. Übersicht der verwendeten Computerprogramme.	24
Tab. 3-4. Übersicht der verwendeten Datenbanken und Internetseiten.	24
Tab. 3-5. Übersicht über die in der Arbeit gereinigten rekombinanten Proteine und Peptidthioester.	28
Tab. 4-1. Synthetisierte Par10-Peptide und Par10-Peptidthioester.	60
Tab. 4-2. Ermittelte Sekundärstrukturanteile verschiedener Par10- und AhpC-Spezies.	65
Tab. 4-3. pK _S (SH)-Werte der Cysteinseitenkette in L-Cystein, Par10-Segmenten, Par10 C40A und Par10 C68A.	72
Tab. 4-4. Apparente Fluoreszenzlöschungskonstanten für 2-INPA, Suc-AAPF- <i>p</i> NA und D-Phe- <i>p</i> NA.	75
Tab. 4-5. Beobachtete Fluoreszenzlöschungskonstanten für AhpC ¹¹⁵⁻¹³² und AhpC ¹⁻¹⁶	76
Tab. 5-1. Ausgewählte Beispiele gemessener pK _S -Werte von Cysteinseitenketten in Proteinen.	106
Tab. A 2-1. Übersicht der experimentell bestimmten Molekülmassen.	iv
Tab. A 3-1. Absolute und relative Spezifitätskonstanten der für die Arbeit hergestellten Par10- Varianten bzw. Par10-Segmente für das Substrat 2-Abz-AAPF- <i>p</i> NA.	v

A 9 Gleichungenverzeichnis

Gleichung (3-1).....	20
Gleichung (3-2).....	34
Gleichung (3-3).....	34
Gleichung (3-4).....	37
Gleichung (3-5).....	38
Gleichung (3-6).....	38
Gleichung (3-7).....	39
Gleichung (3-8).....	40
Gleichung (3-9).....	40
Gleichung (3-10).....	41
Gleichung (3-11).....	42

Stichwortverzeichnis

Das Stichwortverzeichnis enthält in dieser Arbeit verwendete Begriffe, welche auf den angegebenen Seiten genauer definiert oder gegenüber verwandten Fachbegriffen abgegrenzt wurden und auf die zum Teil nicht in aller Ausführlichkeit eingegangen werden konnte.

<i>cis</i> -Peptidbindung.....	3	Natürlich Chemische Ligation.....	32
<i>cis</i> -Prolylbindung.....	3	NCL.....	32
Enzym.....	1	Nomenklatur nach SCHECHTER und BERGER...	83
EPL.....	32	Peptidbindung.....	3
Helix-Makrodipoleffekt.....	109	Peroxireduktase.....	11
IANUS-Peptidarray.....	12	Prolylbindung.....	3
Konformation.....	2	Substratmimetika.....	58
Konformationsisomer.....	2	Trypsiligase.....	33
Ligation Exprimierter Proteine.....	32	WW-Domäne.....	4, 5

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie in der Arbeitsgruppe Naturstoffbiochemie in Kooperation mit der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle (Saale) unter Betreuung von Prof. Dr. Frank Bordusa und Dr. Sandra Liebscher angefertigt.

Hiermit bedanke ich mich bei den Mitgliedern beider Arbeitskreise, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, für die erfolgreiche Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Frank Bordusa danke ich für die interessante Themenstellung und für die stets motivierende und freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit. Seine vielen wertvollen Ratschläge sorgten für das Gelingen der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Gunter Fischer bedanke ich mich für die Schaffung der guten Arbeitsmöglichkeiten, vor allem zu Beginn der Arbeit.

Dr. Sandra Liebscher möchte ich für die vielen Hilfestellungen, den unaufhörlichen Ansporn und für das Korrekturlesen des Manuskripts danken.

Dr. Bianka Hartrodt danke ich für die fortwährende Hilfsbereitschaft, die angenehme Zusammenarbeit in den zahlreichen Praktika und das Setzen und Entfernen zahlloser Kommata.

Für ihr außergewöhnliches Engagement möchte ich mich ganz besonders bei Christa Langer, Stefanie Kaufmann und Karin Jentzsch bedanken, die mir so einige „pfiffige Labortricks“ beigebracht haben.

Dr. Christian Lücke und Monika Seidel danke ich für die Durchführung der NMR-Experimente und für die kompetente Beratung bei allen NMR-Fragen.

Herrn Dr. Andreas Pech möchte ich für die kritischen Diskussionen, für seine Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Peptidsynthesen und für das Gegenlesen meines Manuskripts danken; letzteres gilt auch für alle übrigen, namentlich nicht genannten Korrekturleser.

Bei meinen lieben Laborkollegen, insbesondere bei meinem langjährigen „Banknachbarn“ Lars Franke bedanke ich mich für die heitere Laboratmosphäre, die vielen Aufmunterungen während einiger Durststrecken und für so manche kleine Ablenkung vom Laboralltag.

Meinen lieben Eltern und meinem Bruder danke ich besonders für ihre geduldige Unterstützung und für ihren großen Beistand während meiner gesamten Studien- und Promotziionszeit:

Danke, danke danke!

Lebenslauf

persönliche Angaben

Name: Diessner
Vorname: André
geboren: 01.06.1982 in Halle (Saale)

universitäre Ausbildung

09/2008 – 012/2014 Anfertigung der Promotionsarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Frank Bordusa, AG Naturstoffbiochemie, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Naturwissenschaftliche Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2003 – 07/2008 Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Publikationen und Tagungsbeiträge

Fachartikel

Malešević, M, A. Poehlmann, B. Hernandez Alvarez, A. Diessner, M. Träger, J. U. Rahfeld, G. Jahreis, S. Liebscher, F. Bordusa, G. Fischer, C. Lücke, *The Protein-Free IANUS Peptide Array Uncovers Interaction Sites between Escherichia coli Parvulin 10 and Alkyl Hydroperoxide Reductase*. *Biochemistry*, 2010. **49**.

Tagungsbeiträge

Liebscher, S., A. Diessner, T. Aumüller, E. Trost, E. Hoess, F. Bordusa, *Site-specific modification of proteins: The versatility of a trypsin variant*. 9th German Peptide Symposium Göttingen, March 11-14, 2009

Selbstständigkeitserklärung

Die hier vorgelegte Dissertation wurde in der Zeit von September 2008 bis Dezember 2014 an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Biochemie und Biotechnologie in der Arbeitsgruppe Naturstoffbiochemie unter Betreuung von Prof. Dr. Frank Bordusa und Dr. Sandra Liebscher angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe und Zitate kenntlich gemacht wurden.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), 01. Dezember 2016

André Diessner