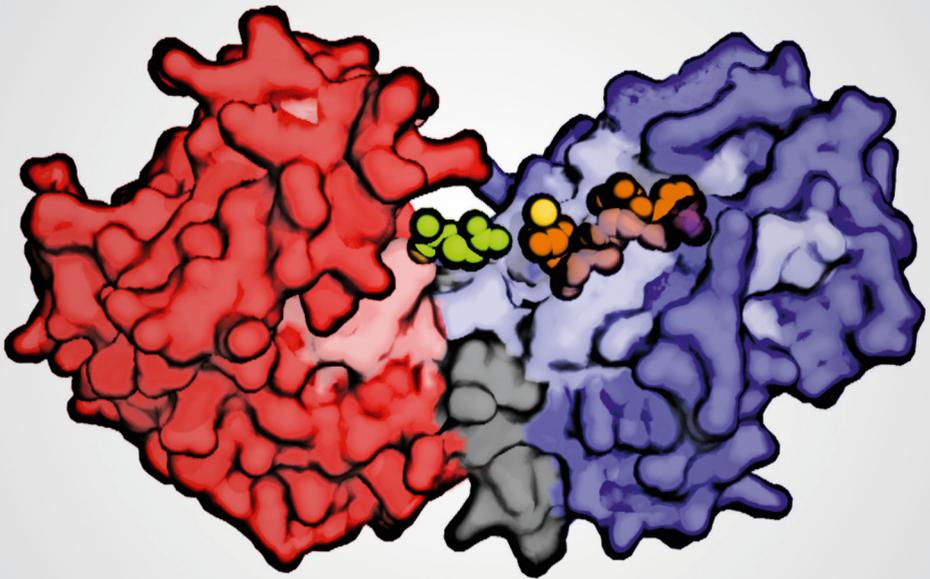


Etablierung eines Systems aus Cysteinmutanten der Phosphoglycerat-Kinase für Entfaltungstudien mit Einzelmolekül-FRET

Antonie Schöne



Schlüsseltechnologien /
Key Technologies
Band/ Volume 143
ISBN 978-3-95806-237-5

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Complex Systems
Molekulare Biophysik (ICS-5)

Etablierung eines Systems aus Cysteinmutanten der Phosphoglycerat-Kinase für Entfaltungstudien mit Einzelmolekül-FRET

Antonie Schöne

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Schlüsseltechnologien / Key Technologies

Band / Volume 143

ISSN 1866-1807

ISBN 978-3-95806-237-5

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Tel.: +49 2461 61-5368
Fax: +49 2461 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
www.fz-juelich.de/zb

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2017

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Schlüsseltechnologien / Key Technologies, Band / Volume 143

D 82 (Diss. RWTH Aachen University, 2017)

ISSN 1866-1807
ISBN 978-3-95806-237-5

Vollständig frei verfügbar über das Publikationsportal des Forschungszentrums Jülich (JuSER)
unter www.fz-juelich.de/zb/openaccess.



This is an Open Access publication distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Material.....	9
3	Methoden.....	26
3.1	Methoden der Klonierung.....	26
3.1.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	26
3.1.2	Primerabhängige Mutagenese.....	28
3.1.3	Endonukleolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	30
3.1.4	Dephosphorylierung von DNA.....	31
3.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
3.1.6	Auftrennung von Nukleinsäuren mit Agarose-Gelelektrophorese.....	33
3.1.7	Herstellung transformationskompetenter Zellen (<i>E.coli</i>).....	33
3.1.8	Transformation von <i>E.coli</i>	34
3.1.9	Kultivierung von <i>E.coli</i>	35
3.1.10	Plasmidpräparation.....	35
3.1.11	Sequenzierung.....	35
3.2	Biochemische Methoden.....	36
3.2.1	Expression der yPGK in <i>E.coli</i>	36
3.2.2	Proteinreinigung.....	36
3.2.3	Natriumdodecylsulfat–Polyacralamid-Gelelektrophorese.....	40
3.2.4	Blue-Native-PAGE (BN-PAGE).....	41
3.2.5	Westernblot.....	42
3.2.6	yPGK-Aktivitätstest.....	43
3.3	Methoden der Spektroskopie.....	46
3.3.1	Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....	46
3.3.2	Dynamische Lichtstreuung (<i>dynamic light scattering</i> , DLS).....	49
3.3.3	Fluoreszenzspektroskopie.....	50

4	Ergebnisse.....	71
4.1	Design der Cystein-Mutanten der yPGK.....	71
4.2	Proteinexpression und Reinigung.....	75
4.3	Dynamische Lichtstreuung.....	80
4.4	Integrität der Sekundärstruktur.....	82
4.5	Enzymatische Aktivität der Cysteinvarianten der yPGK.....	84
4.6	Fluoreszenzmarkierung der yPGK für Einzelmolekül-FRET-Studien.....	88
4.7	Diffusionseigenschaften der fluoreszenzmarkierten yPGK-Varianten.....	91
4.8	Farbstoffabstände unter nativen Bedingungen.....	93
4.9	Equilibrium-Entfaltungstudien an der yPGK.....	97
4.9.1	CD-Studien zur Entfaltung der yPGK-Varianten.....	97
4.10	Einzelmolekül-FRET-Studien zur Entfaltung der yPGK.....	99
4.10.1	Entfaltung der Interdomänenmutante PGK Q135C S290C.....	99
4.10.2	Entfaltung der N-Domänenmutante PGK S1C Q135C.....	103
4.10.3	Entfaltung der C-Domänenmutante PGK T202C D256C.....	106
5	Diskussion und Ausblick.....	111
5.1	Mutagenese und Fluoreszenzmarkierung der yPGK.....	111
5.2	Reinigung der yPGK.....	114
5.3	Präparation der yPGK für Einzelmolekül-FRET.....	116
5.4	Charakterisierung der yPGK.....	117
5.5	Wirkung von Guanidiniumhydrochlorid.....	118
5.6	Entfaltung der yPGK.....	120
5.7	Ausblick.....	123
6	Zusammenfassung.....	125
7	Summary.....	127
8	Literaturverzeichnis.....	129

1 Einleitung

Die allermeisten Prozesse, die für das Überleben der Zelle und damit eines jeden Organismus essentiell sind, werden von Proteinen kontrolliert. Proteine geben den Zellen Struktur, ermöglichen Bewegungen, sind beteiligt an Signalwegen, transportieren Substanzen und verteidigen die Zelle gegen gefährliche Eindringlinge - um nur einige ihrer zahlreichen Funktionen zu nennen (Campbell und Reece, 2002). Enzyme katalysieren zudem wichtige chemische Reaktionen des Stoffwechsels. Um ihre katalytische Funktion ausüben zu können, müssen Proteine ihre native Struktur annehmen. Welche Wege Polypeptide während der Faltung beschreiten und wie diese durch ihre Aminosäuresequenz beeinflusst werden, ist aber bis jetzt noch nicht vollständig verstanden.

Schon in den 1960er Jahren konnte Anfinsen zeigen, dass kleine Proteine nach einer Denaturierung ihre native Struktur wieder annehmen können. Er folgerte daraus, dass der Schlüssel zur Tertiärstruktur eines jeden Proteins in dessen Aminosäuresequenz verborgen liegt (Epstein et al., 1963). Levinthal postulierte kurz darauf, dass es dabei gerichtete Faltungswege geben muss, denn die Kombinationsmöglichkeiten intramolekularer Kontakte innerhalb eines Proteins sind zu zahlreich, als dass eine zufällige Suche nach der energetisch günstigsten Struktur in realistischen Zeitspannen ablaufen könnte (Levinthal, 1969).

Heute nimmt man an, dass, ausgehend von einem Ensemble nicht gefalteter Zustände der Primärstruktur eines Proteins und getrieben durch die Minimierung der freien Energie des Systems, mehrere parallele Faltungswege möglich sind, die „trichterförmig“ zusammenlaufen und in der thermodynamisch günstigsten Form - der nativen Struktur - des Proteins enden (Energie-Landschaftstheorie) (Dobson, 2003, Hartl und Hayer-Hartl, 2009). Auf dem Weg dorthin durchläuft die Sequenz verschiedene lokale Energieminima in Form von partiell gefalteten Intermediaten und überwindet Energiebarrieren, die die intermediären Zustände voneinander trennen. Faltungsintermediate können allerdings auch Vorstufen von nicht korrekt gefalteten Formen und Aggregaten sein.

Eine etwas andere Sichtweise auf das Faltungsproblem ist das *foldon*-Konzept (Bai und Englander, 1996, Englander und Mayne, 2014), welches davon ausgeht, dass die Faltung und Entfaltung von Proteinen in Schritten erfolgt, wobei die Sequenz eine feste Anzahl definierter Intermediate (sogenannte kooperative *foldon* Einheiten, bestehend aus nur wenigen Residuen) durchläuft. Die Bildung des ersten *foldons* erfolgt nicht gerichtet und wird möglicherweise durch erste intramolekulare Interaktionen nach dem hydrophoben Kollaps ausgelöst. Die Anwesenheit eines *foldons* katalysiert und stabilisiert wiederum die Bildung des nächsten *foldons*, mit dem es auch im nativen Zustand noch interagiert.

Auf struktureller Ebene geht man davon aus, dass Proteine mit hohen helikalen Anteilen mit einem hierarchischen Mechanismus falten, wobei die Bildung der Sekundärstrukturen der Bildung des hydrophoben Kerns vorausgeht. In Proteinen mit geringeren helikalen Anteilen werden Sekundär- und Tertiärstrukturen mehr oder weniger gleichzeitig ausgebildet (Han et al., 2007).

Faltung von Multidomänen-Proteinen

Genomanalysen haben gezeigt, dass etwa 40-65 % der prokaryotischen und 65- 80% der eukaryotischen Proteome durch Proteine repräsentiert werden, die aus mehreren Domänen aufgebaut sind (Batey et al., 2008). Domänen sind strukturelle, funktionelle Einheiten, die sich im Laufe der Evolution etabliert haben (Han et al., 2007). Es existiert aber nur eine limitierte Anzahl von Domänen-Familien, die, auf verschiedene Weise kombiniert, eine große Anzahl unterschiedlicher Multidomänen-Proteine ergeben können. Allerdings hat sich gezeigt, dass auch die Kombinationsmöglichkeiten in der Realität begrenzt sind. In Multidomänen-Proteinen tragen individuelle Domänenfunktionen zum katalytischen Potential des gesamten Proteins bei und es lassen sich verschiedene biokatalytische Prozesse in einem Enzym vereinen. Domänen können meist isoliert exprimiert werden und sind dann trotzdem in der Lage nativ zu falten, sie stellen also oft eigenständige Faltungseinheiten dar. Im Kontext der *full-length* Sequenz beeinflussen Domänen-Interaktionen den Faltungsprozess (Han et al., 2007). Oft spezifizieren große, dicht gepackte, hydrophobe Überlappungen die Orientierung der Domänen zueinander und stabilisieren das Protein. Die Faltung und

Stabilität von Multi-Domänen-Proteinen ist folglich ein Zusammenspiel aus Aminosäureabfolge, Topologie und Seitenketteninteraktionen (Han et al., 2007).

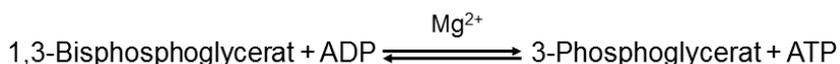
Komplexe Proteine (insbesondere solche, die sich wiederholende Domänen, *tandem domains*, beinhalten) tragen ein sehr hohes Risiko fehlerhafter Faltung und Aggregation. Hohe Konzentrationen nicht oder partiell gefalteter Proteine in der Zelle lösen fehlerhafte Faltung und in Folge die Bildung von Aggregaten aus und können in höheren Organismen zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Das passiert aber erstaunlich selten. Welche Prozesse schützen also (partiell) entfaltete Proteine vor Fehlfaltung und Aggregation?

In der Zelle gibt es mindestens zwei Szenarios der Proteinfaltung. Zunächst werden Domänen co-translational, d.h., während der Synthese am Ribosom, gefaltet. Dabei wird das entstehende Protein dadurch vor Aggregation geschützt, dass die Faltung schneller als die Aggregation abläuft. Außerdem werden noch nicht gefaltete oder partiell gefaltete Bereiche (die besonders stark zur Aggregation neigen) durch Chaperone geschützt. Durch die sequenzielle Synthese, Domäne für Domäne, wird weiterhin verhindert, dass nicht gefaltete Peptide in hohen Konzentrationen im Cytosol der Zelle akkumulieren (Han et al., 2007).

Außerdem werden Domänen innerhalb ihrer Lebenszeit in der Zelle nach spontaner (thermischer) Entfaltung rückgefaltet (Han et al., 2007). Die Lebenszeiten der meisten Proteine (Tage bis Wochen) ist deutlich länger als ihre Entfaltungs-Halbwertszeiten (typischerweise Sekunden bis wenige Minuten), sodass Domänen-Ent- und Rückfaltung mehrmals stattfinden können. Für den Fall, dass eine intakte Domäne die Faltung weiterer Domänen katalysiert, reduziert das die Lebenszeit des entfalteten Zustands. Zusätzlich schützen auch hier Chaperone die entfaltenen Bereiche. Ebenso eine tragende Rolle spielen stabilisierende Domäneninteraktionen und die Art der Verbindung zwischen den Domänen (oft lange Helices), die die Entfaltung erschweren und die Rückfaltung beschleunigen können. Zusätzlich werden diesbezüglich verschiedene *gatekeeper* Aminosäuren diskutiert. Das sind vor allem geladene Aminosäuren, konservierte Proline und Glycine aber auch Cysteine, die Disulfidbrücken innerhalb des Proteins bilden können und so eine stabilisierende Wirkung haben (Richardson und Richardson, 2002, Steward et al., 2002, Parrini et al., 2005, Han et al., 2007).

Struktur und Funktion der γ PGK

Die Phosphoglyceratkinase (PGK) ist, neben der Pyruvatkinase, eines von zwei Enzymen, die direkt in die ATP-Synthese während der Glykolyse involviert sind. PGK katalysiert den reversiblen Phosphattransfer von 1,3-Bisphosphoglycerat auf MgADP, wobei MgATP und 3-Phosphoglycerat gebildet werden (Reaktion 1). Die katalytische Aktivität der PGK wird durch geringe Konzentrationen von Anionen reguliert.



Reaktion 1

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird die PGK (γ PGK) von einem 1251 bp großen Gen (1 Exon, Chromosom III) codiert. Das Enzym besteht aus 416 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 45 kDa. Es ist ein lösliches Protein und liegt als Monomer im Cytoplasma der Zelle, dem Ort der Glykolyse, vor. Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, dass die Sekundär- und Tertiärstruktur der PGK in allen untersuchten Spezies (Bakterien, Säugetiere, Mensch und Pflanzen) hoch konserviert ist (Banks et al., 1979). PGK besteht aus zwei globulären Domänen ähnlicher Größe (Abbildung 1.1). Eine verbindende Helix fungiert als Scharnier (*hinge*)-Region (Watson et al., 1982).

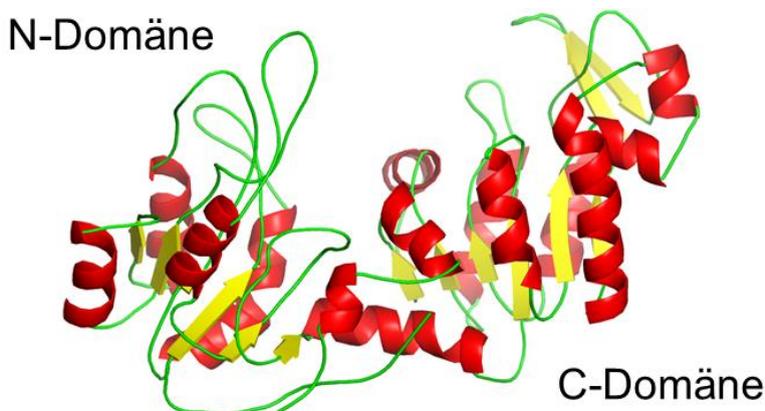


Abbildung 1.1 Struktur der Phosphoglyceratkinase (PGK).

PGK besteht aus zwei globulären Domänen, die durch eine Scharnierhelix miteinander verbunden sind. Jede Domäne hat einen Kern aus β -Faltblättern (gelb), die von α -Helices (rot) umgeben sind. Die α -Helices sind durch größtenteils unstrukturierte Bereiche (*loops*, grün) mit den β -Faltblättern im Kern der Domänen verbunden.

Jede Domäne hat einen Kern (β -sheet) aus sechs parallelen β -strands (gelb), der von je vier großen Helices (zwei Helices an jeder Seite, rot) umgeben ist. Die Helices sind wiederum durch β -turns und unstrukturierte Bereiche (loops, grün) mit den β -strands verbunden. Die C-Domäne enthält außerdem ein Paar antiparalleler β -strands C-terminal der parallelen β -strands, die in lösungsmittlexponierten loops enden. Die zwölf C-terminalen Aminosäuren falten zurück und komplettieren die N-Domäne (McPhillips et al., 1996).

Beide Domänen der PGK sind in die Bindung der Substrate involviert (Abbildung 1.2). Die Nukleotid-Substrate (ADP/ATP) binden in einer hydrophoben Tasche an der Peripherie der C-Domäne (Residuen 210-220, 235-239, 253-254, 310-311, 334-341, 370-373 und 393-397, hellblau). 1,3-Bisphosphoglycerat bzw. 3-Phosphoglycerat bindet hingegen an einen basischen Bereich (*basic patch*) der N-Domäne (Residuen 21, 25, 62-67, 121, 162-171, hellrot). Dieser Bereich enthält eine Reihe von basischen Argininen (R21, R38, R65, R121, R168) und Histidinen (H62, H167, H170) sowie polare bzw. geladene Aminosäuren: Asparagine (N25, N67), Glutamin (Q65), Threonin (T165) und Aspartat (D23). Der basische Bereich der N-Domäne dient neben der Bindung von (Bis-) Phosphoglycerat wahrscheinlich hauptsächlich als regulatorische Einheit des Enzyms (McPhillips et al., 1996).

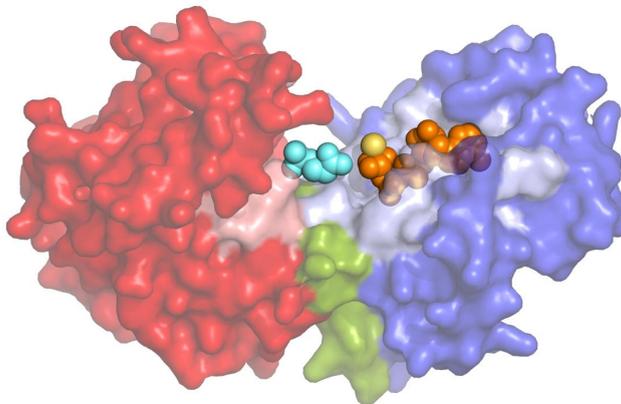


Abbildung 1.2: Oberflächenrepräsentation der PGK mit gebundenen Substraten.

Die N-Domäne (rot) bildet einen Bereich aus basischen und polaren Aminosäuren (hellrot) als Bindestelle für 1,3-Bisphosphoglycerat/3-Phosphoglycerat (cyan) und regulatorische Einheit des Enzyms. Die Nukleotid-Substrate MgADP bzw. MgATP (orange) binden in einer hydrophoben Tasche (hellblau) der C-Domäne (blau). Die *hinge*-Region ist grün dargestellt.

PGK als Modell für die Entfaltung und Faltung von Multi-Domänen-Proteinen

Die PGK aus *Saccharomyces cerevisiae* hat sich als Modell für spektroskopische Entfaltungs- und Faltungsstudien bewährt. Sie ist mit hohen Ausbeuten in einfachen Organismen, wie der Hefe selbst oder *E. coli* zu exprimieren und sie ist im nativen Zustand sehr stabil in verschiedenen Pufferbedingungen und gegenüber der Degradation durch Proteasen (Young et al., 2007). So können mit relativ wenig Aufwand sehr homogene Proben hergestellt werden. Durch ihren Aufbau aus zwei Domänen ist sie strukturell ausreichend komplex, um z.B. Domäneninteraktionen und -bewegungen während der (Ent-) Faltung zu untersuchen.

Aus Ensemble-Studien mit CD-Spektroskopie und Tryptophan-Fluoreszenz in Lösung, sowohl an den isolierten Domänen als auch im Kontext des Gesamtproteins, ergibt sich bisher folgendes Bild über die Entfaltung und Faltung der yPGK:

Entfaltung

Die Auflösung der Tertiär- und Sekundärstrukturen der Domänen ist ein fortlaufender Prozess, wie Studien an Tryptophan-Mutanten der N- und C-Domäne sowie der *hinge*-Region gezeigt haben (Beechem et al., 1995, Sherman et al., 1995). Zunächst entfaltet der C-Terminus. Danach lösen sich die Tertiär-Strukturen der C-Domäne auf. Es konnte außerdem ein kinetisches Intermediat der N-Domäne gezeigt werden, das aus der entfalteten C-Domäne und der zwar strukturell veränderten, aber kompakten N-Domäne besteht (Beechem et al., 1995). Ein solches (hyperfluoreszierendes) Entfaltungsintermediat wurde auch in entsprechenden Gleichgewichts-Studien bei mittleren Konzentrationen des Denaturierungsmittels GndHCl (~0,5 M) nachgewiesen (Sherman et al., 1995). Zuletzt wird die N-Domäne entfaltet. Die Entfaltung der N-Domäne unter Gleichgewichtsbedingungen ist erst bei deutlich höheren GndHCl-Konzentrationen (~0,9 M) abgeschlossen (Sherman et al., 1995).

Faltung

Stopped-flow Faltungsstudien mit Tryptophan-Fluoreszenz geben Hinweise darauf, dass Interaktionen zwischen Residuen über relativ große Distanzen (bezüglich der Aminosäureabfolge) die Faltung beider Domänen in unterschiedlicher Weise beeinflussen (Osváth et al., 2005). Im Kontext der gesamten Aminosäure-Sequenz erreicht die C-Domäne ihre native Struktur schneller als die N-Domäne. Studien an den isolierten Domänen ergaben allerdings, dass die N-Domäne schneller gefaltet wird als die individuelle C-Domäne. Die Anwesenheit der N-Domäne verändert offenbar die Faltungsgeschwindigkeit der C-Domäne, nicht aber den Faltungsweg. Die Anwesenheit der C-Domäne wirkt sich hingegen auf den Faltungsweg der N-Domäne aus, vor allem im Hinblick auf deren frühen Kollaps (im Sub-Millisekunden-Bereich), wobei ein transientes Faltungsintermediat nachgewiesen werden konnte. Eine frühere Equilibrium-Faltungsstudie an fluoreszenzmarkierten Cysteinmutanten berichtet ebenfalls von einem Faltungsintermediat der N-Domäne bei kritischen Konzentrationen des GndHCl. Dieses Intermediat konnte auch in entsprechenden Faltungsexperimenten der isolierten N-Domäne gezeigt werden (Yon et al., 1990). Im nativen Zustand schließlich überlappen die Domänen in einem relativ kleinen Bereich dadurch, dass sich die C-terminale Helix zur N-Domäne und *hinge*-Region zurückfaltet. Erst dadurch kann die N-Domäne (Bis-) Phosphoglycerat binden und das Enzym wird katalytisch aktiv. Die isolierte C-Domäne hingegen bindet ADP/ATP (Osváth et al., 2005).

Sowohl Entfaltungs- als auch Faltungsstudien berichten über einen intermediären Zustand der yPGK, wobei die N-Domäne kompakt, die C-Domäne entfaltet vorliegt. Insgesamt deuten die Ergebnisse nicht darauf hin, dass der Faltungs- und Entfaltungsweg der yPGK grundsätzlich unterschiedlich verläuft.

Zirkulardichroismus (CD)- Studien geben Auskunft über globale Veränderungen des Gehalts an Sekundärstruktur-Elementen von Proteinen. Sie sind aber blind gegenüber lokalen Ereignissen und Veränderungen der Tertiärstruktur. Im Gegensatz dazu liefern Tryptophan-Fluoreszenz-Messungen sehr lokale Informationen, denn sie detektieren Veränderungen der Umgebung der Tryptophane, die die Fluoreszenz-Intensitäten entsprechend beeinflussen. Mit FÖRSTER-Resonanz-Energietransfer (FRET) werden Abstandsänderungen zwischen zwei Fluorophoren an definierten Referenzpunkten in

der Struktur detektiert. So können ebenfalls lokale Strukturveränderungen beobachtet werden. Durch Kombination verschiedener Referenzpunkte kann dann ein detaillierteres Bild der (Ent-) Faltung generiert werden.

In einer Ensemble-Studie mit FRET wurden Abstandsänderungen zwischen den Domänen während der Entfaltung mit GndHCl ($\sim 0-1,2$ M) beobachtet (Lillo et al., 1997). Die Ergebnisse der Kinetiken wurden dahingehend interpretiert, dass sich in einem ersten Schritt der Entfaltung die beiden Domänen ca. 15 Å voneinander wegbewegen und die C-Domäne mit einem Winkel von $\sim 90^\circ$ um die *hinge*-Helix gedreht wird. Als Rotationsursprung kommen die Residuen an den Positionen 194 bis 197 in Frage, die bereits in Kristallographie-Studien als Scharnier der Domänenbewegung bei der Substratbindung identifiziert wurden (Bernstein et al., 1997). Die C-Domäne selbst bleibt in diesem ersten Entfaltungsschritt intakt.

Ensemble-Methoden haben allerdings den Nachteil, dass über alle in der Probe vorhandenen Spezies und Zustände gemittelt wird. Verschiedene Populationen, wie z.B. Faltungsintermediate, können mit Einzelmolekültechniken hingegen häufig identifiziert werden. Darum wurde das in der o.g. Ensemble-Studie verwendete System zum Teil wieder aufgegriffen und weiterentwickelt, um tiefere Einblicke in lokale Prozesse während der Faltung der yPGK zu gewinnen.

Ziel der Arbeit ist es, ein System aus Inter- und Intradomänen-Varianten der yPGK für Einzelmolekül-FRET-Messungen zu etablieren. Dieses System ermöglicht es, Abstandsänderungen zwischen den Domänen, aber auch innerhalb der individuellen Domänen während der Entfaltung der PGK zu untersuchen. Die notwendige Markierung des Proteins mit fluoreszierenden Farbstoffen erfolgt hier über spezifisch eingeführte Cysteine. Die entsprechenden yPGK-Varianten werden bezüglich ihrer Reinheit, Struktur und Funktionalität eingehend charakterisiert, um ihre Eignung und eine ausreichende Probenqualität für die Entfaltungsexperimente sicherzustellen.

2 Material

Geräte

Abbe Refraktometer

- AR3/AR4 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Deutschland)

Absorptionsspektrometer

- UV-2401 PC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)
- NANODROP 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- PRIM Vis Spektralphotometer (SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland)

Autoklav (Fedegari GmbH & Co KG, München, Deutschland)

CD-Spektrometer

- J-1100 CD Spectrometer (JASCO Corp., Tokio, Japan)

DLS-Gerät

- PROTEIN SOLUTIONS (DynaPro, PROTERION Corp., High Wycombe, UK)

Elektrophorese-Kammern

- Compact XS/S (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Mini PROTEAN[®] Tetra System (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- XCell SureLock[™] Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Fluoreszenzmikroskop

- Microtime 200 (PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland)
 - Mikroskop: Olympus IX-81 (Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland)
 - Wasserimmersionsobjektiv:
UplanSApo, 60×, NA 1.2 (Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland)

- Laser bei 485 nm und 633 nm:
LDH-D-C 485 und LDH-D-C 640 (PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland)
- TCSPC-Modul: HydraHarp 400 (PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland)
- Zwei Avalanche Photodioden für jeden Kanal:
blau: τ -SPAD (PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland)
rot: SPCM-CD3077-H und SPCM-AQR-14 (Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA)
- Hauptdichroit (*major dichroic*):
XF2401 (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT, USA)
- Zweiter Dichroit (*minor dichroic*):
T600lpxr (Chroma Technology Corp., Bellows Falls, VT, USA)
- 50/50 Strahlteilerwürfel (Olympus Deutschland, Hamburg, Germany)
- Emissionsfilter:
blau: 530/55 Bandpassfilter (Semrock Inc., Rochester, NY, USA)
rot: 635 Langpassfilter (Semrock Inc., Rochester, NY, USA)

Fluoreszenzspektrometer

- Spectrofluorophotometer QM-7 (Photon Technology International, Birmingham, NJ, USA)

FPLC-System

- ÄKTAexplorer 10 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)

Geldokumentationssystem

- ChemiDocTM MP Imaging System (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)

Inkubator

- Multitron Standard (Infors AG, Bottmingen, Schweiz)

Lyophilie

- Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland)

pH-Meter

- S20-SevenEasy™ mit InLab® Mikroelektrode
(Mettler Toledo International Inc., Columbus, OH, USA)

Pipetten

- PIPETMAN classic: P1000, P200, P100, P20 und P10 (Gilson Inc.,
Middleton, WI, USA)

Plasmacleaner

- Zepto plasma cleaner (Plasma Surface Technology, Diener Electronic GmbH,
Ebhausen, Deutschland)

Spannungsgeräte

- Power Pack P25 (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Power Pac HC (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- EPS 3500 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)

Sterilbank

- UNIFLOW UVUB (Uniequip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH,
Planegg, Deutschland)

PCR Thermocycler

- FlexCycler² (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland)

Westernblot Kammer

- semi-dry blotter V20DB (Scie-Plas Ltd., Cambridge, UK)

Zellaufschlussgerät (Constant Systems Ltd., Daventry, UK)

Zentrifugen

- Optima XPN-80 ultracentrifuge / Rotor: Ti 70
mit Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat (26,3 ml)
(Beckmann Coulter Inc., Brea, CA, USA)

- Avanti™ J-20 XP centrifuge / Rotor: JLA-8.1
mit Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (1000 ml)
(Beckmann Coulter Inc., Brea, CA, USA)

Verbrauchsmaterialien

Chromatographiesäulen und Säulenmaterial

- Sephadex G25 (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
- NiNTA-Agarose (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- Säulenkörper (verschiedene Maße, Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- HiTrap™ Benzamidine FF, 2x 1ml (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)
- HighLoad™ Superdex 200 (16/60), präparativ (*prep grade*) (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)
- MonoQ™ (5/50 GL) (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)

Deckgläschen

- Präzisionsdeckgläser No. 1.5H (Paul Marienfeld GmbH&Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland)

Eppendorfgefäße

- EPPENDORF TUBES® Protein LoBind Tube, 1,5 ml (Safe-Lock Tubes), PCR clean (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Konzentratoren

- Amicon® Ultra 4 / 15 Ultracel® 10K Zentrifugen-Filtereinheiten, MWCO 10kDa (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland)

Native Polyacrylamid-Gele

- NativePAGE™ Novex™ 4-16% Bis-Tris Proteingele (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Pipettenspitzen

- Low Binding SafeSeal-Tips Professional Filterspitzen 10µl, 100µl, 1000µl, sterilil, DNA-, DNase-, RNase- und Pyrogenfrei (Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf, Deutschland)

PVDF-Membran

- Roti[®]-PVDF, Porengröße: 0,45µm (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)

Quarzküvetten

- Absorptionsspektroskopie: Präzisionsküvette, QS, d = 10 x 4 mm, V = 1400 µl (Hellma GmbH, Müllheim, Deutschland)
- CD-Spektroskopie: High Precision Cell, QS, d = 1 mm (Hellma GmbH, Müllheim, Deutschland)
- DLS: Präzisionsküvetten, QS, d = 10 x 3 mm (Hellma GmbH, Müllheim, Deutschland)

Sterilfilter

- Acrodisc[®] Spritzenvorsatzfilter (Ø 32 mm) mit Supor[®] Membran, Porengrößen: 0,2µm und 0,45µm (PALL Corp., Port Washington, New York)
- Steritop[™] Express[™] PLUS, Porengröße: 0,22µm (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland)
- Whatman[™] Spritzenvorsatzfilter (Ø 13 mm) mit Nylon Filtermedium, Porengröße: 0,1µm (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)

Kits

- Klonierungen:
 - Zero Blunt[®] PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Plasmid-Minipräparationen:
 - QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- Gelextraktionen:
 - QIAEX[®] II Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

Chemikalien

Chemikalien von Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

Adenosin-5'-diphosphat Natriumsalz (ADP)
6-Aminocaprinsäure
Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Ammoniumsulfat
L-Arabinose
Bis-(2-hydroxyethyl)-Amino-Tris-(hydroxymethyl)-Methan (Bis-Tris)
Borsäure
Bromphenolblau
Calciumchlorid
Dimethylsulfoxid (DMSO), wasserfrei
Dithiothreitol (DTT)
Essigsäure (99 %)
Glyceraldehyd-3-Phosphat (GAP)
 β -Mercaptoethanol
 β -Nikotinamiddinukleotid (β -NAD)
Nickelsulfat
3-Phosphoglycerat (3-PG)
Schwefelsäure (95-98 %)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Trichloressigsäure (TCA)
Tricin
Tris (2-carboxyethyl) phosphinhydrochlorid (TCEP)
Wasserstoffperoxid (30 %)

Chemikalien von AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Agar
Coomassie Brilliant Blue G 250
Guanidiniumhydrochlorid (GndHCl)

Hefeextrakt
Imidazol
Kaliumdihydrogenphosphat
Kaliumhydroxid
3-(N-morpholino) propansulfonsäure (MOPS)
Natriumchlorid
Natriumhydroxid
Natriumdodecylsulfat (SDS)
Ortho-Phosphorsäure (85 %)
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (TRIS)
Trypton
Urea

Chemikalien von Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Acrylamid/Bisacrylamid: Rotiphorese[®] Gel 30 (37,5:1)
Roti[®]-Block (10x Konzentrat)
Ethanol (96 % vergällt)
Ethanol (für HPLC, 99,9%)
Glycerin
Salzsäure (32 %)
Tween 20

Chemikalien von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Uvasol Aceton (für Spektroskopie, 99,9 %)
Uvasol Ethanol, für Spektroskopie, 99,9 %)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat

Sonstige Chemikalien

Agarose: SeaKem[®] LE Agarose (Lonza Group AG, Basel, Schweiz)

Coomassie Brilliant Blue R (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, CA, USA)
Gelred (Biotium Inc., Hayward, CA, USA)
Glycin (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, CA, USA)
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) (VWR International LLC, Radnor, PA, USA)
Methanol (für HPLC) (VWR International LLC, Radnor, PA, USA)
Stickstoff (Linde AG, München, Deutschland)

Fluoreszenzfarbstoffe

Alexa Fluor[®] 488 C5 Maleimid (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
Alexa Fluor[®] 647 C2 Maleimid (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Nährmedien

DYT:

16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1 L dH₂O

SOB/SOC:

20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,6 g NaCl, 0,2 g KCl, 1 M MgCl₂, 1 M MgSO₄
ad 1 L dH₂O, pH 6,8 - 7,0

Puffer und Lösungen

Puffer und andere wässrige Lösungen wurden mit MilliQ-Wasser angesetzt.

Agarosegelelektrophorese

- TAE:
40 mM Tris/AcOH, pH 8; 1 mM EDTA

Herstellung transformationskompetenter Zellen

- RF1:
30 mM Kac/Essigsäure, pH 5,8; 100 mM RbCl, 80 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂,
15 % (w/v) Glycerin
- RF2:
10 mM MOPS/NaOH, pH 6,8; 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ Dihydrat,
15 % (w/v) Glycerin

RF1 und RF2 wurden steril filtriert.

yPGK-Isolierung und ~Reinigung

- Aufschlusspuffer:
30 mM MOPS, pH 7,5; 500 mM NaCl, 2 mM DTT
- Waschpuffer I:
Aufschlusspuffer + 2,5 mM Imidazol
- Waschpuffer II:
Aufschlusspuffer + 5 mM Imidazol
- Elutionspuffer:
Aufschlusspuffer + 250 mM Imidazol
- Lagerpuffer:
30 mM MOPS, pH 7,5; 50 mM NaCl, 2 mM EDTA

SDS PAGE

- 5x Probenpuffer:
60 mM Tris/HCl, pH 6,8
8 M Urea,
14,4 mM β -Mercaptoethanol
2 % (w/v) SDS
25 % (w/v) Glycerin
0,1 % (w/v) Bromphenolblau

2 Material

- Coomassie Blue Silver
 - 0,12 % Coomassie G250
 - 10% Ammoniumsulfat
 - 10% Phosphorsäure
 - 20% Methanol

Blue Native PAGE:

- 2x Probenpuffer:
 - 1 M 6-Aminocaproinsäure
 - 100 mM BisTris-HCl, pH 7,0
 - 100 mM NaCl
 - 20 % (w/v) Glycerin
 - 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250
- 10x Kathodenpuffer:
 - 500 mM Tricin, 150 mM BisTris
- 10x Anodenpuffer:
 - 500 mM BisTris-HCl, pH 7,0
- Fixierlösung:
 - 20 % (w/v) Trichloressigsäure
- Stammlösung 1:
 - 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva Blau R) in 90 % (v/v) Ethanol
- Stammlösung 2:
 - 20 % (v/v) Essigsäure
- Färbelösung:
 - Stammlösung 1 und 2 im Mischungsverhältnis 1:1

- Entfärbelösung:
20 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Essigsäure,
1 % (w/v) Glycerin

Westernblot: HRP-Detektion

- Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (*enhanced chemiluminescence*)
(GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)

Markierung der yPGK mit Fluoreszenzfarbstoffen

- yPGK *Labelling* Puffer:
50 mM MOPS, pH 7,5; 500 mM NaCl
- AEKTA Puffer I:
10 mM MOPS, pH 7,5
- AEKTA Puffer II:
10 mM MOPS, pH 7,5; 1 M NaCl

Charakterisierung des nativen Zustands der yPGK

- CD Puffer:
10 mM MOPS, pH 7,5
- Aktivitätstestpuffer:
50 mM MOPS/10 mM KH₂PO₄, pH 7,5; 50 mM NaCl
- FRET Puffer:
50 mM MOPS, pH 7,5; 50 mM NaCl

yPGK-Entfaltungstudien

- CD Puffer + verschiedene Konzentrationen GndHCl (0-4 M)
- FRET Puffer + verschiedene Konzentrationen GndHCl (0-4 M)

Antibiotika

Ampicillin Natriumsalz (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Kanamycin-Sulfat (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)

Inhibitoren

Protease Inhibitor Cocktail (Tabletten), cOmplete, EDTA-frei
(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Antikörper

Monoclonal Anti-polyHistidine-Peroxidase antibody (produziert in Mäusen)
(Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Enzyme

Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from baker's yeast (GAPDH)
(Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Phusion[®] Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.,
Waltham, MA, USA)

antarctic phosphatase (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)

Restriktionsenzyme: FastDigest[®] Enzyme (Thermo Fisher Scientific,
Waltham, MA, USA)

T4-DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Thrombin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

DNase I aus Kälberpankreas (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Enzypuffer

5x Phusion[®] HF Reaktionspuffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

10x FastDigest[®] Puffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

10x *antarctic phosphatase* Reaktionspuffer (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)

10x T4-Dna Ligase Puffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

10x Thrombin Puffer (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Escherichia coli Stämme

E. coli Top10 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

E. coli BL21 CodonPlus (DE3)-RP (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)

Plasmide

- pCR[®] Blunt Vector (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- pET 15b (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland):
Bei Expression aus diesem Vektor wurde den Sequenzen der yPGK-Varianten N-terminal folgende Sequenz, die ein 6x His-Tag (grün) und eine Thrombinschnittstelle (blau) beinhaltet, angehängt:
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH
- pET 27b+ (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland)
Bei Expression aus diesem Vektor wurde der Sequenz des yPGK-WT C-terminal folgende Sequenz, die ein HSV-Tag (orange) und ein 6x His-Tag beinhaltet angehängt: ASQPELAPEDPEDVEHHHHHH

Größenstandards

DNA Standard:

- 1 Kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Protein Standards:

- Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- BenchMark™ His-tagged Protein Standard (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- SERVA Native Marker Liquid Mix für BN/CN (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Nukleotide und Oligonukleotide

dNTP-Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Oligonukleotide (Eurofins Genomics Europe, Ebersberg, Deutschland)

Restriktionsschnittstellen und substituierte Basen sind farbig markiert.

FP **NheI** **NdeI** Sc PGK WT

5' **GCT AGC** **CAT ATG** TCT TTA TCT TCA AAG TTG TCT GTC C 3'

RP **BamHI** **NheI** Sc PGK WT(XL)

5' **GGA TCC** TCA **GCT AGC** TTT CTT TTC GGA TAA GAA AGC AAC ACC TGG
CAA TTC CT 3'

RP C97S Sc PGK (**TGT → TCT**)

5' CA ACT **TCT** GGA CCG ACA GAG TCG TTC AAG AAG G 3'

FP NdeI SIC Sc PGK (XL)(TCT → TGT)

5' GC CAT ATG TGT TTA TCT TCA AAG TTG TCT GTC CAA GAT TTG GAC 3'

RP Q135C Sc PGK (CAA → TGC)

5' GGA AGC CTT GAC CTT GCA ACC ATC GAC CTT TCT G 3'

FP T202C Sc PGK (ACC → TGC)5' C GGT AAG GCT TTG GAG AAC CCA TGC AGA CCA TTC TTG GCC
ATC TT 3'**FP D256C Sc PGK (GAC → TGC)**5' G GAA AAC ACT GAA ATC GGT GAC TCC ATC TTC TGC AAG GCT
GGT GC 3'**FP S290C Sc PGK (TCT → TGT)**

5' C ATT GCT GAT GCT TTC TGT GCT GAT GCC AAC ACC 3'

yPGK-Sequenzen

Kodierende DNA-Sequenz des yPGK Wildtyps

```

0001 ATGTC TTTAT CTTCA AAGTT GTCTG TCCAA GATTT GGACT TGAAG GACAA
0051 GCGTG TCTTC ATCAG AGTTG ACTTC AACGT CCCAT TGGAC GGTA A GAAGA
0101 TCACT TCTAA CAAA GAAT GTTGC TGCTT TGCCA ACCAT CAAGT ACGTT
0151 TTGA ACACC ACCA AGATA CGTTG TCTTG GCTTC TCACT TGGGT AGACC
0201 AAACG GTGAA AGAAA CGAAA AATAC TCTTT GGCTC CAGTT GCTAA GGAAT
0251 TGCAA TCATT GTTGG GTAAG GATGT CACCT TCTTG AACGA CTGTG TCGGT
0301 CCAGA AGTTG AAGCC GCTGT CAAGG CTTCT GCCC AGGTT CCGTT ATTTT
0351 GTTGG AAAAC TTGCG TTACC ACATC GAAGA AGAAG GTTCC AGAAA GGTCCG
0401 ATGGT CAAA GGTCA AGGCT TCCAA GGAAG ATGTT CAAA GTTCA GACAC
0451 GAATT GAGCT CTTTG GCTGA TGTTT ACATC AACGA TGCCT TCGGT ACCGC
0501 TCACA GAGCT CACTC TTCTA TGGTC GGTTT CGACT TGCCA CAACG TGCTG
0551 CCGGT TTCTT GTTGG AAAAG GAATT GAAGT ACTTC GGTA GGCTT TGGAG
0601 AACCC ACCA GACCA TTCTT GGCCA TCTTA GGTGG TGCCA AGGTT GCTGA
0651 CAAGA TTCAA TTGAT TGACA ACTTG TTGA CAAGG TCGAC TCTAT CATCA
0701 TTGTT GGTGG TATGG CTTTC ACCTT CAAGA AGGTT TTGA AAACA CTGAA
0751 ATCGG TGA CT CCATC TTCGA CAAGG CTGGT GCTGA AATCG TTCCA AAGTT
0801 GATGG AAAAG GCCAA GGCCA AGGTT GTCGA AGTCG TCTTG CCAGT CGACT
0851 TCATC ATTGC TGATG CTTTC TCTGC TGATG CCAAC ACCAA GACTG TCACT
0901 GACAA GGAAG GTATT CCAGC TGGCT GGCAA GGGTT GGACA ATGGT CCAGA
0951 ATCTA GAAAG TTGTT TGCTG CTA CT GTTGC AAAG CTAAG ACCAT TGTCT
1001 GGAAC GGTCC ACCAG GTGTT TTCGA ATTCG AAAAG TTCGC TGCTG GTACT
1051 AAGGC TTTGT TAGAC GAAGT TGTCA AGAGC TCTGC TGCTG GTAAC ACCGT
1101 CATCA TTGGT GGTGG TGACA CTGCC ACTGT CGCTA AGAAG TACGG TGTCA
1151 CTGAC AAGAT CTCCC ATGTC TCTAC TGGTG GTGGT GCTTC TTTGG AATTA
1201 TTGA AGGTA AGGAA TTGCC AGGTG TTGCT TTCTT ATCCG AAAAG AAATA
1251 A

```

Basen, die in verschiedenen yPGK-Mutanten gegen Cystein kodierende Triplets (TGT oder TGC) ausgetauscht wurden, sind farbig markiert:

S1C (rot) TCT zu TGT, Q135C (grün) CAA zu TGC, T202C (cyan) ACC zu TGC, D256C (blau) GAC zu TGC, S290C (violett) TCT zu TGT.

Das Triplet, das das natürliche Cystein (C97) kodiert ist grau hinterlegt. In den Cysteinmutanten der yPGK wurde es durch TCT (Serin) ersetzt.

Aminosäuresequenz des yPGK Wildtyps

```

001 MSLS KLSVQ DLDLK DKRVF IRVDF NVPLD GKKIT SNQRI VAALP TIKYV
051 LEHHP RYVVL ASHLG RPNGE RNEKY SLAPV AKELQ SLLGK DVTFL NDCVG
101 PEVEA AVKAS APGSV ILLEN LRYHI EEEGS RKVDG QKVKA SKEDV QKFRH
151 ELSSL ADVYI NDAFG TAHRA HSSMV GFDLP QRAAG FLLEK ELKYF GKALE
201 NPTRP FLAIL GGAKV ADKIQ LIDNL LDKVD SIIIG GGMAF TFKKV LENTE
251 IGDSI EDKAG AEIVP KLMEK AKAKG VEVVL PVDFI IADAF SADAN TKTVT
301 DKEGI PAGWQ GLDNG PESRK LFAAT VAKAK TIVWN GPPGV FEFEK FAAGT
351 KALLD EVVKS SAAGN TVIIG GGDTA TVAKK YGVD T KISHV STGGG ASLEL
401 LEGKE LPGVA FLSEK K

```

Aminosäuren, die in verschiedenen yPGK-Mutanten gegen Cystein ausgetauscht wurden, sind farbig markiert:

S1C (rot), Q135C (grün), T202C (cyan), D256C (blau), S290C (violett).

Das natürliche Cystein (C97) ist grau hinterlegt. In den Cysteinmutanten der yPGK wurde es durch Serin ersetzt.

3 Methoden

3.1 Methoden der Klonierung

Der Begriff Klonierung beschreibt in der Molekularbiologie das Einbringen von DNA-Fragmenten in Vektoren. Vektoren dienen als Transportmittel der Übertragung eines Transgens in eine Empfängerzelle und erlauben daher z.B. die Vermehrung der DNA und die Transkription oder Expression eines Gens. Um ein DNA-Fragment zu klonieren, bedarf es Methoden der Isolierung, Amplifikation und gentechnischen Modifizierung von Nukleinsäuren, die in den folgenden Abschnitten beschrieben sind.

3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente oder vollständige Gene werden mit der PCR-Methode amplifiziert (Mullis et al., 1986). Kurze Oligonukleotide, sogenannte Primer, binden spezifisch an komplementäre Bereiche der eingesetzten Template-DNA. Primer können außerdem genutzt werden, um spezifische Modifikationen, z.B. das Einfügen bestimmter Mutationen oder Restriktionsschnittstellen, am Gen vorzunehmen. Als Template dienen genomische DNA oder Plasmide, die die zu amplifizierende DNA-Sequenz enthalten. Thermostabile Polymerasen katalysieren in mehreren Reaktionszyklen die Synthese der zwischen den Primern gelegenen Sequenz.

Zur Amplifizierung des PGK-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* (*ypgk*) wurden rekombinante Plasmide, die die Hefe-PGK-Sequenz enthalten, als Template eingesetzt. Die in dieser Arbeit verwendete Phusion DNA Polymerase synthetisiert PCR-Produkte ohne Basenüberhang mit glatten Enden. Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 zeigen den verwendeten PCR-Ansatz und das PCR-Programm zur Amplifizierung des *ypgk* -Gens.

Tabelle 3.1: Standard PCR-Ansatz zur Amplifizierung von *ypgk*.

Komponente	Konzentration	Volumen
Plasmid-DNA	1 pg / μ l - 10 ng / μ l	1 μ l
Phusion HF buffer	5x	10 μ l
dNTPs	10 mM / Komponente	1 μ l
5'-Primer	10 pmol / μ l	10 μ l
3'-Primer	10 pmol / μ l	10 μ l
DMSO	100 %	5 μ l
Phusion Polymerase*	2 u* / μ l	0,5 μ l
dH ₂ O	---	12,5 μ l
Gesamtvolumen		50 μl

* Laut Hersteller (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) inkorporiert eine Einheit (u) des Enzyms in 30 min bei 74 °C 10 nmol dNTPs.

Tabelle 3.2: Standard PCR-Programm zur Amplifizierung von *ypgk*.

Initiale Denaturierung	Denaturierung	annealing	Elongation	Zyklen	Finale Elongation
98 °C	98 °C	68 °C	72 °C	45	72 °C
30 s	10 s	15 s	20 s		5 min

3.1.2 Primerabhängige Mutagenese

Durch primerabhängige Mutagenese können zielgerichtet Punktmutationen in ein Gen eingefügt werden (Hutchison et al., 1978). Dies geschieht mit Hilfe eines Primers, der die gewünschte Mutation trägt. Die Methode verläuft in zwei Schritten (Abbildung 3.1): In einer ersten PCR-Reaktion (PCR I) wird ein Genfragment amplifiziert, das die gewünschte Mutation enthält. Es wird in einer zweiten PCR-Reaktion (PCR II) als Maxiprimer eingesetzt, um die Synthese des vollständigen, mutierten Gens zu vollenden.



Abbildung 3.1: Primerabhängige Mutagenese.

In zwei PCR-Reaktionen werden Punktmutationen in ein Gen eingefügt. Im ersten Schritt (PCR I) wird ein Primer, der die gewünschte Mutation trägt, eingesetzt, um den Primer (Maxiprimer) für die vollständige Amplifizierung des mutierten Gens (PCR II) herzustellen.

Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 zeigen die entsprechenden PCR-Ansätze und PCR-Programme zur Mutagenese der *ypgk*.

Tabelle 3.3: PCR-Ansätze zur Mutagenese der *ypgk* (PCR I/II).

Komponente	Konzentration	Volumen
Plasmid-DNA	1 pg / μ l - 10 ng / μ l	1 μ l
Phusion HF buffer	5x	10 μ l
dNTPs	10 mM / Komponente	1 μ l
5'-Primer/Maxiprimer	10 pmol / μ l	10 μ l
3'-Primer/Maxiprimer	10 pmol / μ l	10 μ l
DMSO	100 %	5 μ l
Phusion Polymerase*	2 u / μ l *	0,5 μ l
dH ₂ O	---	12,5 μ l
Gesamtvolumen		50 μl

* Laut Hersteller (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) inkorporiert eine Einheit (u) des Enzyms in 30 min bei 74 °C 10 nmol dNTPs.

Tabelle 3.4: PCR-Programme zur Mutagenese der *ypgk* (PCR I/II).

Initiale Denaturierung	Denaturierung	annealing	Elongation	Zyklen	Finale Elongation
98 °C	98 °C	68 °C	72 °C	45	72 °C
30 s	10 s	15 s	15 s/20 s		5 min

3.1.3 Endonukleolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die klassischen Restriktionsenzyme (TypII REasen) erkennen Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren in einem DNA-Strang spezifisch. Sie spalten die Phosphodiesterbindung zwischen zwei Basenpaaren an konstanten Positionen innerhalb dieser Erkennungssequenz so, dass die Phosphatgruppe immer am 5'-Ende des geschnittenen DNA-Fragments verbleibt. Dabei können Spaltprodukte mit glatten Enden oder komplementären 5'- bzw. 3'-Überhängen entstehen (Mülhardt, 2009). Man unterscheidet zwischen analytischem Restriktionsverdau zum enzymatischen Nachweis eines DNA-Fragments in einem Plasmid und präparativem Restriktionsverdau, der dazu dient, ein DNA-Fragment aus einem Plasmid zu isolieren. In dieser Arbeit wurden FastDigest® Enzyme (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet, die in dem zugehörigen kommerziellen Universalpuffer (FastDigest® Puffer) aktiv sind. Die Restriktionsbedingungen und Enzymmengen wurden den Angaben des Herstellers entsprechend angepasst (Tabelle 3.5). Sie richten sich hauptsächlich nach der verwendeten Menge der Plasmid-DNA.

Tabelle 3.5: Ansätze für analytische und präparative Restriktionsspaltung.

Komponente	Analytische Restriktionsspaltung	Präparative Restriktionsspaltung
Plasmid DNA (Mini)	5 µl	25 µl
FastDigest® Enzym I*	1 µl	2,5 µl
FastDigest® Enzym II*	1 µl	2,5 µl
10x FastDigest® Puffer	1 µl	5 µl
dH ₂ O	2 µl	15 µl
Gesamtvolumen	10 µl	50 µl
Inkubationszeit bei 37 °C	15 min	120 min

* Angaben des Herstellers (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) zur Enzymaktivität: 1µl Enzym hydrolysiert 1µg DNA in 5-15 min bei 37 °C

3.1.4 Dephosphorylierung von DNA

Bevor ein DNA-Fragment in ein Plasmid ligiert werden kann, wird der durch Restriktionsverdau geöffnete Vektor dephosphoryliert. Dabei wird die 5'-Phosphatgruppe durch eine Phosphatase entfernt, was die Selbstligation des Vektors verhindert. Zu einem präparativen Restriktionsansatz wird eine Aktivitätseinheit (u) der *antarctic phosphatase* und eine adäquate Menge 10x Reaktionspuffer (*antarctic phosphatase reaction buffer*) gegeben. Die Dephosphorylierung dauert, bei 37 °C, 30 bis 60 Minuten. Eine Einheit Phosphatase dephosphoryliert, laut Angaben des Herstellers, 1 µg pUC19 Plasmid, das mit HindIII (5'-Überhang), HincII (glatte Enden) oder PstI (3'-Überhang) linearisiert wurde, in 30 Minuten. Vor der Ligation eines DNA-Fragments in das Plasmid muss die Phosphatase thermisch inaktiviert werden. Dies geschieht durch Inkubation für 5 min bei 70 °C.

3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die kovalente Bindung freier 3'-Hydroxyl-mit 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA und wird deshalb standardmäßig verwendet, um durch Restriktionsverdau oder PCR-Reaktion gewonnene DNA-Fragmente in Vektoren zu integrieren (Mülhardt, 2009). Das DNA-Fragment wird im Überschuss zum linearisierten, dephosphorylierten Vektor in den Ligationsansatz (Tabelle 3.6) gegeben. Es muss darauf geachtet werden, dass die Bedingungen im Ansatz (das betrifft neben Salzzusammensetzung und -konzentration hauptsächlich die Zugabe von ATP) und auch außerhalb des Reaktionsgefäßes (1-16 h bei Raumtemperatur) die Aktivität des Enzyms begünstigen.

Ligation von PCR-Produkten:

Zur Ligation von PCR-Produkten des *ypgk* Gens wurde das Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet. Es erlaubt die Klonierung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden, wie sie die in dieser Arbeit eingesetzte Phusion Polymerase synthetisiert. Zur Vermehrung der Plasmid-DNA in *E.coli* wurde der Vektor pCR Blunt™ verwendet, der ein Fusionsprotein aus

3.1 Methoden der Klonierung

bakteriellem *ccdB* und *lacZ* codiert. Die erfolgreiche Ligation eines PCR-Fragments verhindert die Expression des *ccdB-lacZ*-Gens und damit den Zelltod, denn *ccdB* ist cytotoxisch für Bakterien. Zellen, die nichtrekombinante Vektoren enthalten, exprimieren *ccdB-lacZ* und sterben. Die Ligationsbedingungen wurden den Vorgaben des Herstellers entsprechend angepasst.

Ligation von Restriktionsprodukten:

Zur Integration der *ypgk*-Varianten in das pET15b Expressionssystem wurden Restriktionsschnittstellen mit überhängenden Enden (*sticky ends*) genutzt. Das *ypgk*-Gen wird von einer NdeI (5'-Überhang mit zwei Basen) und einer BamHI (5'-Überhang mit vier Basen) Schnittstelle flankiert und mit diesen Enzymen aus PCR Blunt™ ausgeschnitten. Der Expressionsvektor pET15b wurde vor der Ligation mit NdeI/BamHI geöffnet und dephosphoryliert.

Tabelle 3.6: Ligationsansatz.

Komponente	Konzentration	Volumen
pET 15b (linearisiert, dephosphoryliert)	---	5 µl
Restriktionsprodukt (PGK)	---	15 µl
10 x T4 DNA Ligase Puffer	10 x	1 µl
T4 DNA Ligase	5 Weiss U / µl*	1 µl
dH ₂ O	---	8 µl
Gesamtvolumen		30 µl

* Eine Weiss-Einheit ist definiert als die Enzymmenge, die benötigt wird, um unter spezifischen Reaktionsbedingungen in 20 Minuten 1 nmol des ³²P-Isotops anorganischen Pyrophosphats in Norit umzusetzen (Weiss et al., 1968). Norit ist eine Aktivkohle.

3.1.6 Auftrennung von Nukleinsäuren mit Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die gebräuchlichste Methode zur Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten zwischen 0,5 kb und 25 kb Länge. Die Auftrennung beruht auf der unterschiedlichen Geschwindigkeit, mit der sich die aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld durch die Gelmatrix bewegen. Die Agarose wird durch Erwärmen in Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE: 40 mM Tris/AcOH, pH 8; 1 mM EDTA) gelöst und in den Schlitten der Elektrophorese-Apparatur gegossen. Mit einem Kamm werden am oberen Ende des Gels Taschen implementiert. Abkühlen führt dazu, dass die Agarose geliert. Zuvor wird ihr der Farbstoff Gelred™ zugegeben, der zwischen die Basen der Nukleinsäuren interkaliert, durch UV Licht angeregt werden kann und Licht im sichtbaren Bereich emittiert. Bevor die DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert werden können, werden sie mit Ladepuffer (6x Orange Blue) versetzt, der die Farbstoffe Xylencyanol und Orange G als Laufkontrollen enthält. Zur Identifizierung des *ypgk*-Gens wurden 1 % Agarosegele verwendet. Xylencyanol läuft bei dieser Agarosekonzentration auf Höhe der 3 kb Marke, Orange G bei 50 bp. Mit einem Geldokumentationssystem wird das spezifische DNA-Muster nach erfolgter Elektrophorese abgebildet.

Extraktion von Nukleinsäuren aus einem Agarosegel

PCR- oder Restriktionsprodukte können nach der Elektrophorese aus dem Gel extrahiert werden. Die entsprechende Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten, das Gelstück anschließend solubilisiert und die DNA aus der Lösung isoliert. Gelextraktionen wurden mit dem QIAEX II® Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

3.1.7 Herstellung transformationskompetenter Zellen (*E.coli*)

Transformationskompetenz ist die Fähigkeit von Bakterien, DNA aus der unmittelbaren Umgebung aufzunehmen. Eine hohe Transformationskompetenz ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Transformation. Nur wenige Bakterienspezies zeigen eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von DNA aus der Umgebung. Das im Labor

3.1 Methoden der Klonierung

üblicherweise verwendete Darmbakterium *Escherichia coli* gehört nicht dazu, jedoch kann durch chemische Behandlung mit CaCl_2 und / oder RbCl eine künstliche Kompetenz erreicht werden. Die Zellen werden in 50 ml SOB-Kulturen bei 37°C und einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0,1$ kultiviert, bis eine Zelldichte von $4 - 7 \cdot 10^7$ Zellen / ml erreicht ist. Das entspricht etwa einer optischen Dichte $\text{OD}_{600} = 0,3$. Die Kultur wird dann in ein 50 ml Reaktionsgefäß umgesetzt und für 15 – 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen bei 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wird vorsichtig in einem Drittel des Ursprungsvolumens eiskaltem RF1 (30 mM KAc / Essigsäure, pH 5,8; 100 mM RbCl ; 80 mM MnCl_2 ; 15 mM CaCl_2 ; 15 % (w / v) Glycerin) resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt erneut eine Zentrifugation bei 4°C , um die Bakterien zu pelletieren. Sie werden dann in 4 ml kaltem RF2 (10 mM MOPS / NaOH, pH 6,8; 10 mM RbCl ; 75 mM CaCl_2 Dihydrat; 15 % (w / v) Glycerin) aufgenommen und wiederum 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Lagerung bei -80°C wird die Zellsuspension in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gemessen wird die Kompetenz von Bakterien durch die Transformationseffizienz mit bestimmten Kontrollvektoren, z.B. pUC18.

3.1.8 Transformation von *E.coli*

Durch Transformation werden rekombinante Plasmide in Bakterienzellen zum Zweck der Vervielfältigung oder der Expression eines Transgens eingeführt. Die Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA wurde mit der Hitzeschockmethode durchgeführt. Dazu werden kompetente *E.coli* Zellen mit dem gewünschten Plasmid 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Die transformierten Bakterien werden noch für ca. 2 min auf Eis gestellt bevor sie in 1 ml DYT-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert werden. Nach dieser Regenerationsphase werden die Zellen gegebenenfalls pelletiert, in einem adäquaten Volumen Medium oder Puffer aufgenommen und anschließend auf einem selektiven Festmedium ausplattiert. Nach 12 – 16 h Kultivierung bei 37°C werden einzelne Kolonien zur weiteren Bearbeitung ausgewählt.

3.1.9 Kultivierung von *E.coli*

E. coli wurde in Schüttelkulturen bei 120 rpm und 37 °C angezogen. Dem DYT-Medium wurde zur Selektion das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin: 200 µg / ml bzw. Kanamycin: 50 µg / ml) zugegeben. Transformierte *E.coli* wurden auf Agarplatten, ebenfalls unter selektiven Bedingungen, kultiviert.

3.1.10 Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen aus *E.coli* sind in allen erdenklichen Größendimensionen von der Mini-bis zur Gigapräparation möglich und entsprechende Kits sind kommerziell erhältlich. Allerdings liefern Minipräparationen, ausgehend von fünf Millilitern Bakterienkultur, so große Plasmid-Mengen von sehr hoher Qualität, dass diese meist als Ausgangsmaterial für die gängigen molekularbiologischen Arbeiten ausreichen. In dieser Arbeit wurden Plasmidpräparationen mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Das Kit beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse als Bakterienaufschlussmethode. Dabei wird die Bakterienzellwand zerstört und eine erste Reinigung des Lysats von Membranen, großen Teilen des bakteriellen Proteoms und Genoms erzielt. DNA denaturiert bei stark alkalischem pH. Bei Neutralisierung hybridisieren die beiden Stränge der Plasmide schnell, während die größere genomische DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt. RNaseA in der Lösung verdaut die RNA. Nach Zentrifugieren bleiben Plasmide im Überstand. Sie werden auf im Kit enthaltene Säulen geladen, die eine Silica-Membran enthalten. Plasmide binden bei hoher Salzkonzentration an die Membran und können mit kleinen Volumina (50 – 100 µl) Niedrigsalzpuffer eluiert werden.

3.1.11 Sequenzierung

Um abschließend zu überprüfen, ob das gewünschte DNA-Fragment, in dieser Arbeit das *ypgk*-Gen oder dessen Varianten, vollständig und ohne unerwünschte Mutationen in den Expressionsvektor integriert wurde, muss das rekombinante Plasmid sequenziert werden. Zur Sequenzierung wurden Primer verwendet, die der vektoreigenen Promoter- bzw. Terminatorregion (T7 Promoter/ Terminator) komplementär sind. In dieser Arbeit

wurde das Angebot der Firma Eurofins MWG genutzt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe der Online-Software MultAlin mit der korrekten Gensequenz verglichen (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>; 06.09.2016; (Corpet, 1988))

3.2 Biochemische Methoden

Nach erfolgreichem Transfer des *ypgk*-Gens in einen adäquaten Vektor, wurde das Hefeenzym in *E.coli* exprimiert, aus den Bakterien isoliert, gereinigt und mit biochemischen Methoden nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Enzymaktivität der Cysteinmutanten im Vergleich zum Wildtyp bestimmt.

3.2.1 Expression der yPGK in *E.coli*

Vor der eigentlichen Expression der yPGK wurde *E.coli* BL21 Codon Plus RP mit pET15b, der das Gen für die entsprechende PGK-Mutante und das Ampicillinresistenz-Gen trägt, mittels Hitzeschock-Methode transformiert und auf DYT-Ampicillin-Agar in Petrischalen mit einem Durchmesser $\varnothing = 15$ cm ausplattiert. Für zwei Liter Bakterienkultur wurden zwei Transformationen durchgeführt. Die Bakterien auf den Agarplatten wurden in insgesamt 60 ml DYT^{Amp200}-Medium aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde verwendet, um vier 500 ml-Kulturen zu inokulieren ($OD_{600} = 0,1 - 0,2$). Die Kulturen wurden bei 120 rpm und 37 °C inkubiert und nach Erreichen einer optischen Dichte $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h Kultivierung wurden die Bakterien pelletiert (20 min, 6000 rpm, AvantiTM J-20 XP centrifuge, Rotor JLA-8.1, Beckmann Coulter Inc., Brea, CA, USA), der Überstand abgenommen und das Pellet bei $T = -80$ °C gelagert.

3.2.2 Proteinreinigung

Zellaufschluss

Nach der Expression der yPGK in *E.coli* wurden die Bakterien mechanisch aufgeschlossen. Das Zellpellet wurde in 50 ml Aufschlusspuffer (30 mM MOPS, pH 7,5; 500 mM NaCl; 2 mM DTT) aufgenommen. In einem vorbereitenden Schritt

wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators homogenisiert. Die Zugabe von DNaseI zur Bakteriensuspension bewirkt den Abbau der genomischen DNA. Der eigentliche Zellaufschluss wurde mit dem Zelldisruptor durchgeführt. Die Suspension wird mit einem Druck von 1,7 mbar durch eine feine Düse gepresst, wobei noch unaufgeschlossene Zellen durch hohe Scherkräfte zerstört werden. Das Lysat wurde anschließend ultrazentrifugiert (35000 rpm, Optima XPN-80 ultracentrifuge, Rotor Ti 70, Beckmann Coulter Inc., Brea, CA, USA) und der Überstand, der die lösliche yPGK enthält, für weitere Reinigungsschritte abgenommen.

Fällung

Zum Aussalzen der PGK wurde Ammoniumsulfat verwendet. Durch seine hohe Löslichkeit in Wasser (754 g l^{-1} ; $20 \text{ }^\circ\text{C}$) werden hohe Ionenstärken erreicht und dadurch die Löslichkeit der Proteine in der Probe effektiv verringert. Ein Vorteil des Ammoniumsulfats gegenüber anderen Salzen ist, dass die ausgesalzenen Proteine ihre native Struktur behalten. Verschiedene Proteine fallen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen aus. Indem die Salzkonzentration schrittweise erhöht wird und die ausgefallenen Proteine jeweils durch Zentrifugation aus der Lösung entfernt werden, lässt sich eine partielle Reinigung und Anreicherung eines bestimmten Proteins erreichen. yPGK wurde in zwei Schritten präzipitiert: Zur ersten Fällung wird der Probe Ammoniumsulfat mit einer Endkonzentration von $c = 1,5 \text{ M}$ zugesetzt. Die zweite Fällung erfolgt mit $2,5 \text{ M}$ Ammoniumsulfat.

Affinitätschromatographie (*immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC*)

Die Affinitätschromatographie dient der spezifischen Isolierung von Proteinen aus einem Proteingemisch. Sie nutzt reversible Interaktionen (elektrostatische oder hydrophobe Interaktionen, van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen Proteinen und der Chromatographie-Matrix. Zur Elution der an die Matrix gebundenen Proteine muss die Interaktion rückgängig gemacht werden. Dies kann, je nach verwendeter Methode, spezifisch durch Zugabe eines kompetitiven Liganden oder unspezifisch durch Veränderung des pH-Wertes, der Ionenstärke oder

der Polarität erfolgen. IMAC wird hauptsächlich als Zwischenschritt verwendet, um ein Protein aus einem Zelllysatz zu isolieren.

Nitrilotriessigsäure (NTA) ist ein Chelatbildner. In wässriger Lösung bildet NTA stabile Komplexe mit Metallionen, z.B. mit Nickelionen (Ni-NTA). Das Ni-NTA-Substrat wird verwendet, um rekombinante Proteine, die ein His-tag (6 zusätzliche Histidine am N- oder C-Terminus) tragen, und ebenfalls in der Lage sind mit Ni^{2+} zu komplexieren, zu selektieren (Block et al., 2009). Die Elution erfolgt mit Imidazol, der Seitengruppe des Histidins, als Kompetitor. Der Vorteil der Methode besteht darin, dass das His-tag vergleichsweise klein ist und die Proteinstruktur, -stabilität und -funktion nicht erheblich beeinträchtigt. Die Entfernung des tags ist damit nicht von höchster Priorität. Nachteilig ist, dass das Ni-NTA-Material Proteine nur limitiert spezifisch bindet, d.h., die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination mit z.B. histidinreichen Proteinen aus dem Zelllysatz ist relativ hoch. Deshalb ist es notwendig weitere Reinigungsschritte, zum Beispiel eine Gelfiltration, anzuschließen. Zur Reinigung der yPGK wurde eine Chromatographiesäule, gepackt mit 10 ml Ni-NTA-Material, verwendet. Der PGK-Wildtyp trägt ein C-terminales 6 x His-tag, während seine Cysteinmutanten N-terminale His-tags haben. Das Säulenmaterial wird mit dem Lysatz inkubiert, wobei die His-markierten Proteine an das Material binden. In zwei Waschschrritten mit 2,5 mM Imidazol und 5 mM Imidazol, werden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution der PGK erfolgt mit 250 mM Imidazol. Das Imidazol und auch das im Elutionspuffer enthaltene Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) wurden durch Dialyse gegen PGK-Lagerpuffer entfernt. Imidazol würde bei späteren Fluoreszenzmessungen durch seine Eigenfluoreszenz stören, während DTT die Effizienz der Markierungsreaktion reduziert.

Protease-Verdau zur Entfernung des His-tags

Thrombin, eine Endoprotease, wurde verwendet, um das N-terminale His-tag von der yPGK-Sequenz zu entfernen. Der Verdau erfolgt selektiv nach einem lösungsmittel-exponierten Prolin-Arginin-Paar. Als Erkennungssequenz diente die vom Vektor pET15b kodierte Aminosäureabfolge: Leu Val Pro Arg / Gly Ser, die zwischen

dem His-tag und der Sequenz des rekombinanten Proteins positioniert ist. Tabelle 3.7 zeigt einen typischen Ansatz zum Thrombin-Verdau der yPGK.

Tabelle 3.7: Ansatz zum Thrombinverdau zur Entfernung des His-tags von der yPGK.

Komponente	Konzentration	Volumen
yPGK	~ 100 μ M	3 ml
Thrombin-Puffer	10x	0,6 ml
Thrombin	1 u/ μ l	12 μ l
dH ₂ O	---	2,388 ml
Gesamtvolumen		6 ml

Der Ansatz wurde 2,5 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein Volumen von $V = 3$ ml konzentriert. Die Entfernung der Protease aus der Probe erfolgte mit Hilfe einer mit Benzamidin-Sepharose gepackten Chromatographie-Säule (HiTrap™ Benzamidine FF, 2x 1ml, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) und einem automatisierten FPLC-System (*fast protein liquid chromatography*, ÄKTAexplorer 10, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Im Gegensatz zur yPGK bindet Thrombin mit hoher Affinität an das Säulenmaterial. Der Durchfluss enthält die yPGK und wurde auf eine Ni-NTA-Säule geladen. Durch unvollständigen Verdau in der Probe verbliebenes His-markiertes Protein bleibt am Säulenmaterial gebunden. Der Durchfluss enthält yPGK ohne His-tag. Die so gereinigte Probe wurde durch Dialyse in yPGK-Lagerpuffer überführt, konzentriert und in kleinen Aliquots bei -80 °C gelagert.

Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC)

Die Größenausschlusschromatographie wird zur finalen Reinigung bei der Proteinisolierung eingesetzt. Sie ermöglicht die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht unter physiologischen Bedingungen während sie das SEC-Medium passieren. Mittels SEC können Proteinkontaminationen und Proteinoligomere bzw. Aggregate aus der Probe entfernt werden. Zur Reinigung der yPGK durch SEC wurden

ein automatisiertes FPLC-System (ÄKTAexplorer 10, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) und eine kommerziell erhältliche Chromatographie-Säule (Superdex 200 (16/60), GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) verwendet. Fraktionen, die yPGK enthalten, wurden gepoolt und konzentriert.

Die Proteinkonzentration wurde UV / Vis-spektroskopisch bestimmt. Dazu wurde die Absorption der aromatischen Seitengruppen (Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm mit einem Fotospektrometer (UV – 2401 PC, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) gemessen und das Lambert-Beer'sche Gesetz zur Berechnung der Konzentration genutzt:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3.1)$$

mit der Absorption A, der Intensität des einfallenden und transmittierten Lichts I_0 und I, dem molaren Extinktionskoeffizienten der yPGK ε , der yPGK-Konzentration c und der Pfadlänge d. Als molarer Extinktionskoeffizient der yPGK bei $\lambda = 280$ nm wurde $\varepsilon = 22062 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angenommen (Pace et al., 1995).

3.2.3 Natriumdodecylsulfat–Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ist die Standardmethode zur Größenauftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. Proteine werden in 5 x Proben-Puffer (60 mM Tris / HCl, pH 6,8; 8 M Urea, 14,4 mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS, 25 % Glycerol, 0,1 % Bromphenolblau) aufgenommen, der sowohl β -Mercaptoethanol als auch SDS enthält. SDS ist ein anionisches Detergens, das Proteine denaturiert und ihnen negative Ladungen verleiht. β -Mercaptoethanol reduziert die Thiolgruppen der Cysteine und verhindert die Bildung von Disulfidbrücken. Um die Linearisierung der zu trennenden Proteine noch zu verbessern, wird die Probe vor der Elektrophorese auf 95 °C erhitzt. Die negativ geladenen SDS–Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld durch das Gel zum Pluspol und werden in der Polyacrylamid (PAA-) Matrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Elektrophorese der yPGK wurden TruPAGE™ Precast Gele und der dazugehörige TruPAGE TEA-Tricine SDS Running Buffer

(Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) verwendet. Um nach Coomassie-Färbung ein deutliches Signal zu erhalten, wurden pro Spur ca. 1 µg PGK geladen. Die Trennung erfolgte für 10 Minuten bei 80 V und anschließend für eine Stunde bei 150 V. Die yPGK wurde durch Coomassiefärbung direkt im Gel und nach Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) –Membran (Westernblot) immunologisch mit Antikörpern, die das His–tag spezifisch erkennen, detektiert. Als Größenstandards im Coomassie-gefärbten Gel diente die Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und der BenchMark™ His-tagged Protein Standard (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Letzterer setzt sich aus einer Auswahl His-markierter Referenzproteine zusammen, die auch auf der PDVF-Membran mit Anti–His-Antikörpern nachgewiesen werden können.

Coomassie-Färbung:

Basische Aminosäuren und damit auch Proteine, die basische Aminosäuren enthalten, lassen sich direkt im Polyacrylamidgel (PAA-Gel) mit dem Farbstoff Coomassie anfärben. In dieser Arbeit wurde Blue Silver Coomassie Colloidal Blue Stain verwendet, eine optimierte Variante, der von Neuhoff entwickelten Rezeptur mit sehr hoher Sensitivität und geringem Hintergrund (Neuhoff et al., 1988, Candiano et al., 2004). Das Gel wird mindestens eine Stunde, besser über Nacht, im Coomassie Blue Silver Färbebad unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser entfärbt, bis die Hintergrundfärbung vollständig verschwunden ist.

3.2.4 Blue-Native-PAGE (BN-PAGE)

Die Blue-Native-PAGE (BN-PAGE) wurde für die Analyse von mitochondrialen Membranproteinen und Proteinkomplexen entwickelt und dient seither generell zur Trennung von Proteingemischen unter nativen Bedingungen (Schägger und von Jagow, 1991, Schägger et al., 1994, Schägger, 2003, Wittig et al., 2006). Dem Laufpuffer wird Coomassie Brillant Blue G250 zugesetzt, das an positiv geladene Aminosäuren der Proteine bindet, wobei negativ geladene Protein-Farbstoff-Komplexe gebildet werden. Der Farbstoff hat keine denaturierenden Eigenschaften, so dass die native Struktur der Proteine erhalten bleibt. Die Protein-Farbstoff-Komplexe wandern im elektrischen Feld

bei physiologischem pH unabhängig von ihrem pI zur Anode. Die negativ geladenen Komplexe stoßen sich während des Gellaufs gegenseitig ab, was eine hohe Trennschärfe zur Folge hat. Für die BN-Elektrophorese der yPGK-Varianten wurden Gradienten-PAA-Gele (Native PAGE™ 4-16 % BisTris, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet, die mit der XCell SureLock™ Mini-Cell Gelkammer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) kompatibel sind. Pro Geltasche wurden 3 µg Protein aufgetragen. Die Proben wurden 1:1 mit 2 x BN-Probenpuffer (1 M 6-Aminocaprinsäure, 100 mM BisTris-HCl, pH 7,0; 100 mM NaCl, 20 % Glycerin, 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G250) gemischt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Als Größenstandard diente der Native Marker Liquid Mix für BN / CN (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland). SERVA liefert ein detailliertes Elektrophorese- und Färbeprotokoll (inklusive der Rezepturen für Puffer und Lösungen) für BN-PAGE mit, das genau beachtet wurde. Die Gradientengele wurden nach Angaben des Herstellers gehandhabt. Die Elektrophorese-Bedingungen wurden an das Laufverhalten der yPGK angepasst. Die Trennung erfolgte für zehn Minuten bei 50 V und 120 Minuten bei 200 V. Die Resultate wurden anschließend mit einem Geldokumentationssystem festgehalten.

3.2.5 Westernblot

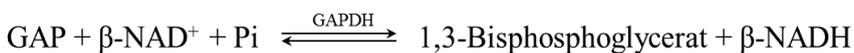
Der Westernblot ermöglicht es, Proteine aus einem PAA-Gel auf eine Membran zu übertragen und zu immobilisieren, um sie anschließend immunologisch zu detektieren. Um die yPGK zu identifizieren wurde das *semy-dry* Verfahren angewendet. In der Laborpraxis bedeutet das, dass das PAA-Gel und die Membran zwischen zwei Lagen puffergetränkter Filterpapiere gelegt werden. Das ganze Paket wird dann zwischen zwei Plattenelektroden platziert, an die eine Spannung angelegt wird. Im elektrischen Feld wandern die Proteine aus dem Gel zur Membran und werden dort, je nach Art der Membran, durch ionische und/oder hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. Zur Immobilisierung der yPGK und ihrer Varianten wurden PVDF-Membranen verwendet, welche Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen binden. Der Transfer erfolgte in einem kontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystem, dem Methanol zugesetzt wurde. Tris dient als Puffersubstanz, Glycin ist geladen und damit ein gutes Laufmittel,

Methanol aktiviert die Membran und fördert die Absorption der Proteine. Außerdem verhindert es das Quellen des Gels während des *blotting*-Prozesses. Die Transferbedingungen (0,8 mA / cm² Gelfläche für eine Stunde) wurden den Informationen des Herstellers der Blot-Apparatur (*semi-dry blotter* V20DB, Scie-Plas Ltd., Cambridge, UK) entnommen. Nach dem Proteintransfer und der Absättigung freier Bindestellen auf der PVDF-Membran mit dem polymerbasierten Roti[®]-Block wurde diese mit einem monoklonalen Anti-His-Antikörper-HRP-Konjugat für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Um die Protein-Antikörper-Komplexe mit einem Geldokumentationssystem sichtbar zu machen, wurde das Amersham[™] ECL[™] Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden wiederum den Angaben des Herstellers angepasst.

3.2.6 γ PGK-Aktivitätstest

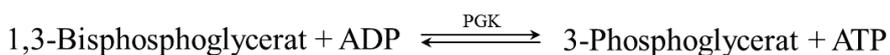
Um die katalytische Aktivität der Phosphoglyceratkinase zu bestimmen, wurde ein indirekter Test angewendet, der auf der physiologischen Rolle, die γ PGK im Glukosestoffwechsel (Glykolyse) spielt, basiert (Bücher, 1947). Dabei macht man sich zwei Reaktionen aus der Glykolyse zu Nutze:

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) katalysiert zunächst die Reaktion, bei der zwei Elektronen und ein Proton von Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) auf den Elektronenüberträger Nikotinsäureamidadenindinukleotid in seiner oxidierten Form (NAD⁺) übertragen werden, wobei reduziertes NADH und 1,3-Bisphosphoglycerat entstehen (Reaktion 2).



Reaktion 2

PGK katalysiert anschließend den Phosphattransfer zwischen 1,3-Bisphosphoglycerat und ADP, wobei Phosphoglycerat und ATP gebildet werden (Reaktion 3).



Reaktion 3

3.2 Biochemische Methoden

Tabelle 3.8 zeigt den Reaktionsansatz für den yPGK-Aktivitätstest. Die Grundreagenzien des Assays sind GAP und β -NAD, die Substrate der GAPDH, sowie Phosphationen und ADP in gepufferter Lösung (50 mM MOPS / 10 mM KH_2PO_4 , pH 7,5). GAPDH katalysiert Reaktion 2, wobei NADH und 1,3-Bisphosphoglycerat entsteht. PGK konsumiert 1,3-Bisphosphoglycerat und dephosphoryliert es zu 3-Phosphoglycerat. Dabei verschiebt sich das vorgelagerte Gleichgewicht in Reaktion 2 in Richtung der Produkte und ein Anstieg der NADH Produktion kann durch einen Anstieg der Absorption bei $\lambda = 340$ nm gemessen werden (Abbildung 3.2).

Tabelle 3.8 Reaktionsansatz für PGK-Aktivitätstest.

Reagenzien	Konzentration
MOPS / KH_2PO_4 , pH 7,5	50 / 10 mM
GAP	0,825 mM
β - NAD	0,340 mM
ADP	0,170 mM
MgSO_4	0,400 mM
Glycin	133,3 mM
GAPDH	2,5 μM
PGK	0,5 – 1 nM

Die Änderung der optischen Dichte bei $\lambda = 340$ wurde mit dem Absorptionsspektrometer bei 25° C aufgenommen. Für die Messungen wurden Quartzküvetten (10 x 4 mm) verwendet. Zunächst wurde eine Referenz gemessen, die alle Grundreagenzien, aber kein Enzym enthielt. Nach 60 s wurde der Probe GAPDH zugegeben, was zu einem Anstieg der Absorption bei $\lambda = 340$ führt. Nach 5 Minuten wurde die PGK zum Ansatz gegeben und der weitere Anstieg der optischen Dichte bei der entsprechenden Wellenlänge aufgenommen. Die Messung wurde insgesamt über einen Zeitraum von 30 Minuten verfolgt (Abbildung 3.2).

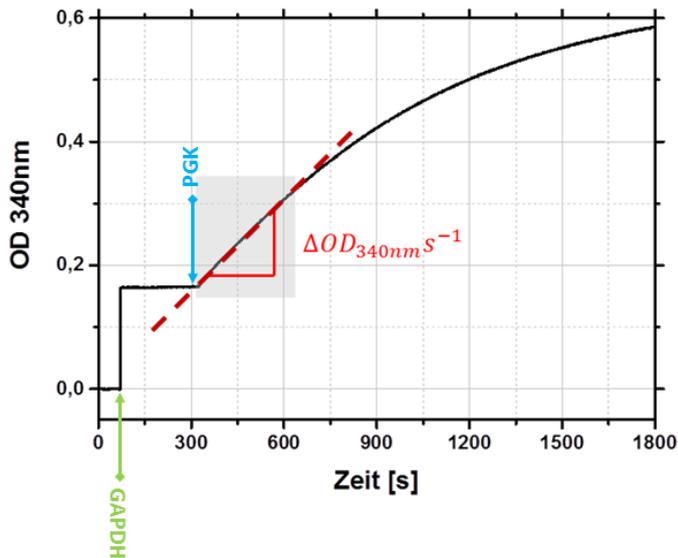


Abbildung 3.2: Aktivitätstest.

Um die katalytische Aktivität der yPGK zu bestimmen, wurde ein indirekter Test durchgeführt, der auf der Rolle des Enzyms in der Glykolyse basiert. Dabei wird NADH gebildet, dessen Absorption UV/Vis-spektroskopisch bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der PGK wurde der lineare Teil der Kinetik betrachtet, um den Anstieg der Absorption bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ über die Zeit zu bestimmen. Die Umsatzrate k_{cat} wird folgendermaßen berechnet:

$$k_{\text{cat}}[\text{s}^{-1}] = \frac{\Delta OD_{340\text{nm}}[\text{s}^{-1}]}{\epsilon_{\text{NADH}}[\text{M}^{-1}]c_{\text{PGK}}[\text{M}]} \quad (3.2)$$

mit der Änderung der Absorption von NADH mit der Zeit $\Delta OD_{340\text{nm}}$, dem molaren Extinktionskoeffizient von NADH ϵ_{NADH} und der Konzentration der yPGK c_{PGK} . Der molare Extinktionskoeffizient von NADH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ wurde mit $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}$ angenommen (Horecker und Kornberg, 1948)

3.3 Methoden der Spektroskopie

3.3.1 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Zirkulardichroismus (*circular dichroism*, CD) wird bei optisch aktiven (chiralen) Substanzen beobachtet und bezeichnet die unterschiedlich starke Absorption von links- und rechtshändig polarisiertem Licht. Linear polarisiertes Licht kann als Überlagerung einer linkshändig und einer rechtshändig polarisierten Welle mit identischer Amplitude verstanden werden. Wenn linear polarisiertes Licht auf ein Medium trifft, das Zirkulardichroismus aufweist, verändern sich die Amplituden unterschiedlich und es resultiert eine elliptische Polarisation des austretenden Lichts. Die Absorption ΔA ergibt sich aus der Differenz der Absorption der linkshändig polarisierten (A_L) und rechtshändig polarisierten (A_R) Komponenten des Lichts (Greenfield, 2007).

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (3.3)$$

Die CD-Spektroskopie gibt Aufschluss über die Sekundärstruktur von Proteinen. So kann überprüft werden, ob ein *tag* oder Mutationen rekombinanter Proteine deren Sekundärstruktur und Stabilität gegenüber Hitze und denaturierenden Reagenzien beeinträchtigen. Thermische und chemische Faltungs- und Entfaltungsstudien sind ebenfalls möglich (Greenfield, 2007). Verschiedene Proteinstrukturelemente wie α -Helices, β -Faltblätter und *random coils*, weisen charakteristische Anordnungen der Peptidbindungen auf, die in der CD-Spektroskopie im Wesentlichen als Chromophore dienen. Deshalb haben sie sehr charakteristische CD-Spektren besonders im fernen UV-Bereich (Greenfield, 2007). Spektren von Proteinen mit hohem Anteil α -Helices, zum Beispiel yPGK, zeigen negative Peaks bei 222 nm und 208 nm (Abbildung 3.3). Das CD-Signal wird üblicherweise mit der molaren Elliptizität θ [$\text{deg}\cdot\text{cm}^2\text{ dmol}^{-1}$] angegeben (Greenfield, 2007). Um verschiedene Proteinvarianten strukturell zu vergleichen, werden die Spektren im Hinblick auf die Anzahl Aminosäuren (n_{Residuen}) normiert:

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta}{n_{\text{Residuen}}} \quad (3.4)$$

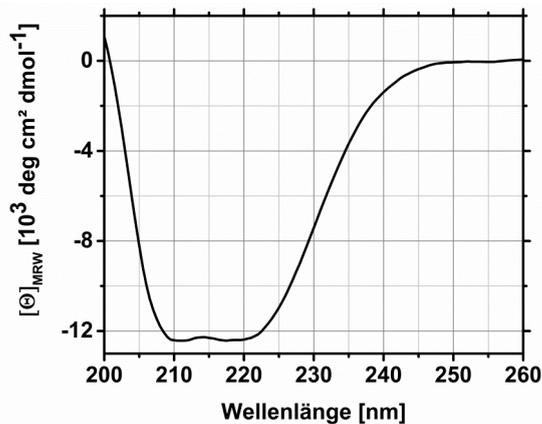


Abbildung 3.3: CD-Spektrum der wildtypischen yPGK.

Die PGK aus *Saccharomyces cerevisiae* hat einen hohen Anteil α -Helices in ihrer Sekundärstruktur. Das CD-Spektrum im Wellenlängenbereich zwischen 260 nm und 200 nm zeigt die zwei hierfür typischen negativen Peaks (bei 222 nm und 208 nm).

In dieser Arbeit wurde die Integrität der Sekundärstruktur der yPGK-Cysteinvarianten mittels CD-Spektroskopie überprüft. Alle Messungen wurden mit dem CD-Spektrometer J-1100 durchgeführt. Die Proteine wurden in CD-Puffer (10 mM MOPS, pH 7,5) aufgenommen, sodass die Probenkonzentration im Bereich zwischen 3 μ M und 5 μ M liegt. In Quarzküvetten ($d = 1$ mm) wurden CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 260 nm bis 200 nm aufgenommen. Die Messgeschwindigkeit betrug 50 nm/min bei einer Integrationszeit von 1 s und einer Temperatur von $T = 22$ °C. Zusätzlich wurden Pufferspektren mit den gleichen Parametern aufgenommen und von den Proteinspektren abgezogen.

In Entfaltungsexperimenten wurde außerdem die Stabilität der Cysteinmutanten der yPGK gegenüber dem Denaturierungsmittel GndHCl im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dazu wurden die Proben 1 h bis 24 h in 10 mM MOPS, pH 7,5, dem verschiedene Konzentrationen (0,1 M bis 4 M) GndHCl zugesetzt wurden, equilibriert. Zur Bestimmung der GndHCl-Konzentration wurde der Brechungsindex n des Puffers vor und nach der Zugabe der entsprechenden Menge des Denaturierungsmittels mit dem Refraktometer gemessen. Die GndHCl-Konzentration c_{GndHCl} wurde aus der Änderung des Brechungsindex Δn wie folgt berechnet (Nozaki, 1972):

3.3 Methoden der Spektroskopie

$$c_{\text{GndHCl}} = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot \Delta n^2 - 91,6 \cdot \Delta n^3 \quad (3.5)$$

Die Messung der CD-Spektren der yPGK unter denaturierenden Bedingungen erfolgte wie oben beschrieben.

Die CD-Signale $[\theta]_{\text{MRW}}$ bei $\lambda = 222 \text{ nm}$ wurden als Funktion der GndHCl-Konzentration aufgetragen. Die resultierenden Entfaltungskurven wurden mit dem Zwei-Zustands-Modell gefittet, das den gefalteten und entfalteten Zustand, aber keine intermediären Zustände berücksichtigt (Robertson und Murphy, 1997).

$$f(c_{\text{GndHCl}}) = (a + b \cdot c_{\text{GndHCl}}) \cdot \left[\frac{1}{(1 + K_{\text{eq}})} \right] + (c + d \cdot c_{\text{GndHCl}}) \cdot \left[\frac{K_{\text{eq}}}{(1 + K_{\text{eq}})} \right] \quad (3.6)$$

mit den *baseline*-Parametern der gefalteten Spezies a (*offset*) und b (Steigung) sowie der entfalteten Spezies c (*offset*), d (Steigung), der GndHCl-Konzentration c_{GndHCl} und der Gleichgewichtskonstanten K_{eq}

$$K_{\text{eq}} = e^{\left(\frac{-\Delta G}{R \cdot T}\right)} \quad (3.7)$$

und der Gibbs-Energie ΔG

$$\Delta G = m \cdot (c_{1/2, \text{GndHCl}} - c_{\text{GndHCl}}). \quad (3.8)$$

In die Gleichung gehen die Gaskonstanten $R = 8,3144598 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$, die Temperatur T in Kelvin, die Steigung der Kurve m und die GndHCl-Halbkonzentration $c_{1/2, \text{GndHCl}}$ ein.

Mittels Fit wurden die GndHCl-Halbkonzentrationen $c_{1/2, \text{GndHCl}}$ für die yPGK-Varianten und den Wildtyp bestimmt. Bei der GndHCl-Halbkonzentration liegt die Hälfte der Proteine in der Probe entfaltet vor. Sie wird als Maß für die Stabilität des Proteins gegenüber dem Denaturierungsmittel angegeben.

3.3.2 Dynamische Lichtstreuung (*dynamic light scattering, DLS*)

Mit DLS können die hydrodynamischen Radien von Makromolekülen, z.B. Proteinen, basierend auf dem Phänomen der Lichtstreuung bestimmt werden. Damit lassen sich Aussagen über die Homogenität der Proben und Aggregationseffekte treffen.

Trifft kohärentes, monochromatisches Licht, z.B. Laserlicht, auf Partikel in Lösung, wird es gestreut. Bei elastischer Streuung an Teilchen, deren Durchmesser klein ist im Vergleich zur Wellenlänge des Lichts, spricht man von Rayleigh-Streuung. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung bewegen sich die Moleküle in Lösung in Abhängigkeit ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Dies verändert die Interferenz des Streulichts verschiedener Streuzentren (benachbarte Moleküle) konstruktiv oder destruktiv. Die daraus resultierenden Fluktuationen der Streulichtintensität werden mit hoher zeitlicher Auflösung detektiert und miteinander korreliert (Johnson und Gabriel, 1994). Die normierte Autokorrelationsfunktion der Intensitäts-fluktuationen des Streulichts ist definiert als:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (3.9)$$

mit der Streulichtintensität $I(t)$ zum Zeitpunkt t und einem späteren Zeitpunkt $(t + \tau)$.

Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wurden die Autokorrelationsfunktionen mit einem Modell gefittet, das die reine Translationsbewegung starrer Kugeln betrachtet. Dazu wurde die Software DYNAMICS (Version 6.314; Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA) verwendet.

Für polydisperse Systeme gilt dabei:

$$G(\tau) = \sum_{i=0}^n \gamma_i e^{(-\Gamma_i \tau)} \quad (3.10)$$

mit den Streuintensitätsbeiträgen der Spezies in der Probe γ_i , der Korrelationszeit τ und den exponentiellen Abfallraten Γ_i .

3.3 Methoden der Spektroskopie

In die Abfallrate Γ der Autokorrelationsfunktion geht der Wellenvektor des Streulichts q und der Diffusionskoeffizient D ein.

$$\Gamma = q^2 \cdot D \quad (3.11)$$

Aus den Diffusionskoeffizienten werden die hydrodynamischen Radien mit der Stokes-Einstein-Beziehung berechnet und in Histogrammen dargestellt.

$$R_h = \frac{k_B \cdot T}{6\eta\pi D} \quad (3.12)$$

mit der Boltzmann-Konstante mit der Boltzmann-Konstante $k_B = 1,38064852 \cdot 10^{-23}$ J/K, der Temperatur T in Kelvin und der Viskosität des Lösungsmittels η .

Für die DLS-Messungen wurden die yPGK-Varianten auf eine Endkonzentration von $c_{PGK} = 20 \mu\text{M}$ in 10mM MOPS, pH 7,5 verdünnt. Die Proben wurden unmittelbar vor der DLS-Messung gefiltert und luftblasenfrei in eine mit Piranha-Lösung (konz. H_2SO_4 : H_2O_2 , 1:3 (v/v)) gesäuberte Küvette überführt.

3.3.3 Fluoreszenzspektroskopie

Methoden der Fluoreszenzspektroskopie nutzen die fotophysikalischen Eigenschaften von Fluorophoren, um u.a. biologische Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene aufzuklären. Fluorophore sind Moleküle (meist ausgedehnte aromatische Verbindungen mit delokalisierten π -Elektronensystemen), die nach elektronischer Anregung (Absorption eines Photons) Licht emittieren (Fluoreszenz). Es existieren verschiedene natürlich vorkommende (intrinsische) Fluorophore, z.B. die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, das Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid (NADH), oder der Pflanzenfarbstoff Chlorophyll. Außerdem wurden eine Reihe synthetischer (extrinsischer) Fluorophore mit spezifischen fotophysikalischen Eigenschaften und verschiedenen funktionellen Gruppen entwickelt, um biologische Proben (z.B. Proteine, Nukleinsäuren, Membranen oder Organellen) damit zu markieren.

Lumineszenz (kaltes Leuchten) ist die Emission von Licht. Sie umfasst zwei Prozesse: Fluoreszenz und Phosphoreszenz (Lakowicz, 2006). Die molekularen Prozesse, die der Lichtemission zugrunde liegen, können in einem Jablonski-Diagramm dargestellt werden (Abbildung 3.4).

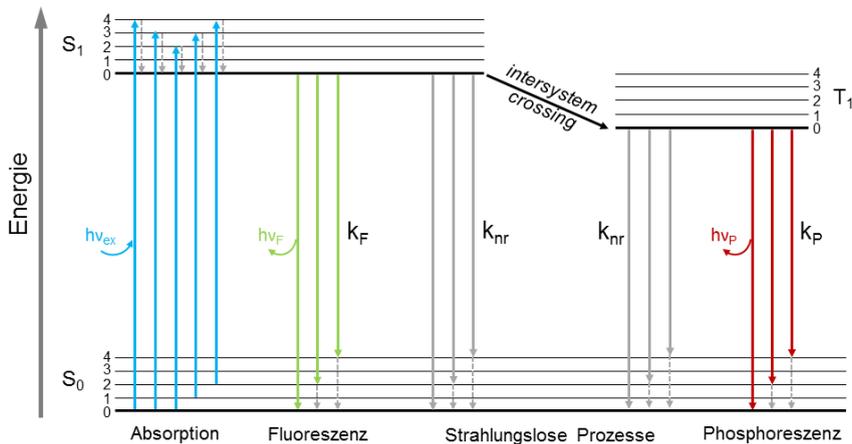


Abbildung 3.4: Jablonski-Diagramm.

Elektronische Übergänge (zwischen S_0 und S_1) bei Absorption von Licht durch einen Fluorophor (blaue Pfeile) und dessen Deaktivierung durch Lumineszenz (Fluoreszenz, grüne Pfeile; Phosphoreszenz, rote Pfeile) oder strahlungslose Prozesse (graue Pfeile).

Ist ein Fluorophor Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgesetzt, wird er durch Absorption eines Photons in einen elektronisch angeregten Zustand (S_1) meist höheren Vibrationsniveaus (0, 1, 2, 3, ...) versetzt (blaue Pfeile in Abbildung 3.4). Von dort fällt das Elektron sehr schnell zurück auf das niedrigste Vibrationsniveau des ersten angeregten Zustands (typischerweise innerhalb von 10^{-12} s, *internal conversion*, gestrichelte Pfeile). Durch Emission eines Photons (Fluoreszenz) erfolgt die Rückkehr in die Schwingungsniveaus des Grundzustands S_0 (grüne Pfeile). Durch *internal conversion* wird auch hier schnell das Schwingungsgrundniveau erreicht (gestrichelte Pfeile). Die Energie der Emission ist typischerweise geringer als die des Anregungslichts, d.h. ein Fluorophor emittiert gewöhnlich Licht größerer Wellenlänge als er absorbiert (*Stokes Shift*, vergleiche die Längen der blauen und grünen Pfeile). Die Gründe für die Rot-Verschiebung der Emission sind Energieverluste z.B. durch *internal conversion* Prozesse oder durch Interaktionen mit dem Lösungsmittel

3.3 Methoden der Spektroskopie

(*solvent relaxation*). Weil die Energieabgabe zum Erreichen des Schwingungsgrundniveaus in S_1 sehr schnell abläuft, ist das Emissionsspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge (Kasha's rule). Außerdem ist die Form des Emissionsspektrums durch die Ähnlichkeit der Schwingungsniveaus von S_0 und S_1 meist spiegelbildlich zum Absorptionsspektrum. Alternativ zur Fluoreszenz kann die Deaktivierung auch strahlungslos erfolgen (graue Pfeile).

Die mittlere Dauer des angeregten Zustands ist seine Lebenszeit τ . Die Lebenszeiten sind kurz (typischerweise wenige ns), denn das Molekül ist bestrebt, in den Grundzustand S_0 zurückzukehren (Lakowicz, 2006).

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{nr}} \quad (3.13)$$

mit der Fluoreszenzemissionsrate k_F und der Rate strahlungsloser Prozesse k_{nr} . Die intrinsische oder natürliche Lebenszeit τ_n ist die Lebenszeit eines Fluorophors in Abwesenheit strahlungsloser Prozesse.

$$\tau_n = \frac{1}{k_F} \quad (3.14)$$

Die Wahrscheinlichkeit, mit der die Anregung eines Fluorophors zur Emission eines Photons führt, wird mit der Quantenausbeute Φ ausgedrückt.

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} = \frac{n_{em. \text{ Photonen}}}{n_{abs. \text{ Photonen}}} \quad (3.15)$$

Fluorophore absorbieren vorzugsweise Licht, das parallel zu ihrem Absorptions-Dipolmoment polarisiert ist, der wiederum eine definierte Orientierung zur Molekülachse hat (Fotoselektivität bzw. selektive Anregung). Auch die Emission ist entlang einer festen Achse des Fluorophors polarisiert, die aber nicht zwangsläufig dieselbe Orientierung haben muss.

Die Fluoreszenz-Anisotropie r ist definiert als

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (3.16)$$

mit den Fluoreszenzintensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} der parallel und senkrecht polarisierten Emission, wenn die Probe mit parallel polarisiertem Licht angeregt wird. Durch die Rotation der Fluorophore im angeregten Zustand verändern sich die Polarisierung der Emission und damit die Anisotropie (Lakowicz, 2006). Dies lässt Rückschlüsse auf die Beweglichkeit, bzw. Rotationsfreiheit der Farbstoffe zu. Der Zusammenhang zwischen Rotation und Anisotropie wird mit der Perrin-Gleichung beschrieben.

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\theta}} \quad (3.17)$$

Mit der Anisotropie ohne Berücksichtigung der Rotationsbewegung r_0 , der Lebenszeit τ und der Anisotropiekorrelationszeit θ .

Prozesse, die zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität führen, werden allgemein als Löschung (*quenching*) bezeichnet (Lakowicz, 2006). Die Anregung eines Fluorophors ist ein sehr schneller Prozess (10^{-15} s). Fluoreszenzemission hingegen ist sehr viel langsamer (10^{-9} s). Während sich der Farbstoff im angeregten Zustand befindet, kann er mit anderen Molekülen in der Lösung kollidieren. Ein Beispiel dafür ist die Interaktion mit Sauerstoff. Diese Kollisionen können dazu führen, dass der Fluorophor deaktiviert wird ohne ein Photon zu emittieren (*collisional quenching*). Es gibt aber auch *quenching*-Prozesse, die im elektronischen Grundzustand (unabhängig von Diffusion/Kollision) stattfinden, z.B. Komplexbildung mit Molekülen im Lösungsmittel oder konkurrierende absorbierende Spezies in der Probe (*static quenching*).

Moleküle im angeregten Zustand können aber auch eine Spinumkehr des angeregten Valenzelektrons erfahren (*intersystem crossing*) und so einen angeregten Triplet-Zustand T_1 erreichen (Lakowicz, 2006). Die Emission eines Photons, um aus dem angeregten Triplet-Zustand zum elektronischen Grundzustand zu gelangen, nennt man Phosphoreszenz (rote Pfeile in Abbildung 3.4). Da Spinumkehrprozesse

quantenmechanisch verboten und daher unwahrscheinlich sind, ist die Phosphoreszenz mit sehr langen Lebenszeiten (im Bereich zwischen Sekunden und Stunden) verbunden. Außerdem konkurriert sie, wie die Fluoreszenz auch, mit strahlungslosen Prozessen.

Ein weiterer Prozess, der im angeregten Zustand der Fluorophore auftreten kann, ist FÖRSTER-Resonanz-Energietransfer (Förster, 1948). FRET ist ein strahlungsloser Energietransfer zwischen zwei Farbstoffen: einem Donor im elektronisch angeregten Zustand und einem Akzeptor im Grundzustand. D.h., bei Anregung des Donors wird die Akzeptorfluoreszenz detektiert, obwohl der Akzeptor selbst bei dieser Anregungswellenlänge nicht zur Emission angeregt werden kann. Hierzu ist eine spektrale Überlappung des Donor-Emissionsspektrums mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum nötig. Bei hinreichend kurzen Abständen zwischen den Fluorophoren kann über eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung Energie mit gleicher oder ähnlicher Resonanzfrequenz ausgetauscht werden (Medintz und Hildebrandt, 2014).

Die Rate $k_T(r)$, mit der dieser Energietransfer abläuft, hängt von der Lebenszeit τ_D des Donor-Farbstoffs, der Distanz $R_{D/A}$ zwischen Donor und Akzeptor und dem FÖRSTER-Radius R_0 des FRET-Paars ab.

$$k_T(R_{D/A}) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R_{D/A}} \right)^6 \quad (3.18)$$

Der FÖRSTER-Radius ist eine für ein spezifisches Farbstoffpaar charakteristische Größe. R_0 wird aus den experimentell bestimmten spektralen Eigenschaften der Farbstoffe berechnet, außerdem geht ihre relative Orientierung ein.

$$R_0[\text{\AA}] = 0,211(\kappa^2 n^{-4} \Phi_D J(\lambda))^{1/6} \quad (3.19)$$

mit dem Orientierungsfaktor κ^2 , dem Brechungsindex des Mediums n , der Quantenausbeute des Donors Φ_D und dem Integral $J(\lambda)$ der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors.

Der Orientierungsfaktor κ^2 hängt von der relativen Orientierung der Donor- und Akzeptor-Dipole zueinander ab. Theoretisch kann κ^2 Werte zwischen 0 und 4

annehmen. Für maximale Effizienz ($\kappa^2 = 4$) muss das Dipolmoment des angeregten Donors parallel zum Absorptionsdipolmoment des Akzeptors ausgerichtet sein. Für $\kappa^2 = 0$ liegt entsprechend Orthogonalität der Dipolmomente vor. In der Praxis sind diese extremen Situationen sehr unwahrscheinlich. Deshalb wird, unter der Annahme, dass die Farbstoffe frei rotieren, $\kappa^2 = 2/3$ angenommen (dos Remedios und Moens, 1995).

Der Energietransfer ist nur dann effizient, wenn er im Vergleich zur Fluoreszenzlebenszeit τ_D des Donors schnell abläuft, da eine Energieübertragung nur während des Anregungszustandes des Donors stattfinden kann. Die FRET-Effizienz E ist definiert als:

$$E = \frac{k_T(R_{D/A})}{\tau_D^{-1} + k_T(R_{D/A})} \quad (3.20)$$

Unter Berücksichtigung von Formel 3.18 ergibt sich:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R_{D/A}^6} \quad (3.21)$$

Aus Formel 3.21 ist ersichtlich, dass die Transfereffizienz stark vom Abstand der Farbstoffe abhängt. Sie ist proportional zu $R_{D/A}^{-6}$.

Bei $R_{D/A} = R_0$ beträgt die FRET-Effizienz E 50% (Abbildung 3.5). R_0 erlaubt, den messbaren Abstandsbereich für ein spezifisches FRET-Paar abzuschätzen. Wenn die Distanz zwischen Donor und Akzeptor 50% des FÖRSTER-Radius erreicht, ist die FRET-Effizienz nahezu maximal und kürzere Distanzen können kaum bestimmt werden. Wenn aber der Abstand zwischen Donor und Akzeptor R_0 um 50% übersteigt, geht die Transfereffizienz gegen Null und längere Distanzen können nicht mehr ermittelt werden (dos Remedios und Moens, 1995). Demnach eignet sich FRET im Bereich von 0,5 bis 1,5 R_0 als „molekularer Zollstock“ zu äußerst empfindlichen Abstandsmessungen. Dies gilt z.B. für Multi-Domänen-Proteine: typische Abstände zwischen den Untereinheiten komplexer Proteine liegen im Bereich von 20 bis 100 Å. Daher wird in diesen Fällen meist ein FRET-Paar mit Werten von R_0 zwischen 30 und 60 Å ausgewählt.

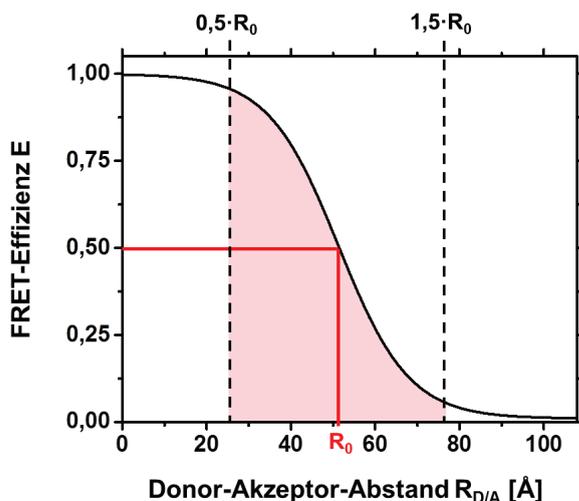


Abbildung 3.5: FÖRSTER-Radius und FRET-Messbereich.

Bei R_0 , dem FÖRSTER-Radius, beträgt die FRET-Effizienz E 50 %. FRET ist im Bereich von $0,5 \cdot R_0$ und $1,5 \cdot R_0$ (rot unterlegter Bereich) äußerst sensitiv gegenüber Abstandsänderungen, denn E ist proportional zu $R_{D/A}^{-6}$.

Die FRET-Effizienz E wird aus experimentell bestimmaren Parametern berechnet. Dies ist zunächst über die Fluoreszenzintensität möglich:

$$E = \frac{F_A}{F_A + \gamma \cdot F_D} \quad (3.22)$$

mit der Fluoreszenzintensität des Donors F_D und Akzeptors F_A . In den Korrekturfaktor γ geht das Verhältnis der Quantenausbeuten des an das Protein gebundenen Akzeptors und Donors (Φ_A/Φ_D) und das Verhältnis der Detektionseffizienzen (g_A/g_D) ein.

$$\gamma = \frac{\Phi_A}{\Phi_D} \cdot \frac{g_A}{g_D} \quad (3.23)$$

Außerdem kann die FRET-Effizienz E aus den Donor-Lebenszeiten in Anwesenheit τ_{DA} und Abwesenheit τ_D des Akzeptors berechnet werden.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (3.24)$$

Aus der Transfereffizienz werden dann Abstände bzw. Abstandsänderungen zwischen Donor und Akzeptor berechnet (Formel 3.21). Daraus können Informationen über die Struktur bzw. Strukturänderungen unter bestimmten Bedingungen abgeleitet werden (Abbildung 3.6).

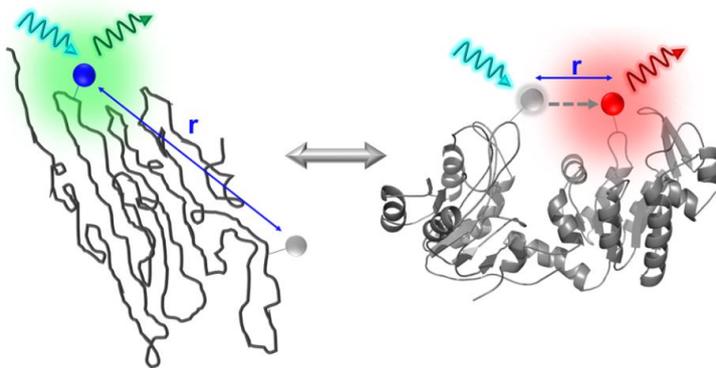


Abbildung 3.6: FRET als „molekularer Zollstock“.

Ein Molekül (in diesem Fall yPGK) wurde an spezifischen Positionen mit dem FRET-Paar Alexa Fluor 488 (Donor) und Alexa Fluor 647 (Akzeptor) markiert. Der Donor wird mit einem Laser (blau) angeregt und kann entweder selbst Licht emittieren (links, am entfaltenen Protein) oder Energie auf den Akzeptor übertragen (rechts, am gefalteten Protein), der dann seinerseits rotes Licht emittiert (FRET). Ob FRET stattfindet hängt stark vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor ab. FRET eignet sich deshalb als „molekularer Zollstock“ zu empfindlichen Abstandsmessungen, aus denen Informationen zur Struktur und Strukturänderungen (z.B. während der Proteinfaltung) extrahiert werden können.

Kovalente Bindung fluoreszierender Farbstoffe an yPGK für Einzelmolekül-FRET-Studien

Mit FRET werden Abstände zwischen zwei Fluorophoren gemessen. Deshalb ist es essentiell, fluoreszierende Farbstoffe, d.h. ein geeignetes FRET-Paar, kovalent an das zu untersuchende Protein, yPGK, zu binden. Dies ist beispielsweise über die kovalente Kopplung maleimid-funktionalisierter Fluorophore an die reaktive Thiolgruppe von Cysteinen möglich. In der Sequenz der yPGK wurde daher an spezifischen Positionen die natürliche Aminosäure gegen ein Cystein ausgetauscht (primerabhängige Mutagenese, Kapitel 3.1.2). Das natürliche Cystein an Position 97 wurde hingegen durch Serin ersetzt.

In dieser Arbeit wurden der grüne Farbstoff Alexa Fluor 488 C₅ Maleimid und der rote Licht emittierende Farbstoff Alexa Fluor 647 C₂ Maleimid verwendet, um Cysteinvarianten der yPGK zu markieren. Die Strukturformeln und die spektralen Eigenschaften der Farbstoffe sind in Abbildung 3.7 und Tabelle 3.9 dargestellt.

Kleine Aliquots der Farbstoffe werden lyophilisiert und bei -80 °C gelagert. Das Portionieren maleimid-gekoppelter Farbstoffe muss (zum Schutz der reaktiven Gruppe) unter Ausschluss von Sauerstoff z.B. unter Stickstoffatmosphäre in einer *glovebox* durchgeführt werden. Sie werden kurz vor dem Ansetzen der Färbereaktion in wasserfreiem DMSO gelöst.

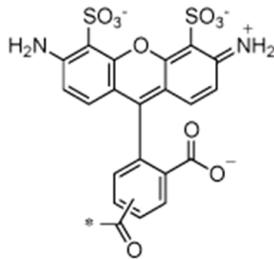
Tabelle 3.9: Spektrale Eigenschaften und Molekulargewicht der Maleimid-Derivate der Farbstoffe Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 647.

	Alexa Fluor 488 C ₅ Maleimid*	Alexa Fluor 647 C ₂ Maleimid [#]
$\lambda_{\text{Abs, max}}$	493 nm	651 nm
$\lambda_{\text{Em, max}}$	516 nm	671 nm
ϵ	72 000 cm ⁻¹ M ⁻¹	265 000 cm ⁻¹ M ⁻¹
Molekulargewicht	720,66 g/mol	1250 g/mol

* <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A10254>; 02.09.2016

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A20347>; 02.09.2016

Alexa Fluor 488



Alexa Fluor 647

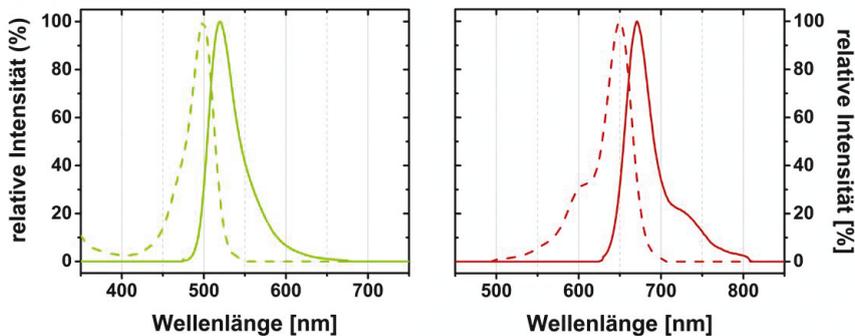
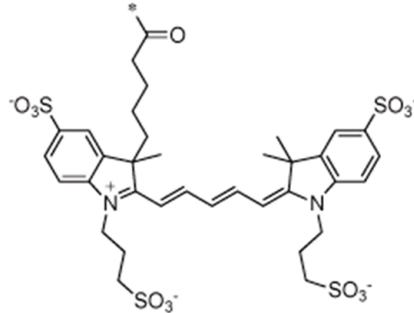


Abbildung 3.7: Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der yPGK.

Oben: Strukturen und Ladungsverteilungen der fluoreszierenden Farbstoffe Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 647. Maleimid-funktionalisierte Fluorophore wurden verwendet, um Cysteinvarianten der yPGK zu markieren. (<http://www.atdbio.com/content/34/Alexa-dyes>; 06.09.2016)

Unten: Absorptionsspektren (gestrichelte Linien) und Emissionsspektren (kompakte Linien) von Alexa Fluor 488* und Alexa Fluor 647# (unten).

* (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A10254>; 06.09.2016)

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A20347>; 06.09.2016)

Zur Markierung der yPGK-Cysteinvarianten wurden die Farbstoffe in fünffachem Überschuss zum Protein gegeben. Beim Mischen des Färbeansatzes muss ebenfalls weitgehend auf Ausschluss von Sauerstoff geachtet werden, bevor er über Nacht bei 4 °C inkubiert. Tabelle 3.10 zeigt den Standardansatz zur Fluoreszenzmarkierung der Hefe-PGK-Varianten.

Tabelle 3.10 Typischer Ansatz zur Fluoreszenzmarkierung der yPGK-Cysteinmutanten.

Reagenz	Stock Konzentration	Volumen	Endkonzentration
Labelling-Puffer	1x	ad 1 ml	
TCEP	10 mM	40 μ l	400 μ M
PGKwt/Mutante	80-120 mM	170-250 μ l	20 μ M
Farbstoffmix*	3,85 mM	25 μ l	100 μ M

* Alexa Fluor 647 Maleimid und Alexa Fluor 488 Maleimid im Mischungsverhältnis 1:1

Der *Labelling*-Puffer (50 mM MOPS, pH 7,5; 500 mM NaCl) wird zum Entgasen mit Stickstoff geflutet. Anschließend werden TCEP und die yPGK langsam in den Puffer pipettiert. Der Ansatz wird nochmals vorsichtig mit N₂ versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Tris (2-carboxyethyl-) phosphin (*TCEP*) reduziert in dieser Zeit die Thiolgruppen der Cysteine des Proteins. Donor- und Akzeptorfarbstoff werden in wasserfreiem DMSO gelöst und im gleichen molaren Verhältnis gemischt. Der Farbstoffmix wird anschließend in fünffachem Überschuss zum Protein zum Reaktionsansatz gegeben. Dieser wurde zum Mischen und Entgasen noch einmal mit Stickstoff geflutet.

Isolierung doppelt fluoreszenzmarkierter yPGK

Da für beide Farbstoffe die gleiche Kopplungsreaktion an zwei spezifischen Positionen verwendet wurde, sind in der Probe verschiedene Spezies zu erwarten:

- I. unmarkiertes Protein
- II. mit einem Donor markiertes Protein
- III. mit einem Akzeptor markiertes Protein
- IV. doppelt mit Donor markiertes Protein
- V. doppelt mit Akzeptor markiertes Protein
- VI. Proteine mit einem Donor und einem Akzeptor
- VII. Oligomere bzw. Aggregate
- VIII. freier Donor- und Akzeptor-Farbstoff

Für FRET-Experimente muss Spezies VI möglichst gut isoliert werden. Im ersten Schritt der Reinigung werden Proteine mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) von freien Farbstoffen getrennt. Das Säulenmaterial, 8-10 g Sephadex G25, wurde eine Stunde bei 90 °C in *Labelling*-Puffer gequollen. Ein Säulenkörper mit einem Innendurchmesser von 1 cm und 50 cm Länge wurde mit 35 ml Sephadex G25 gepackt.

Nachdem die Probe auf die SEC-Säule geladen wurde und vollständig in die SEC-Matrix eingetreten ist, wurde das Säulenmaterial mit Puffer überschichtet. Während die Probe das Säulenmaterial passiert, wurden 20 Fraktionen mit einem Volumen von $V = 1$ ml aufgefangen. Die Protein- und Farbstoffkonzentrationen jeder Fraktion wurden mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt und daraus die durchschnittliche Anzahl der Farbstoffe, die an ein Protein gebunden sind (*degree of labelling*, DOL) berechnet:

$$\text{DOL} = \frac{c_{\text{AlexaFluor}}}{c_{\text{yPGK}}} \quad (3.25)$$

mit der Farbstoffkonzentration $c_{\text{AlexaFluor}}$ und der Proteinkonzentration c_{yPGK} . Zwei Fraktionen, die farbstoffgekoppeltes Protein enthalten, wurden gepoolt.

In einem zweiten Reinigungsschritt durch Anionenaustauschchromatographie (*ion exchange chromatography* IEX) wurde das zweifach markierte Protein isoliert. Dabei nutzt man den Ladungsunterschied (eine negative Ladung) zwischen den beiden Farbstoffen Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 647 (Abbildung 3.7, oben). Proteine, die negativ geladene Farbstoffe tragen, binden durch elektrostatische Wechselwirkung an das Säulenmaterial und werden mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Dabei werden sie nach ihrer Ladungszahl getrennt. Zur Reinigung der gelabelten yPGK durch IEX wurde ein automatisiertes FPLC-System (ÄKTA explorer 10, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) und eine MonoQ 5/50 GL Chromatographie-Säule (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) verwendet. Das FPLC-System wird mit der Software UNICORN 5.31 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) kontrolliert. Der lineare Gradient wird aus zwei Puffern gemischt: ÄKTA-Puffer I (10 mM MOPS, pH 7,5) und 0-50% ÄKTA-Puffer II (10 mM MOPS, pH 7,5; 1M NaCl). Die Länge des Gradienten beträgt 40 Säulenvolumen und die Flussrate, mit der die Probe und die

3.3 Methoden der Spektroskopie

Puffer über die Säule gepumpt werden beträgt 1 ml/min. Während die Probe das System durchläuft, wird die Absorption bei $\lambda = 280\text{nm}$ (Absorptionsmaximum der Tryptophane des Proteins), $\lambda = 650\text{nm}$ (Absorptionsmaximum von Alexa Fluor 647 C₂ Maleimid) und $\lambda = 495\text{nm}$ (Absorptionsmaximum von Alexa Fluor 488 C₅ Maleimid) aufgenommen. Die Elutionsfraktionen, die zweifach (mit Donor und Akzeptor) markierte yPGK enthalten, werden mit *Labelling*-Puffer verdünnt und sind so mehrere Tage bei 4 °C lagerbar. Aus den Absorptionsspektren der Proben wurden wiederum die Protein- und Farbstoffkonzentrationen und der DOL bestimmt.

Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops

Ein Schema eines inversen konfokalen Mikroskops ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

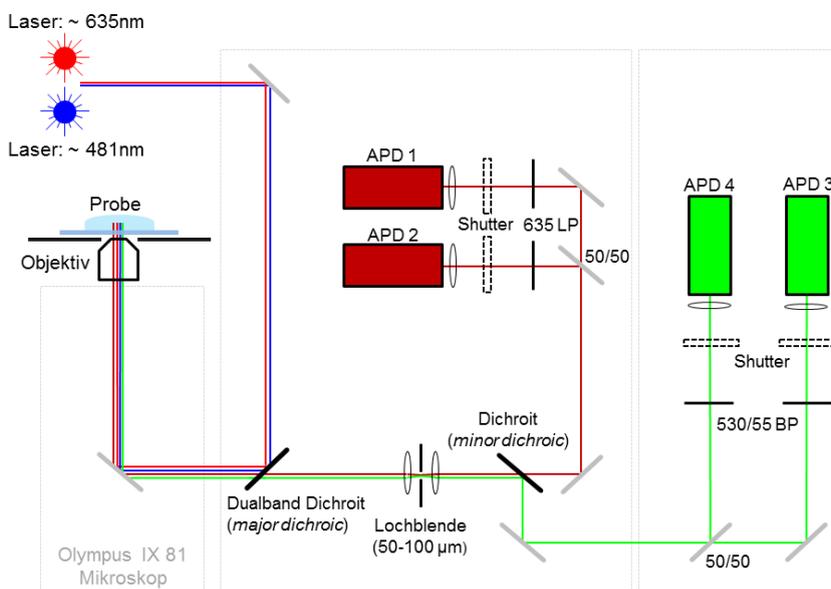


Abbildung 3.8: Schema eines inversen konfokalen Fluoreszenz-Mikroskops.

Gepulstes Laserlicht wird in eine Probe diffundierender fluoreszierender Moleküle fokussiert und mit Avalanche Photodioden und hoher Zeitauflösung detektiert.

Licht von gepulsten Lasern (Laserdioden, 481 nm/635 nm) wird von einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur in eine Probe frei diffundierender fluoreszierender

Moleküle fokussiert. Dadurch entsteht ein beugungslimitiertes, kleines effektives Volumen (typischerweise ~ 1 fl). Das Anregungslicht und das von den fluoreszierenden Farbstoffen emittierte Licht passieren dasselbe Objektiv. Ein dichroitischer Spiegel (*major dichroic*) trennt das Anregungs- vom Emissionslicht, das anschließend die konfokale Lochblende (*confocal pinhole*) passiert. Ein zweiter Dichroit (*minor dichroic*) trennt die Emission nach der Wellenlänge. Geeignete Bandpassfilter vor den Detektoren stellen sicher, dass nur von den Fluorophoren emittiertes Licht gemessen wird. Die Detektion einzelner Photonen erfolgt mit hochsensitiven Avalanche Photodioden (APD) mit hoher Zeitauflösung.

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy, FCS*)

Mit dem beschriebenen konfokalen Fluoreszenzmikroskop werden Intensitätsfluktuationen gemessen, die durch Diffusion fluoreszierender Moleküle verursacht werden (Abbildung 3.9).

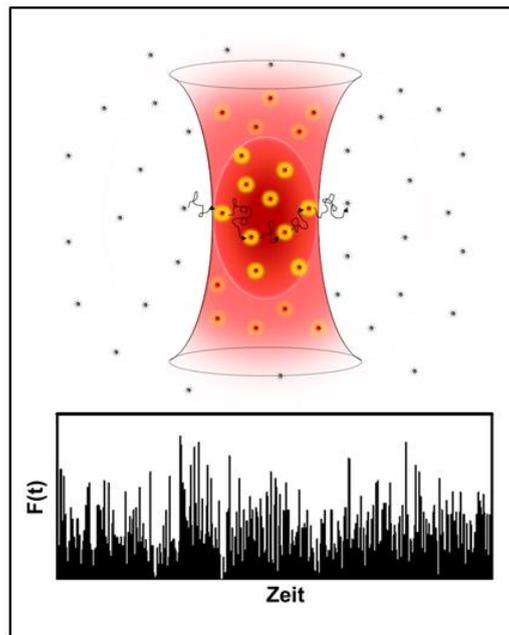


Abbildung 3.9: Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS).

Fluoreszierende Moleküle diffundieren durch das konfokale Observationsvolumen V_{eff} , das näherungsweise einem 3D-Gauß-Profil entspricht (oben). Durch das Ein- und Austreten einzelner fluoreszierender Spezies entstehen Intensitätsfluktuationen im Fluoreszenzsignal, die als einzelne *bursts* in der Zeitspur erscheinen (unten).

3.3 Methoden der Spektroskopie

Die Fluktuationsrate der Fluoreszenzintensität hängt von der Diffusionsrate der Moleküle ab. Kleine Moleküle (z.B. freie Farbstoffe) diffundieren schnell durch das konfokale Volumen, größere (z.B. yPGK) verweilen länger. Zusätzlich beeinflussen die fotophysikalischen Eigenschaften des Farbstoffes, wie etwa Triplet-Zustände, die Fluktuationsrate. Das Zeitintervall, in dem diese Prozesse ablaufen, liegt typischerweise im Bereich zwischen Mikro- und Millisekunden (Lakowicz, 2006). Ist die Farbstoffkonzentration gering (typischerweise pM-nM), verursacht jedes Molekül, das in das Detektionsvolumen ein- bzw. austritt, starke Intensitätsschwankungen im Fluoreszenzsignal. Ist die Konzentration dagegen zu hoch, befinden sich permanent viele Moleküle im Fokus, die Fluoreszenzintensität ist generell hoch und es ist nicht mehr möglich, zu unterscheiden, ob einzelne Spezies hinein- oder herausdiffundieren. Üblicherweise sollten sich durchschnittlich 0,1 bis einige 10 Moleküle im Observationsvolumen aufhalten. Mit einem für FCS typischen effektiven Volumen von ca. 1 fl ergibt sich daraus eine Probenkonzentration im pico- bis nanomolaren Bereich.

Bei konstanter Anregungsleistung sind die Fluktuationen des Fluoreszenzsignals $\delta F(t)$ definiert als die Abweichungen des Signals $F(t)$ vom Mittel über die Zeit $\langle F(t) \rangle$:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (3.26)$$

Der zeitliche Verlauf der Intensitätsfluktuationen wird verwendet, um die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ der Fluoreszenzintensitätsfluktuationen zu berechnen (Abbildung 3.10). Sie ist definiert als das Produkt der Intensitätsfluktuationen zum Zeitpunkt t , $\delta F(t)$, und zu einem späteren Zeitpunkt τ , $\delta F(t+\tau)$, gemittelt über eine große Anzahl Ereignisse, denn der Zeitraum der Messung beträgt typischerweise einige Minuten, wohingegen τ im Mikro- bis Millisekunden-Bereich liegt (Lakowicz, 2006).

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.27)$$

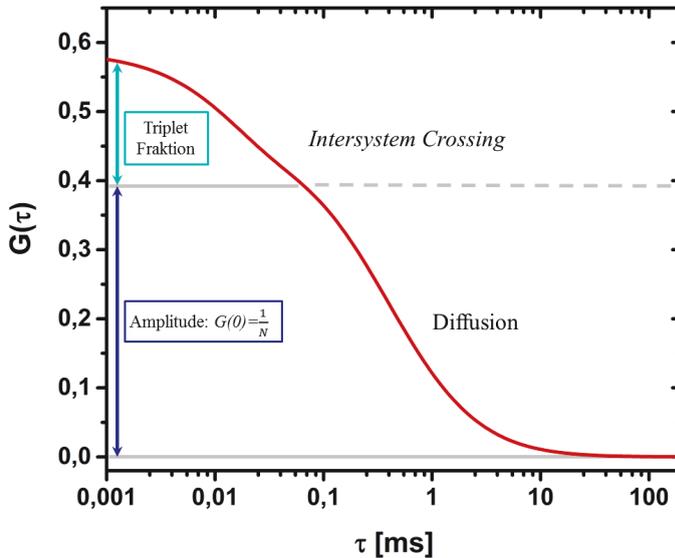


Abbildung 3.10: Theoretischer Verlauf einer FCS-Autokorrelationskurve.

Intensitätsfluktuationen im Fluoreszenzsignal werden zeitlich autokorreliert. Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion zum Zeitpunkt $t = 0$, $G(0)$, hängt von der Probenkonzentration ab und entspricht der inversen Anzahl Moleküle im Observationsvolumen. Durch einen Fit der Autokorrelationsfunktion mit einem passenden Diffusionsmodell wird der Diffusionskoeffizient D der fluoreszierenden Spezies bestimmt. Zusätzlich können Informationen über fotophysikalische Prozesse wie Triplet-Zustände auf kürzeren Zeitskalen entnommen werden.

Um unerwünschte Artefakte durch die Detektoren (*afterpulsing*) und Intensitätsfluktuationen der Lichtquelle zu vermeiden, werden die Signale zwischen zwei Detektionskanälen kreuzkorreliert (Schwille und Haustein, 2002). Die normierte Kreuzkorrelationsfunktion $G(\tau)$ der Intensitätsfluktuationen aus den Kanälen 1 und 2 $\delta F_1(t)$ und $\delta F_2(t)$, ist dann definiert als:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F_1(t) \cdot \delta F_2(t + \tau) \rangle}{\langle F_1(t) \cdot F_2(t) \rangle} \quad (3.28)$$

Ist das effektive Volumen V_{eff} bekannt, kann man aus der Autokorrelationsfunktion Informationen über die Konzentration, Diffusionseigenschaften, Fotophysik und die Homogenität der Probe extrahieren (Buschmann et al., 2009, Kapusta, 2010).

3.3 Methoden der Spektroskopie

Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion $G(0)$ hängt von der durchschnittlichen Anzahl fluoreszierender Moleküle N im effektiven Volumen V_{eff} ab:

$$G(0) = \frac{1}{N} \quad (3.29)$$

Die Konzentration c der Probe ergibt sich aus:

$$c = \frac{N}{V_{\text{eff}} \cdot N_A} \quad (3.30)$$

mit der Avogadro-Konstanten $N_A = 6,022137 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D wurden die Daten mit der Symphotime64-Software (PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland) gefittet. Diese verwendet im Wesentlichen zwei Modelle, die ausschließlich Diffusion (*pure diffusion*) oder zusätzlich Triplet-Zustände (*FCS triplet*) berücksichtigen.

I. Diffusion

Unter der Annahme, dass fluoreszierende Moleküle frei durch das Observationsvolumen diffundieren und das Volumen als 3D-Gauß-Profil angenommen wird, ist die theoretische Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ definiert als:

$$G(\tau) = \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{\tau}{\tau_D[i]}\right] \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D[i]k^2}\right]^{\frac{1}{2}}} \quad (3.31)$$

Die Anzahl fluoreszierender Moleküle N ergibt sich aus:

$$N = \left[\sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \rho[i] \right]^{-1} \quad (3.32)$$

mit dem Beitrag ρ der diffundierenden, fluoreszierenden Spezies i und deren Diffusionszeit τ_D , sowie dem Verhältnis zwischen Länge und Durchmesser des konfokalen Volumens k (Aragón und Pecora, 1976, Rigler et al., 1993, Symphotime64-Hilfe, PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland).

II. Triplet

Dieses Modell beschreibt die Diffusion verschiedener Spezies in Gegenwart eines Triplet-Zustandes, berücksichtigt also fotophysikalische Dunkelzustände durch *intersystem crossing*. Die theoretische Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ ist dann definiert als:

$$G(\tau) = \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{\tau}{\tau_D[i]}\right] \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D[i]k^2}\right]^{\frac{1}{2}}} \cdot \left[1 - T + T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}\right] \quad (3.33)$$

Die Anzahl fluoreszierender Moleküle N ergibt sich aus:

$$N = \left[1 - T \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \rho[i]\right]^{-1} \quad (3.34)$$

Hier beschreibt T den Anteil der Moleküle im Triplet-Zustand und τ_T die zugehörige Lebenszeit (Widengren et al., 1994, Symphotime64-Hilfe, PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland). τ_D , T und τ_T werden mittels Fit bestimmt. Zur Bestimmung von V_{eff} und k , dem Verhältnis zwischen Länge und Durchmesser des Volumens, $k = z_0 / \omega_0$ (Abbildung 3.11), werden Kalibriermessungen mit gut charakterisierten Farbstoffen durchgeführt. In dieser Arbeit wurden dazu Atto655- und Atto488-NHS-Ester verwendet. Die Diffusionskoeffizienten wurden mit $D = 425 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Kapusta, 2010) bzw. $D = 369 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Gabba, 2014) bei $T = 25^\circ\text{C}$ und in wässriger Lösung angenommen.

Der Diffusionskoeffizient D der fluorogenen Spezies, die das Observationsvolumen passieren, wird nun wie folgt berechnet:

$$\omega_0 = \left(\frac{V_{\text{eff}}}{k}\right)^{\frac{1}{3}} \cdot \pi^{-\frac{1}{2}} \quad \text{und} \quad D = \frac{\omega_0^2}{4 \cdot \tau_D} \quad (3.35) \text{ und } (3.36)$$

In dieser Arbeit wurde mit FCS die Qualität der fluoreszenzmarkierten yPGK-Varianten im Hinblick auf ihre Konzentration, Oligomer- bzw. Aggregatbildung und Rückstände freien Farbstoffes abgeschätzt, um nachfolgende Einzelmolekülfaltungsstudien mit FRET zu ermöglichen.

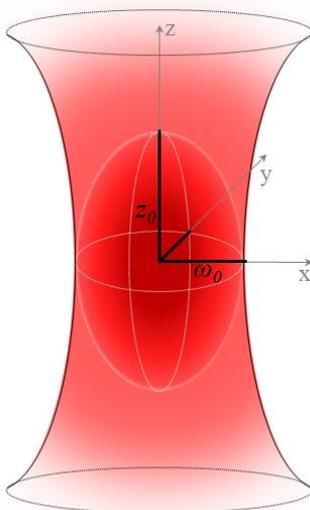


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des Observationsvolumens V_{eff} .
Das Observationsvolumen V_{eff} wird als 3D-Gauß angenommen. Der laterale Radius ω_0 , und der Radius entlang der z-Achse z_0 sind schwarz hervorgehoben.

Durchführung der Einzelmolekül-FRET-Messungen

In dieser Arbeit wurden Einzelmolekül-FRET-Messungen durchgeführt, um Entfaltungszustände der yPGK bei verschiedenen Guanidiniumhydrochlorid (GndHCl-) Konzentrationen zu beobachten. Einzelmolekül-FRET-Studien erlauben, zwischen Subpopulationen in einem heterogenen Ensemble zu unterscheiden. Sie bieten direkten Zugang zu den Verteilungen der zugrundeliegenden molekularen Eigenschaften, z.B. der Anzahl thermodynamischer Zustände und die dazugehörige Verteilung der intramolekularen Distanzen (Schuler, 2013).

Für Einzelmolekül-FRET-Messungen wurden die yPGK-Varianten mit Alexa Fluor 488 Maleimid (Donor) und Alexa Fluor 647 Maleimid (Akzeptor) markiert. Die gut gereinigte und charakterisierte Probe wird in FRET-Puffer (50 mM MOPS, pH 7,5;

50 mM NaCl, 0.001% Tween20) bzw. für Entfaltungsstudien unter Zusatz von verschiedenen Konzentrationen GndHCl, typischerweise auf eine Endkonzentration im pikomolaren Bereich verdünnt und in speziell angefertigte Probencontainer überführt (Abbildung 3.12). Diese bestehen aus abgeschnittenen *protein- low- binding* Eppendorfgefäßen, die auf eine mit Piranha-Lösung und Plasma gereinigte, Polyethylenglycol (PEG-) beschichtete Glasoberfläche geklebt wurden. Tween20 und PEG reduzieren die unspezifische Bindung der Proteine an die Glasoberfläche. Die Eppendorfgefäße sind verschließbar und reduzieren die Verdunstung während der Messung.

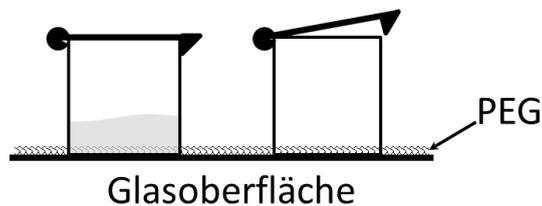


Abbildung 3.12: Probencontainer für FRET-Messungen.

Auf eine PEG-beschichtete Glasoberfläche werden abgeschnittene Eppendorfgefäße geklebt. PEG reduziert unspezifisches Binden der Proteine an Glas, die verschließbaren Gefäße reduzieren die Verdunstung während der Messung.

Einzelmolekül-FRET-Messungen wurden mit einem inversen konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die Donor- und Akzeptor-Farbstoffe werden alternierend mit gepulsten Lasern angeregt, während sie durch das effektive Volumen diffundieren (*pulsed interleaved excitation* PIE). So können Beiträge von Molekülen herausgefiltert werden, die nur mit einem Donor markiert sind oder einen nicht intakten Akzeptor tragen (Müller et al., 2005, Rüttinger et al., 2006, Sisamakias et al., 2010).

Fluoreszenzintensitäten (*bursts*, die von einzelnen Molekülen stammen) werden über den gesamten Zeitraum der Messung aufgenommen. Zusätzlich wird die zeitliche Korrelation der (ankommenden) Photonen gemessen: jeder einzelne Laserpuls startet dabei eine Messung, die durch ein emittiertes Photon gestoppt wird (*time-correlated single photon counting* TCSPC) (Tellinghuisen et al., 1994, Eggeling et al., 1998, Becker, 2005). Aus den einzelnen Messungen dieser *microtime* eines *bursts* erhält man so Informationen über die Fluoreszenzlebensdauer des entsprechenden Farbstoffmoleküls. Damit lässt sich die FRET-Effizienz jedes einzelnen *bursts* sowohl

3.3 Methoden der Spektroskopie

über die (gemessene) Intensität, als auch über die Lebenszeit bestimmen (Formeln 3.22-3.24).

Für jeden *burst* wird aus den Intensitäten die FRET-Effizienz bestimmt. Die Verteilungen der FRET-Effizienzen aus einer Vielzahl bursts werden in FRET-Histogrammen dargestellt. Typischerweise wurden sechs Messungen derselben Probe für jeweils zehn Minuten mit $N \sim 0,03$ durchgeführt. Die Häufigkeitsverteilungen wurden mit einer bzw. zwei Gauß-Funktion(en) $f(E)$ gefittet, um die mittleren FRET-Effizienzen $\langle E \rangle$ der auftretenden Populationen zu bestimmen:

$$f(E) = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \cdot e^{-\frac{(E-E_i)^2}{2\sigma^2}} \quad (3.37)$$

mit der Fläche A und der Varianz σ^2 . Aus $\langle E \rangle$ können anschließend die Farbstoffabstände berechnet werden (Formel 3.21).

4 Ergebnisse

4.1 Design der Cystein-Mutanten der yPGK

Für FRET-Experimente ist es notwendig, die yPGK mit einem geeigneten Paar fluoreszierender Farbstoffe zu markieren. In dieser Arbeit wurden maleimid-funktionalisierte Fluorophore verwendet, die kovalent an die Thiolreste von Cysteinen gekoppelt werden. Dazu wurden an spezifischen Positionen der yPGK Aminosäuren gegen Cysteine ausgetauscht. Außerdem wurde das natürliche Cystein an Position C97 durch Serin ersetzt. Dies erfolgte durch primerabhängige Mutagenese auf DNA-Ebene (Kapitel 3.1.2). Die Substitution der gewünschten Basenpaare wurde durch Sequenzierung validiert.

Vor der Mutagenese wurden potentielle Farbstoffpositionen anhand der Kristallstruktur des Proteins ausgewählt (PDB: 1QPG). Hierbei sind verschiedene Kriterien zu beachten. Der FÖRSTER-Radius des verwendeten FRET-Paars gibt einen gewissen Abstandsbereich geeigneter Farbstoffpositionen vor. Hier wurden Werte typischerweise so gewählt, dass sie im Bereich des FÖRSTER-Radius liegen oder kleiner sind (ca. $0,5 \cdot R_0 < R_{DA} < 1,5 \cdot R_0$, Kapitel 3.3.3). Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Markierungspositionen für die Farbstoffmoleküle zugänglich sind, also möglichst in unstrukturierten Bereichen an der Oberfläche des Proteins exponiert zum Lösungsmittel liegen. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die Struktur und Stabilität des Proteins trotz Mutagenese erhalten bleibt, wurden dem Cystein ähnliche Aminosäuren, wie Serin und Threonin ersetzt. Auch die polaren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutamin konnten an spezifischen Positionen erfolgreich durch Cystein ersetzt werden. Eine Substitution von Aminosäuren, die maßgeblich für die Substratbindung und Beweglichkeit (*hinge-bending*) des Enzyms, und damit für seine katalytische Aktivität sind, wurde vermieden. Tabelle 4.1 zeigt die Zusammenstellung potentieller Farbstoffpositionen in der yPGK, die als Grundlage dieser Arbeit diente.

4.1 Design der Cystein-Mutanten der yPGK

Tabelle 4.1: Farbstoffpositionen für FRET-Studien in der Aminosäuresequenz der yPGK.

Domäne	Positionen der Mutationen	C α -Abstand	Kommentar
N/C	C97S Q135C S290C	39 Å	✓
N	C97S S1C Q135C	37 Å	✓
	C97S A110C Q135C	41 Å	kein FRET
C	C97S T202C D256C	34 Å	✓
	C97S T202C S290C	42 Å	aussichtsreicher Kandidat
	C97S S290C K403C	36 Å	aussichtsreicher Kandidat
	C97S T202C K244C	32 Å	Position 244 für Farbstoffe nicht zugänglich
	C97S K244C S290C	28 Å	Position 244 für Farbstoffe nicht zugänglich
	C97S S290C I304C	48 Å	kein FRET
	C97S S290C A306C	44 Å	Sekundärstruktur nicht vergleichbar mit WT
C97S S290C A362C	37 Å	kein FRET	

Trotz Beachtung der genannten Kriterien bleibt die Vorhersage über die Stabilität der Mutante und die Zugänglichkeit der ausgewählten Farbstoffpositionen schwierig und muss experimentell validiert werden. Anhand der Kommentare in Tabelle 4.1 wird deutlich, dass die meisten potentiellen Cysteinvarianten aufgrund von Strukturveränderungen ausgelöst durch den Aminosäureaustausch oder Unzugänglichkeit für die entsprechenden fluoreszierenden Farbstoffe nicht in die Entfaltungsstudien aufgenommen wurden. Alle in Tabelle 4.1 aufgeführten Cysteinvarianten (bis auf zwei Kandidaten der C-Domäne) wurden in *E.coli* exprimiert und aus dem Lysat gereinigt. Anschließend wurden sie einem Qualitätstest unterzogen (Abbildung 4.1). Zusätzlich zu den Cystein-Doppelmutanten der yPGK wurden die zugehörigen Einzelmutanten hergestellt. Diese dienen zum einen zur Überprüfung, ob die jeweilige Position zugänglich für die Fluoreszenzfarbstoffe ist, zum anderen sind sie notwendig, um die Quantenausbeuten der Farbstoffe an der jeweiligen Position zu

bestimmen. Die Quantenausbeuten werden wiederum benötigt, um die FRET-Effizienzen aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten zu bestimmen.

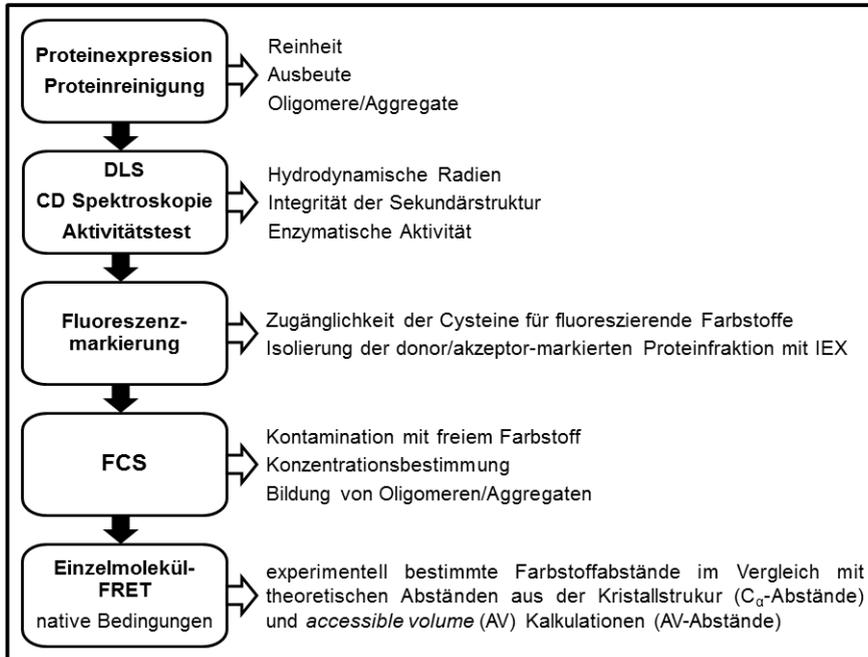


Abbildung 4.1: Qualitätstest zur Validierung der Struktur und der Fluoreszenzmarkierung der yPGK Cysteinvarianten für Entfaltungsstudien mit FRET.

Zunächst wurden die Integrität der Sekundärstrukturen mittels CD-Spektroskopie und die katalytische Aktivität der Cystein-Doppelmutanten überprüft. Als Vergleichsstandard diente in beiden Schritten der Wildtyp. Anschließend wurden die Mutanten mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Dabei lässt sich, vor allem anhand der Einzelmutanten, feststellen, ob die jeweilige Position zugänglich für den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff ist. Nach erfolgreicher Fluoreszenzmarkierung der Cystein-Doppelmutanten wurden mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) die Konzentration und die Diffusionseigenschaften der fluoreszierenden Spezies in der Probe bestimmt. Auf diese Weise kann abgeschätzt werden, ob das fluoreszenzmarkierte Protein Oligomere/Aggregate bildet und ob sich nach dem Reinigungsprozess noch freier Farbstoff in der Probe befindet. Zusätzlich lassen sich aus den Diffusionseigenschaften Rückschlüsse auf die Struktur bzw.

4.1 Design der Cystein-Mutanten der yPGK

Strukturveränderungen der fluoreszenzmarkierten Varianten ziehen. So wurden die mit FCS bestimmten hydrodynamischen Radii der fluoreszenzmarkierten yPGK-Varianten mit denen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmten hydrodynamischen Radien der unmarkierten Varianten verglichen. Zeigten die yPGK-Varianten die für das monomerische Enzym typischen Diffusionseigenschaften, wurden FRET-Messungen unter nativen Bedingungen durchgeführt. Diese geben Auskunft über zwei Kriterien, die für die Qualitätsevaluation der Probe maßgeblich sind. Zum einen zeigen nur yPGK-Varianten das erwartete FRET-Signal, die auch mit einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff markiert sind. Zum anderen wurden die aus den FRET-Experimenten bestimmten nativen Farbstoffabstände mit den aus der Kristallstruktur bestimmten C_{α} -Abständen verglichen. Um die Kohlenstoff-Linker zwischen den Farbstoffen und den Thiolen der Cysteine und die Bewegungsfreiheit der gebundenen Fluorophore einzubeziehen, wurde die Verteilung der möglichen Farbstoffabstände berechnet (*accessible volume*, AV-Kalkulationen). Dafür wurde ein Modell verwendet, das auf der Geometrie der entsprechenden Farbstoffe, die als FRET-Paar gewählt wurden und der Kristallstruktur der yPGK basiert (Sindbert et al., 2011, Höfig et al., 2014). yPGK-Varianten, die alle Qualitätsmerkmale erfüllen und akzeptable experimentelle Farbstoffabstände unter nativen Bedingungen zeigen, wurden in die Entfaltungsstudien aufgenommen. Auf diese Weise wurde ein FRET-System aus drei Cysteinvarianten der yPGK generiert (Abbildung 4.2, in Tabelle 4.1 hervorgehoben), an dem Abstandsänderungen zwischen den beiden Domänen des Proteins und innerhalb der individuellen Domänen im Rahmen des *full-length*-Proteins während der Entfaltung mit GndHCl gemessen werden können.

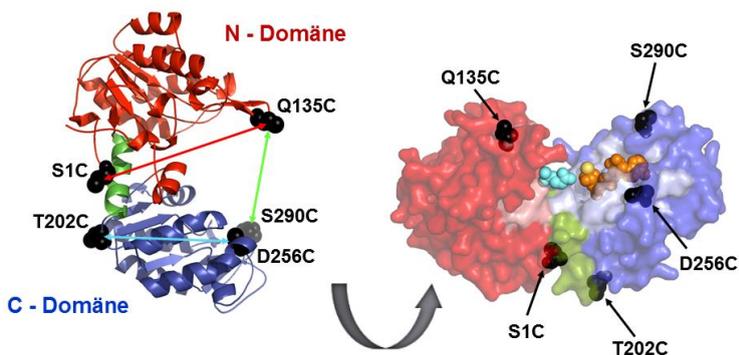


Abbildung 4.2: FRET-System aus drei Cystein-Doppelmutanten der yPGK.

In den Kristallstrukturen der yPGK (PDB: 1QPG) sind die Domänen (N-Domäne rot, C-Domäne blau, *hinge*-Region grün) und die Positionen der Cysteinmutationen (schwarz) gekennzeichnet. Die C_{α} -Abstände der Inter- bzw. Intradomänen-Mutanten sind durch entsprechend farbige Pfeile in der Repräsentation der Sekundärstrukturelemente (links) gekennzeichnet. Die Oberflächenrepräsentation (rechts) zeigt die Bindestellen des (Bis-) Phosphoglycerats (cyan) in der N-Domäne (*basic patch*, hellrot) und der Nucleotidsubstrate MgADP/MgATP (orange) in der C-Domäne (hellblau).

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der einzelnen Schritte der Reinigung und Qualitätsprüfung der yPGK-Varianten des FRET-Systems im Detail dargestellt.

4.2 Proteinexpression und Reinigung

Das Wildtyp-Gen lag im Expressionsvektor pET27b vor. Durch Expression aus diesem Vektor wird dem Protein ein C-terminales His-Tag angehängt. Dieser C-terminal His-markierte Wildtyp, PGK WT His (in den folgenden Abschnitten als yPGK WT bezeichnet) diente in allen Schritten des Qualitätstests als Standard. Die Expression des PGK WT His aus pET27b ist sehr effizient, die Cysteinvarianten der yPGK lassen sich jedoch nicht aus diesem System exprimieren. Die Expression der yPGK-Varianten erfolgte aber mit hoher Ausbeute aus dem Expressionsvektor pET15b. Dieser Vektor codiert neben einem N-terminalen His-Tag eine Thrombinschnittstelle zwischen dem His-Tag und dem rekombinanten Protein, die verwendet werden kann, um das Tag nach der Expression durch Proteaseverdau zu entfernen. Der Vorteil kleiner Tags besteht darin, dass sie meist wenig bis keinen Einfluss auf die Struktur und Funktion des zu untersuchenden Proteins nehmen. Damit erübrigen sich meistens aufwendige, und potentiell analytschädigende Methoden zu ihrer Entfernung. Um zu untersuchen, ob das His-Tag und dessen Position Einfluss auf die Struktur und Aktivität der yPGK hat, wurden, neben den N-terminal His-markierten Cysteinvarianten, drei Wildtyp-konstrukte, PGK WT His, His PGK WT und PGK WT, hergestellt (Abbildung 4.3).

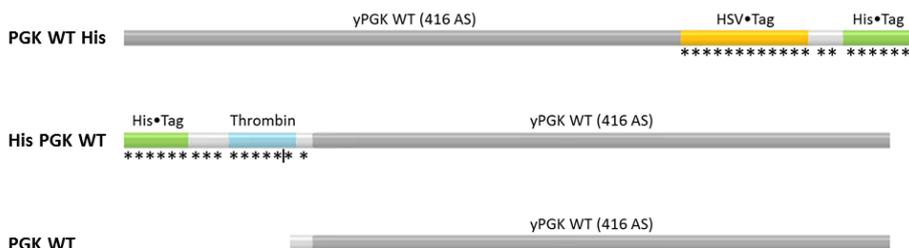


Abbildung 4.3: Wildtypkonstrukte der yPGK.

PGK WT His (oben) trägt ein C-terminales His-Tag (grün). Zusätzlich codiert der Expressionsvektor pET27b ein HSV-Tag (gelb). Das N-terminal His-markierte Wildtypkonstrukt His PGK WT (mitte) trägt eine Proteaseschnittstelle zur Entfernung des His-Tags (hellblau). Dem Konstrukt PGK WT (unten) wurde das His-Tag mit Thrombinverdau entfernt. * symbolisieren zusätzliche Aminosäuren zur Wildtypsequenz.

4.2 Proteinexpression und Reinigung

Die Expression der Wildtypkonstrukte und der yPGK-Cysteinvarianten erfolgte in *E.coli* BL21 Codon Plus RP (Kapitel 3.2.1). Die Zellen wurden mechanisch aufgeschlossen und Membranfragmente sowie die genomische DNA durch Ultrazentrifugation entfernt. Abbildung 4.4 A zeigt die Reinheit der Proteinprobe nach den anschließenden Reinigungsschritten (Kapitel 3.2.2) in einem Polyacrylamid (PAA)-Gel exemplarisch für PGK C97S T202C D256C. Die yPGK-Variante läuft erwartungsgemäß zwischen der 40 kDa und 55 kDa-Bande des Markers.

Zunächst wurde durch schrittweise Inkubation mit 1,5 M und 2,5 M Ammoniumsulfat ein erheblicher Anteil bakterieller Proteine gefällt und durch Zentrifugation aus dem Lysat entfernt. Dieser vorbereitende Reinigungsschritt erhöht die Effizienz der nachfolgenden NiNTA-Affinitätschromatographie. Ein Reinigungseffekt ist bereits nach diesem Schritt in den entsprechenden Spuren des PAA-Gels (Abbildung 4.4 A) zu sehen. Die so vorgereinigte Probe wird anschließend auf die NiNTA-Säule geladen und durchläuft das Material. Die sechsfach His-markierten yPGK-Varianten, aber auch andere histidinreiche bakterielle Proteine können mit der NiNTA-Matrix interagieren. In zwei Imidazol-Waschschritten (2,5 mM und 5 mM) wurden solche Proteine, die mit schwächerer Affinität an das NiNTA binden, entfernt (sichtbar in den Waschschritt-Spuren in Abbildung 4.4 A). Die yPGK wurde mit 250 mM Imidazol als Kompetitor von der NiNTA-Säule eluiert. Durch ein, im Vergleich zum applizierten, reduziertes Elutionsvolumen wird die Probe dabei angereichert. In den entsprechenden Spuren im PAA-Gel ist bereits ein deutlicher Reinigungseffekt erkennbar, trotzdem sind zusätzliche Banden zu sehen.

Die Probe wurde dann durch Dialyse in PGK-Lagerpuffer überführt. In einem finalen Reinigungsschritt wurden mittels Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC) Proteinkontaminationen, aber auch mögliche Degradationsprodukte und Oligomere entfernt. Abbildung 4.4 B zeigt die Elutionsprofile der SEC ebenfalls exemplarisch für die PGK C97S T202C D256C Variante im Vergleich zum Wildtyp. Die Monomerfraktion wird bei $V \sim 90$ ml eluiert. Das Elutionsprofil der Cysteinvariante zeigt im Gegensatz zum Wildtyp einen erhöhten Peak bei Elutionsvolumina um $V \sim 80$ ml, der hauptsächlich Oligomere des Enzyms, die vermutlich durch die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den zur Oberfläche exponierten Cysteinen entstehen, enthält. Die yPGK-Monomerfraktion wurde in

flüssigem Stickstoff schockgefroren und ist einige Monate bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagerbar. Die Proteinausbeuten liegen typischerweise bei 6 mg yPGK pro Liter Bakterienkultur.

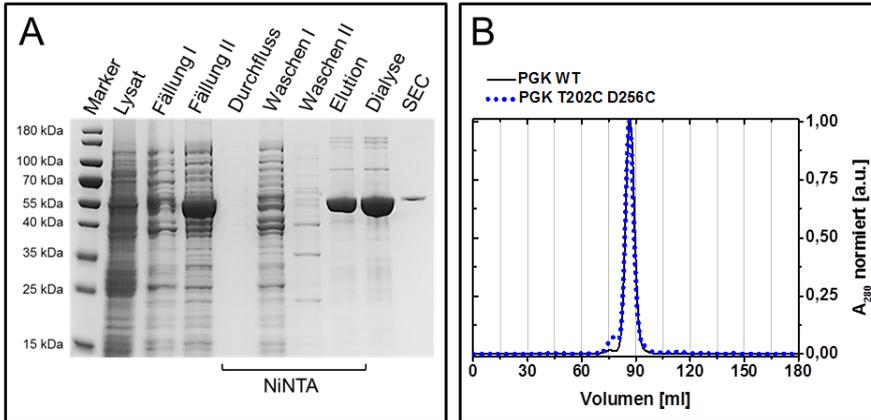


Abbildung 4.4: Expression und Reinigung der yPGK Varianten.

A: Auftrennung der Intra-C-Domänen-Cysteinmutante nach Ultrazentrifugation des Bakterienlysats, Fällung mit 1,5 M (I) und 2,5 M (II) Ammoniumsulfat, NiNTA-IMAC, Dialyse mit PGK Lagerpuffer und SEC in einem 12% Polyacrylamidgel. Die yPGK-Mutante (Molekulargewicht: ca. 45 kDa) läuft erwartungsgemäß zwischen der 40 kDa und 55 kDa Bande des Markers.

B: Elutionsprofile des yPGK WT (schwarz) und der Intra-C-Domänen Cysteinvariante (blau) nach SEC. Die Monomerfraktion wird bei $V \sim 90$ ml eluiert. Ein zweiter Peak bei $V \sim 80$ ml in der Elution der Cysteinvariante enthält hauptsächlich Oligomere des Enzyms.

Immunologischer Nachweis der yPGK-Varianten

Nach der Reinigung der yPGK-Varianten wurden diese mittels Westernblot immunologisch nachgewiesen (Kapitel 3.2.5). Dafür wurde ein Anti-His-Antikörper verwendet, der das N-terminale His-Tag der Enzyme erkennt. Das Molekulargewicht wurde mittels SDS-PAGE verifiziert (Abbildung 4.5).

Alle Einzel- und Doppelmutanten laufen, wie zu erwarten, auf Höhe des Wildtyps zwischen der 40 kDa und 50 kDa Bande des Markers und konnten mit dem Antikörper nachgewiesen werden (Einzelmutanten Abbildung 4.5 A; Doppelmutanten Abbildung 4.5 B).

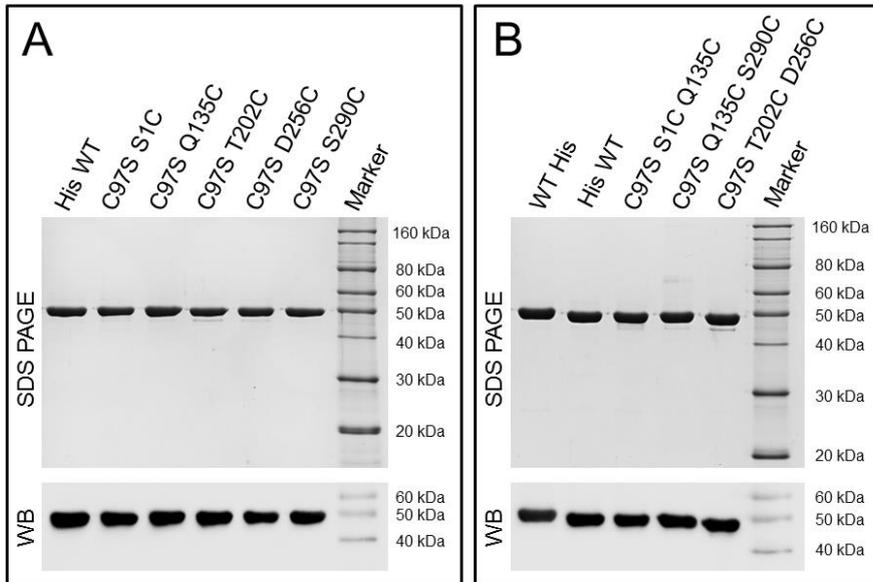


Abbildung 4.5: Immunologischer Nachweis der yPGK-Varianten.

A: Auftrennung der yPGK Einzel-Cystein-Mutanten nach ihrem Molekulargewicht im Vergleich zum His PGK WT mit SDS-PAGE (oben) und immunologischer Nachweis mit Westernblot (unten).

B: Auftrennung der yPGK Doppel-Cystein-Mutanten nach ihrem Molekulargewicht im Vergleich zum PGK WT His und His PGK WT mit SDS-PAGE (oben) und immunologischer Nachweis mit Westernblot (unten).

Pro Spur wurde 1 µg Protein aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem Anti-His-Antikörper. Alle Cysteinvarianten laufen erwartungsgemäß auf Höhe der Wildtypkonstrukte zwischen der 40 kDa und 50 kDa Bande des Markers und konnten mit dem Antikörper detektiert werden.

Wie bereits erwähnt neigen die Cysteinvarianten stärker zur Bildung von Oligomeren als der Wildtyp. Die Thiolgruppen der Cysteine sind sehr reaktiv. Sie oxidieren in Anwesenheit von Sauerstoff im Lösungsmittel und bilden Disulfidbrücken. Mit Blue Native (BN) PAGE wurde der Grad der Oligomerisierung der Cysteinvarianten im Vergleich zum WT, der ebenfalls ein oberflächenexponiertes Cystein beinhaltet, abgeschätzt (Kapitel 3.2.4). Dabei werden Proteine unter nativen Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, Proteinstruktur und Disulfidbrücken bleiben, im Gegensatz zur SDS-PAGE, erhalten. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst gleiche Mengen Protein (3 µg pro Spur) auf das Gel aufgetragen werden (Einzelmutanten Abbildung 4.6 A; Doppelmутanten Abbildung 4.6 B). Alle Varianten liegen

hauptsächlich als Monomer vor, das auf Höhe der 45 kDa Bande des Markers läuft. In allen Spuren ist eine zweite, unterschiedlich stark ausgeprägte Bande zwischen 67 kDa und 146 kDa deutlich zu erkennen, vermutlich handelt es sich dabei um Dimere der γ PGK. Sowohl Einzel- als auch Doppelmutanten neigen stärker zur Oligomerisierung als der Wildtyp. Um der Bildung von Disulfiden entgegenzuwirken bzw. um Disulfidbrücken zu reduzieren wurden während der Reinigung und vor allem während der Markierungs-Reaktion Reduktionsmittel (DTT, TCEP) verwendet und weitgehend unter Ausschluss von Sauerstoff gearbeitet.

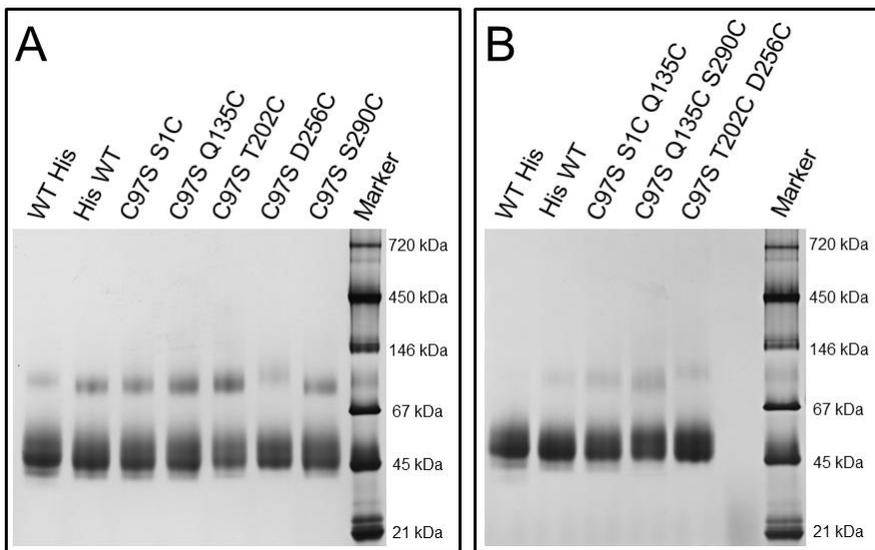


Abbildung 4.6: Blue Native PAGE.

Auftrennung der γ PGK Einzel-Cystein-Mutanten (A) und Doppel-Cystein-Mutanten (B) nach ihrem Molekulargewicht im Vergleich zum PGK WT His und His PGK WT in einem Polyacrylamid-Gradientengel (6-14% PAA) unter nativen Bedingungen. Dabei bleibt die Proteinstruktur erhalten. Es wurden 3 μ g Protein/Spur aufgetragen. Alle γ PGK-Varianten liegen hauptsächlich monomerisch vor. Die Monomerbande läuft auf Höhe der 45 kDa Bande des Markers. Eine zweite Bande zwischen der 67 kDa und 146 kDa ist in allen Spuren in unterschiedlicher Stärke erkennbar und deutet darauf hin, dass alle Varianten dazu neigen, Oligomere zu bilden.

4.3 Dynamische Lichtstreuung

Mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) können hydrodynamische Radien kleiner Partikel bestimmt werden. Damit lassen sich auch Biomoleküle, z.B. Proteine und deren Aggregationseffekte in Lösung untersuchen. Dabei wird ein Laser verwendet, dessen Licht an den Proteinen gestreut wird. Die Streulichtintensität ist dabei stark von der Partikelgröße abhängig. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung ergeben sich Fluktuationen der Streulichtintensitäten. Diese werden mit hoher Zeitauflösung detektiert und korreliert. Die Autokorrelationskurven werden mit einem Modell gefittet, das die Diffusion von Makromolekülen/Polymeren beschreibt und so die Diffusionskoeffizienten der Spezies in der Probe bestimmt. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung können aus den Diffusionskoeffizienten D die hydrodynamischen Radien R_h berechnet werden (Kapitel 3.3.2, Formel 3.12).

Abbildung 4.7 zeigt die Autokorrelationskurven der unmarkierten yPGK-Varianten im Vergleich zum Wildtyp (linke Spalte) und die zugehörigen Verteilungen der hydrodynamischen Radien (rechte Spalte) aus DLS-Messungen.

Alle Cystein-Mutanten zeigen einen hydrodynamischen Radius von $R_h = 3,1$ nm. Die geringfügige Abweichung vom Wildtyp ($R_h = 3,4$ nm) kann durch die Unterschiede in der Aminosäuresequenz bzw. der Position des His-Tag der verschiedenen Konstrukte (Abbildung 4.3) erklärt werden. Die hydrodynamischen Radien entsprechen allerdings dem für ein Protein des Molekulargewichts der yPGK (45 kDa) zu erwartenden Wert sowie den Ergebnissen früherer DLS- und FCS-Messungen (Rosenkranz, 2011, Gabba, 2014). Die Verteilungen zeigen keine Peaks bei größeren Radien, wie sie für Aggregate zu erwarten wären.

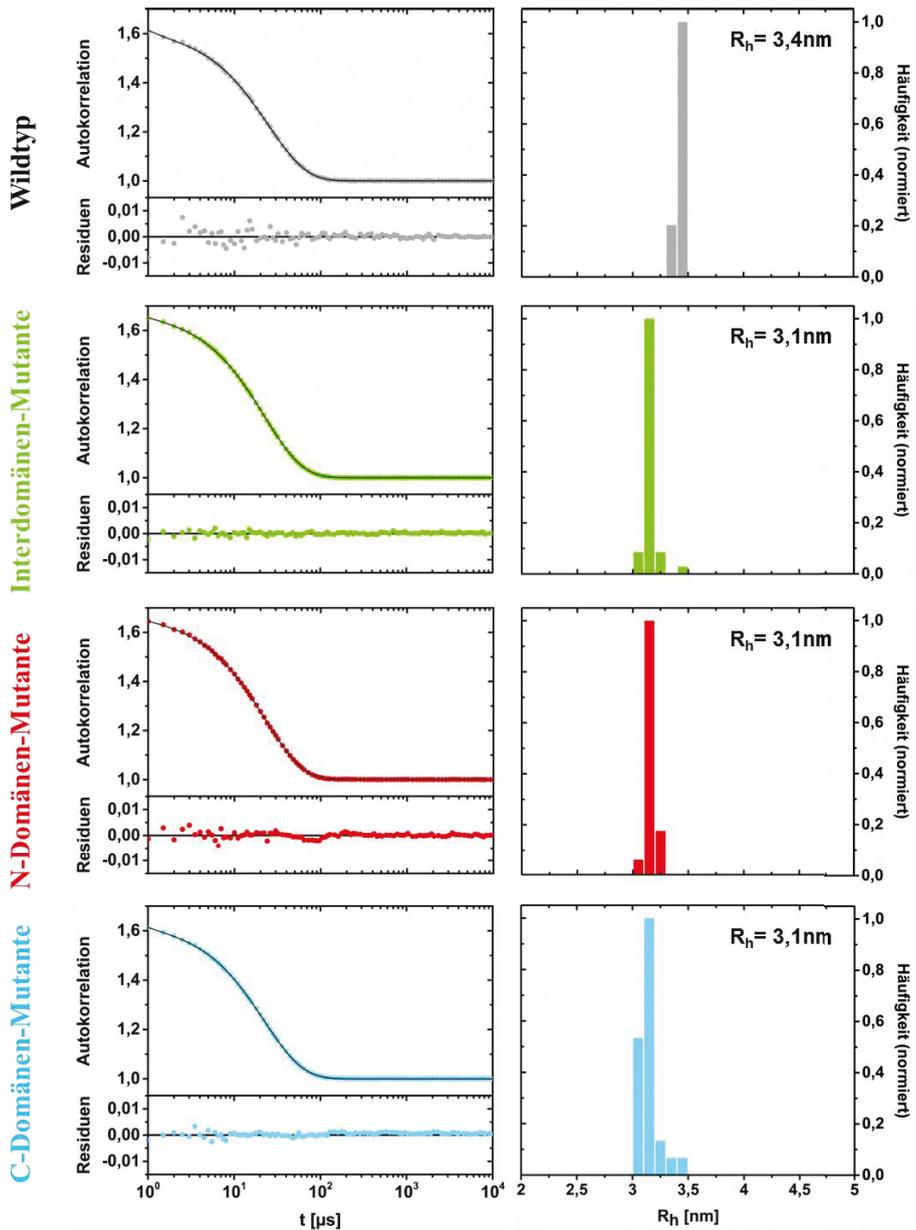


Abbildung 4.7: Dynamische Lichtstreuung.

DLS-Autokorrelationskurven (links) und Verteilungen der hydrodynamischen Radien (rechts) der yPGK-Varianten. Für die Cystein-Mutanten ergibt sich übereinstimmend $R_h = 3,1 \text{ nm}$ und damit eine geringe Abweichung vom Wildtyp mit $R_h = 3,4 \text{ nm}$.

4.4 Integrität der Sekundärstruktur

Um zu überprüfen, dass die Sekundärstruktur der PGK-Varianten durch das N-terminale His-Tag und die eingefügten Mutationen nicht verändert wird, wurden CD-Messungen durchgeführt (Kapitel 3.3.1). Dazu wurde die yPGK-Konzentration durch Verdünnen in 10 mM MOPS, pH 7,5 so eingestellt, dass die Absorption $A_{280\text{nm}} = 0,07\text{-}0,1$ OD beträgt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Absorptionsspektroskopie bestimmt. Der Einfluss von Salz (NaCl) und Komplexbildnern (EDTA) auf die Sekundärstruktur des Wildtyps und der C97S Q135C S290C Variante wurde in einer früheren Arbeit unter verschiedenen Bedingungen (10 mM MOPS; 10 mM MOPS / 50 mM NaCl; 10 mM MOPS / 2mM EDTA und 10 mM MOPS / 50 mM NaCl / 2 mM EDTA bei pH 7,5) mit CD-Spektroskopie und Tryptophanfluoreszenz überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Sekundär- und die Tertiärstruktur in allen getesteten Bedingungen erhalten bleibt, auch wenn der Puffersubstanz weder NaCl noch EDTA zugesetzt wurden (Rosenkranz, 2011). Da diese Substanzen keinen messbaren Einfluss auf die Proteinstruktur zeigen, sie aber die Qualität der CD-Messungen stören (hohes Rauschen) und den Messbereich einschränken, wurden sie in dieser Arbeit nicht eingesetzt.

Es wurden Spektren im Wellenlängenbereich zwischen $\lambda = 200\text{-}280$ nm aufgenommen. yPGK ist ein überwiegend α -helikales Protein, für das Spektren mit negativen Peaks bei $\lambda = 222$ nm und $\lambda = 208$ nm erwartet werden. Pufferspektren wurden separat zu den Proteinspektren aufgenommen und von diesen abgezogen. Außerdem wurden die Spektren für die Proteinkonzentrationen der Proben und die Anzahl der Aminosäuren korrigiert, damit alle Spektren untereinander vergleichbar sind.

Zunächst wurde untersucht, ob der Verbleib des His-Tag oder dessen Position, die Sekundärstruktur des Enzyms maßgeblich verändert. Abbildung 4.8 zeigt die CD-Spektren der entsprechenden WT-Konstrukte, die wie oben beschrieben aufgenommen wurden. Die Spektren zeigen, dass die Sekundärstruktur der yPGK durch die Position des His-Tag nicht maßgeblich verändert wird. Auch das Spektrum des Wildtyps, dem das N-terminale His-Tag durch Thrombinverdau entfernt wurde, weicht nicht erheblich von den Spektren der histidinmarkierten Konstrukte ab (innerhalb eines Toleranzbereichs von $\pm 10\%$, hellgrauer Bereich in Abbildung 4.8).

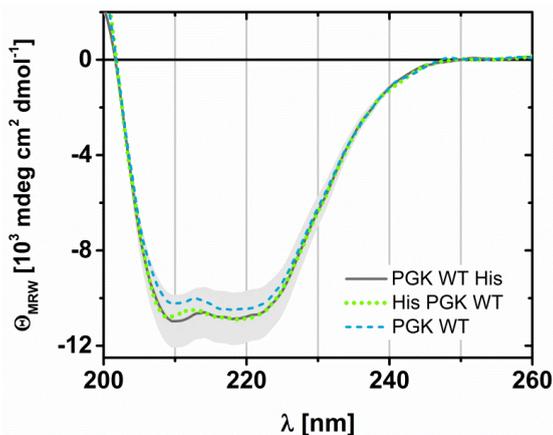


Abbildung 4.8: CD-Spektren verschiedener Wildtypkonstrukte der yPGK.

Die Spektren des C-terminal (grau), N-terminal His-markierten (grün) und des unmarkierten Wildtyps der yPGK (blau) unterscheiden sich nicht maßgeblich und liegen innerhalb eines Toleranzbereiches von $\pm 10\%$ (hellgrau unterlegt). Das His-Tag selbst und seine Position am N- oder C-Terminus beeinträchtigen die Sekundärstruktur demnach nicht.

Anschließend wurde der Einfluss der Mutagenese auf die Sekundärstruktur der yPGK untersucht. Abbildung 4.9 zeigt die CD-Spektren der yPGK-Cysteinvarianten im Vergleich zum PGK WT His. Sie zeigen keinen Einfluss der Mutagenese auf die Sekundärstruktur der yPGK. Alle Spektren weichen weder in der Lage der typischen negativen Peaks noch in ihrer Signalstärke voneinander ab.

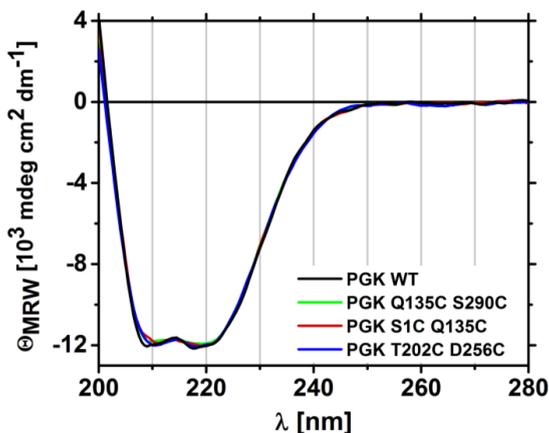


Abbildung 4.9: CD-Spektren der yPGK-Cysteinvarianten.

Die Spektren der Inter-Domänen-Mutante (grün) und der beiden Intra-Domänen-Mutanten (N-Domänen-Mutante, rot; C-Domänen-Mutante, blau) weisen, genau wie der Wildtyp (schwarz) die für α -helikale Proteine charakteristischen negativen Peaks bei $\lambda = 208$ nm und $\lambda = 222$ nm auf und weichen in ihrer Signalstärke nicht vom Wildtypspektrum ab. Die Cystein-Mutationen verändern die Struktur der yPGK nicht.

4.5 Enzymatische Aktivität der Cysteinvarianten der yPGK

Enzyme können nur katalytisch aktiv sein, wenn sie ihre native Tertiärstruktur angenommen haben. Tags und Mutationen der Aminosäuresequenz besonders in bzw. nahe der katalytischen Einheit können die Struktur, Stabilität und Beweglichkeit des Enzyms, und damit die Enzymaktivität, beeinflussen. Die Umsatzrate k_{cat} eines Enzyms ist daher ein indirektes Maß für die Effektivität der Proteinfaltung auch im Hinblick auf die 3D-Struktur. Um sicherzustellen, dass die Cystein-Mutationen und das N-terminale His-Tag der yPGK-Varianten die Funktionalität des Enzyms nicht entscheidend beeinträchtigen, wurde deren katalytische Aktivität unter Berücksichtigung verschiedener Szenarios getestet. Dabei wurde der Aktivitätstest wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, angelehnt an das Protokoll der Firma Sigma, durchgeführt.

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Puffersubstanzen untersucht. Das Protokoll der Firma Sigma gibt 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 6,9 als Puffersubstanz an. Phosphationen sind essentiell für die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat, einem der Substrate der yPGK, die von der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) katalysiert wird. Phosphationen müssen dem Assay, genau wie β -NAD und ADP, zugegeben werden. CD- und FRET-Messungen wurden optimalerweise in 10 mM MOPS bzw. 50 mM MOPS/50mM NaCl pH 7,5 durchgeführt. Tabelle 4.2 zeigt, dass die Umsatzrate unter diesen Bedingungen steigt. Alle folgenden Aktivitätsmessungen wurden deshalb in 50 mM MOPS/10 mM KPi bei pH 7,5 unter Zugabe von 50 mM NaCl durchgeführt.

Tabelle 4.2: Wildtypaktivität in verschiedenen Pufferbedingungen.

Puffersubstanz	pH	Aktivität [%]
100 mM KPi	6,9	100
100 mM KPi	7,5	90
10 mM MOPS/10 mM KPi	7,5	350
50 mM MOPS/10 mM KPi	7,5	400

Die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Aktivitätstests hängt von mehreren Faktoren ab. Besonders kritisch sind dabei die Stabilität der eingesetzten Chemikalien (besonders des ADP) und die genaue Konzentrationsbestimmung der eingesetzten yPGK-Variante im pico- bis nanomolaren Bereich. Tabelle 4.3 zeigt beispielhaft die Aktivität verschiedener Expressionen des PGK WT His Konstrukts (Abbildung 4.3) in unabhängigen Messungen. Als Hauptursache für die Streuung der einzelnen Messwerte erscheint die Reproduzierbarkeit des Aktivitätstests wahrscheinlich. Deswegen wurde dieses WT-Konstrukt als interner Standard in jedem Assay eingesetzt. Die gemessenen Werte der anderen Konstrukte wurden jeweils auf den entsprechenden Wert dieses Wildtyps bezogen. Allgemein liegt die Reproduzierbarkeit der Aktivitätsbestimmung im Bereich von 10 % (vgl. Standardabweichung in Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Aktivität verschiedener Wildtypexpressionen (PGK WT His).

Datum	k_{cat} [s^{-1}]	Expression
19.08.2014	419	# 1
21.10.2014	323	# 1
21.10.2014	320	# 2
27.03.2015	270	# 3
20.04.2015	359	# 1
20.04.2015	330	# 1
20.04.2015	340	# 4
19.08.2015	350	#4
16.10.2015	335	#4
Mittlere Aktivität:	338±37	

4.5 Enzymatische Aktivität der Cysteinvarianten der yPGK

Auch der Einfluss des His-Tags auf die katalytische Aktivität der Wildtypkonstrukte (PGK WT His, His PGK WT und PGK WT) wurde untersucht (Abbildung 4.10, Tabelle 4.4).

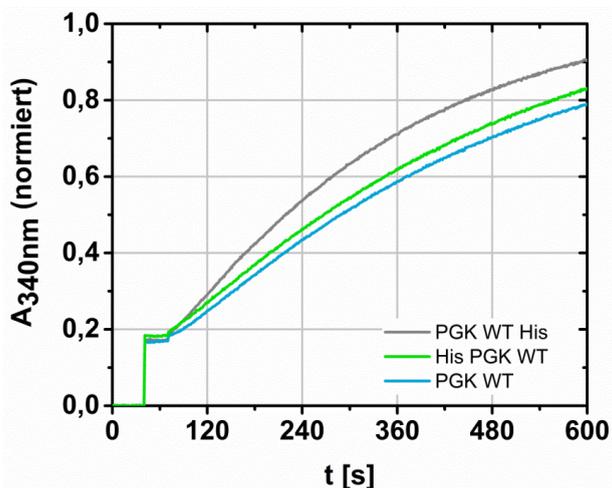


Abbildung 4.10: Katalytische Aktivität verschiedener Wildtypkonstrukte der yPGK. Kinetiken der Phosphatübertragung der Wildtypkonstrukte gemessen mit der Absorption von NADH bei $\lambda = 340\text{nm}$. Die katalytische Aktivität der Konstrukte His PGK WT (grün) und PGK WT (blau) sind leicht (ca. 20%) reduziert gegenüber dem PGK WT His (grün).

Die Aktivität des Wildtyps mit N-terminalem His-Tag (His PGK WT, grau) ist um etwa 20 % reduziert gegenüber dem internen Standard PGK WT His (grün). Der Einfluss des Tags selbst auf die Aktivität des Proteins ist generell als gering anzunehmen (PGK WT, blau, 73%). Aus diesem Grund wurde der His-Tag deshalb in weiteren Experimenten am Protein belassen.

Tabelle 4.4: Katalytische Aktivität verschiedener Wildtypkonstrukte der yPGK.

Konstrukt	k_{cat} [s^{-1}]	Aktivität [%]
PGK WT His	350	100
His PGK WT	275	79
PGK WT	255	73

Schließlich wurden die Aktivitäten der Cysteinvarianten mit jeweils drei Wiederholungsmessungen bestimmt, um den Einfluss der Mutationen auf die Funktionalität des Enzyms zu bestimmen (Tabelle 4.5, Tabelle 4.6 und Tabelle 4.7).

Tabelle 4.5: Katalytische Aktivität der Intra-N-Domänen-Mutante.

Umsatzrate: k_{cat} [s^{-1}]		% WT
WT	S1C Q135C	
323	218	68
270	221	82
359	251	77
		73±6

Tabelle 4.6: Katalytische Aktivität der Inter-Domänen-Mutante.

Umsatzrate: k_{cat} [s^{-1}]		% WT
WT	Q135C S290C	
323	219	68
270	265	98
335	206	59
		75±17

Tabelle 4.7: Katalytische Aktivität der Intra-C-Domänen-Mutante.

Umsatzrate: k_{cat} [s^{-1}]		% WT
WT	T202C D256C	
419	279	67
270	236	87
270	245	91
		82±11

Die Aktivitäten der Cysteinvarianten sind leicht reduziert gegenüber der Umsatzrate des Wildtyp-Konstrukts (27 % im Fall der N-Domänenmutante, 25 % im Fall der Interdomänenmutante und 18 % im Fall der C-Domänenmutante).

Die Aktivitäten der Cysteinvarianten sind jedoch vergleichbar mit der des His WT Konstrukts, dessen Aktivität um 21 % gegenüber dem internen Standard reduziert ist. Demnach erscheint als Ursache die Position des His-Tags am N-Terminus wahrscheinlicher als der Aminosäureaustausch selbst.

Die Cysteinvarianten der yPGK sind unter den Bedingungen, die in FRET-Studien angewendet wurden katalytisch aktiv. Struktur und Funktionalität des Enzyms werden durch die für die Positionierung der fluoreszierenden Farbstoffe durchgeführte Mutagenese nicht maßgeblich verändert.

4.6 Fluoreszenzmarkierung der yPGK für Einzelmolekül-FRET-Studien

Für FRET-Studien wurden die yPGK Cysteinvarianten mit fluoreszierenden Donor- und Akzeptor-Molekülen markiert. Eine bei pH 7,5 gepufferte 20 μ M Proteinlösung wurde mit einem fünffachen Überschuss der Farbstoffe Alexa Fluor 647 und Alexa Fluor 488 in einem Mischungsverhältnis 1,5:1 inkubiert (Kapitel 3.3.3). Nach erfolgter Thiol-Maleimid-Reaktion wurden ungebundene Farbstoffe mit Größenausschlusschromatographie vom fluoreszenzmarkierten Protein abgetrennt. Anschließend wurde die Donor-Akzeptor-markierte yPGK mittels Ionenaustauschchromatographie und einem geeigneten, kontinuierlichen NaCl-Gradienten (0-500 mM NaCl) in einem automatisierten FPLC-System isoliert. Diese Methode trennt verschiedene Spezies in der Proteinprobe aufgrund ihrer Ladung. In diesem Fall liegt eine negative netto-Ladung zwischen den Farbstoffen vor. Durch die gleichzeitige Markierung mit beiden Farbstoffen über dieselbe Kopplungsreaktion entsteht ein komplexes Gemisch unterschiedlich markierter Proteinspezies. Außerdem ist auch eine unspezifische Interaktion zwischen Farbstoff und Protein möglich, so dass weitere, auch mehrfach markierte Spezies auftreten können. Abbildung 4.11 zeigt ein typisches Elutionsprofil, exemplarisch für PGK C97S Q135C S290C.

Während der Elution wurde gleichzeitig die Absorption der beiden Farbstoffe und des Proteins bei drei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen, um die einzelnen Komponenten in den Fraktionen zu detektieren. Die Absorption des Akzeptorfarbstoffes während der Elution wurde bei $\lambda = 650 \text{ nm}$ aufgenommen (rot), die des Donorfarbstoffes bei $\lambda = 495 \text{ nm}$ (blau) und die des Proteins bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ (schwarz).

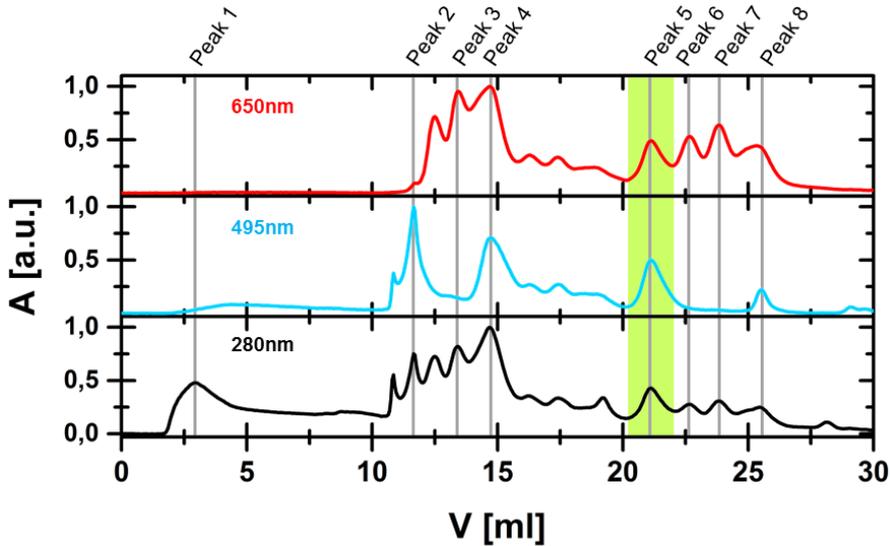


Abbildung 4.11: Trennung markierter yPGK-Spezies mit Ionenaustauschchromatographie.

Während der Elution wurde die Absorption der beiden Farbstoffe (Akzeptor, rot und Donor, blau) und des Proteins (schwarz) aufgenommen. Das Elutionsprofil zeigt acht auffällige Peaks, von denen Peak 4 und 5 das für Donor-Akzeptor-markierte yPGK zu erwartende Protein:Donor:Akzeptor-Verhältnis von 1:1:1 annähernd aufweisen (s. auch Abbildung 4.12 und Tabelle 4.8). In FRET-Experimenten wurde gezeigt, dass nur Peak 5 (grün hinterlegt) die gewünschte doppelt markierte Probe enthält.

Das Elutionsprofil zeigt, wie aufgrund der Probenkomplexität zu erwarten, eine Vielzahl von Peaks, von denen die acht wesentlichen Proteinfractionen im Folgenden näher beschrieben werden und in Abbildung 4.11 markiert sind. Von den Fraktionen dieser Peaks wurden die Absorptionsspektren gemessen und die jeweiligen Protein- und Farbstoffkonzentrationen bestimmt. Die Konzentrationsverhältnisse lassen Rückschlüsse auf die Proteinspezies zu, so ist beispielsweise für die gewünschte Donor-Akzeptor-markierte yPGK ein Verhältnis Akzeptor:Donor:Protein = 1:1:1 zu erwarten.

Zunächst wird unmarkiertes Protein eluiert (Peak 1). Es folgen Fraktionen, die nur mit Donor (Peak 2) oder nur mit Akzeptor (Peak 3) markiert sind. Anschließend werden

4.6 Fluoreszenzmarkierung der yPGK für Einzelmolekül-FRET-Studien

zwei Proteinfractionen angereichert, die sowohl Donor- als auch Akzeptorabsorption zeigen (Peak 4 und 5). Diese kommen als die gewünschten Spezies in Frage und wurden weiteren Tests unterzogen (siehe unten). Spätere Fraktionen enthalten doppelt Akzeptor markiertes Protein (Peak 6), oder gelabelte Oligomere (Peak 7 und 8).

Die Absorptionsspektren für Peak 4 und 5 sind in Abbildung 4.12 dargestellt und zunächst nicht unterscheidbar. Die Wellenlängen der Elutionsprofile aus Abbildung 4.11 sind ebenfalls eingezeichnet. In beiden Fällen ergibt sich in etwa das gewünschte Konzentrationsverhältnis von 1:1:1 (Tabelle 4.8). Erst mit FRET-Experimenten unter nativen Bedingungen konnte validiert werden, dass Peak 5 die gewünschte Probe enthält (grün hinterlegt in Abbildung 4.11). In Peak 4 konnte dagegen kein FRET beobachtet werden.

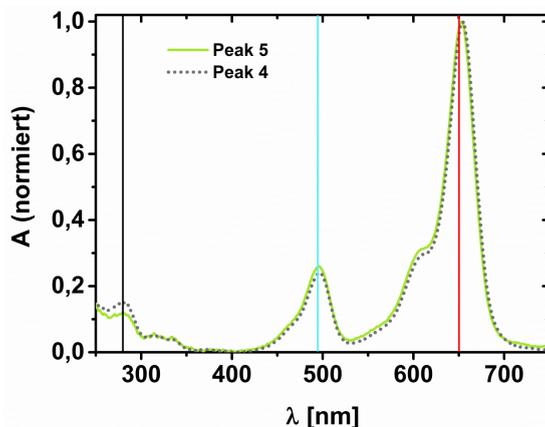


Abbildung 4.12: Absorptionsspektren der fluoreszenzmarkierten yPGK-Fractionen aus Peak 4 (grau gepunktet) und Peak 5 (grün) des Elutionsprofils der IEX.

Die Wellenlängen, bei denen die Elutionsprofile aufgenommen wurden ($\lambda=280\text{nm}$, schwarz; $\lambda=495\text{nm}$, blau und $\lambda=650\text{nm}$, rot) werden von senkrechten Linien repräsentiert. Die normierten Spektren stimmen weitgehend überein und zeigen annähernd dasselbe Protein-Donor-Akzeptor-Verhältnis.

Tabelle 4.8: Effizienz der Fluoreszenzmarkierung der yPGK für FRET-Studien.

	C_{Akzeptor}	C_{Donor}	C_{yPGK}	Akzeptor:Donor:yPGK
Peak 4	510 nM	425 nM	520 nM	1 : 0,8 : 1
Peak 5	230 nM	210 nM	160 nM	1 : 0,9 : 0,7

4.7 Diffusionseigenschaften der fluoreszenzmarkierten yPGK-Varianten

Nachdem die yPGK-Varianten mit Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert und die Donor-Akzeptor-markierten Fraktionen mittels Ionenaustauschchromatographie isoliert wurden, muss sichergestellt werden, dass die Struktur der Varianten während des *Labelling*-Prozesses und trotz der Kopplung der Farbstoffe erhalten geblieben ist. Die Integrität der Struktur und die Eignung der Cysteinvarianten für anschließende FRET-Entfaltungstudien wurden zunächst mit Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) und anschließend mit Einzelmolekül-FRET unter nativen Bedingungen untersucht.¹

Mit FCS wurde der Diffusionskoeffizient D der Spezies in den entsprechenden Proben bestimmt. Der Diffusionskoeffizient der fluoreszierenden Moleküle gibt Aufschluss darüber, ob die Probe nach der Reinigung weitgehend frei von ungebundenem Farbstoff ist und über den Status der Oligomerisierung/Aggregatbildung. Freie Farbstoffmoleküle diffundieren aufgrund ihrer geringeren Größe schneller und führen zu deutlich größeren Diffusionskoeffizienten. Die Bildung von Oligomeren und Aggregaten hätte den gegenteiligen Effekt einer Verringerung des Diffusionskoeffizienten.

Abbildung 4.13 zeigt die Autokorrelationskurven der markierten yPGK-Varianten aus FCS-Messungen. Die Daten wurden mit einem Modell (*FCS triplet*, Kapitel 3.3.3) gefittet, das die Diffusion der fluoreszierenden Moleküle und zusätzlich Triplet-Zustände berücksichtigt (exemplarisch dargestellt für die N-Domänen-Mutante in Abbildung 4.13, links). Anhand der Residuen wird deutlich, dass dieses Modell die Diffusion der yPGK gut beschreibt.

Die Autokorrelationskurven der Cysteinvarianten gleichen sich weitgehend (Abbildung 4.13, rechts). Die berechneten Diffusionskoeffizienten liegen im Bereich des für yPGK zu erwartenden Wertes von ca. $68 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Gabba, 2014). Über die Stokes-Einstein-Beziehung (Kapitel 3.3.2, Formel 3.12) wurden die hydrodynamischen Radien der markierten yPGK-Varianten berechnet und mit den DLS-Ergebnissen der unmarkierten Cysteinvarianten und des Wildtyps verglichen (Tabelle 4.9).

¹ Alle FCS- und FRET-Messungen sowie die Datenanalysen wurden von Dr. Michele Cerminara (ICS-5, Forschungszentrum Jülich GmbH) durchgeführt.

4.7 Diffusionseigenschaften der fluoreszenzmarkierten yPGK-Varianten

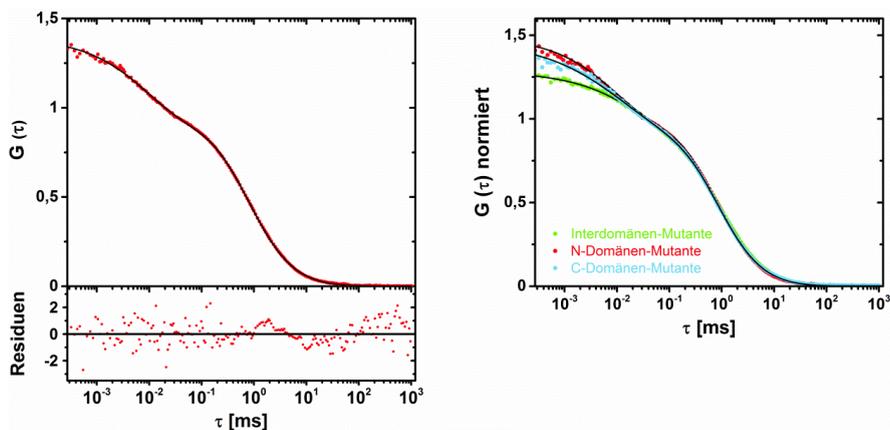


Abbildung 4.13: FCS-Autokorrelationskurven der yPGK-Varianten.

Zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten D wurden die Daten mit einem Modell gefittet, das die Diffusion der fluoreszierenden Moleküle im Fokus und zusätzlich Triplet-Zustände berücksichtigt (links). Die Autokorrelationskurven der yPGK-Varianten gleichen sich weitgehend (rechts). Die daraus berechneten Diffusionskoeffizienten liegen im Bereich des für yPGK zu erwartenden Wertes (s. Tabelle 4.9)

Tabelle 4.9: Diffusionskoeffizienten und hydrodynamische Radien der yPGK-Varianten.

PGK Variante	D (T = 20 °C)		R _h (T = 20 °C)
	FCS	FCS	DLS
Wildtyp	---	---	3,4 nm
Interdomänen-Mutante	69 μm ² s ⁻¹	3,1 nm	3,1 nm
N-Domänen-Mutante	72 μm ² s ⁻¹	3,0 nm	3,1 nm
C-Domänen-Mutante	69 μm ² s ⁻¹	3,2 nm	3,1 nm

Der Vergleich der mit DLS bzw. FCS untersuchten hydrodynamischen Radien zeigt, dass die Kopplung der Farbstoffe keine drastischen Strukturveränderungen des Proteins verursacht. Außerdem sind die Proben weitgehend frei von ungebundenem Farbstoff und Oligomeren/Aggregaten.

Mit FCS wurde außerdem die durchschnittliche Anzahl N der fluoreszierenden Moleküle im Fokus bestimmt. Aus N lässt sich der Verdünnungsfaktor abschätzen, der nötig ist, um in FRET-Experimenten Einzelmoleküle zu beobachten.

4.8 Farbstoffabstände unter nativen Bedingungen

Das finale Kriterium, um die Qualität der Probe bzw. deren Eignung für Entfaltungstudien zu beurteilen, ist die Energieübertragungseffizienz E aus Einzelmolekül-FRET-Messungen unter nativen Bedingungen (FRET-Puffer: 50 mM MOPS/50 mM NaCl, pH 7,5). Aus den FRET-Effizienzen lassen sich Farbstoffabstände berechnen, die wiederum mit den C_{α} -Abständen der zur Markierung verwendeten Cysteine aus der Kristallstruktur der yPGK verglichen wurden. Die Farbstoffe sind über einen Kohlenstofflinker mit dem Fluorophor verbunden: der Fluorophor hat einen gewissen Abstand zur Kopplungsposition und kann sich daher, abhängig von der lokalen Struktur des Proteins, in einem relativ großen Raum aufhalten (*accessible volume* AV) (Kalinin et al., 2012). Um die Verteilung der möglichen Farbstoffabstände unter Berücksichtigung der Kohlenstofflinker abzuschätzen, wurde ein Modell, basierend auf der Geometrie der entsprechenden Farbstoffe, die als FRET-Paar gewählt wurden und der Struktur der yPGK-Mutanten angewandt (Kalinin et al., 2012). Dabei wird der Fluorophor als Ellipsoid und der Alkyl-Linker als flexibler Zylinder zwischen dem zentralen Punkt des Fluorophors und dem Biomolekül angenommen (Sindbert et al., 2011, Höfig et al., 2014). Die Parameter zur Berechnung der AV für das in dieser Arbeit verwendete FRET-Paar Alexa488mal und Alexa647mal sind in Tabelle 4.10 angegeben (Linkerlänge l , -breite w , Ellipsoidradien Fluorophor $R_{1,3}$).

Tabelle 4.10: Parameter zur Berechnung der AV.

	Linkerparameter		Fluorophorparameter		
	l	w	R_1	R_2	R_3
Alexa Fluor 488 C5 Maleimid*	16,4 Å	4,5 Å	5,2 Å	4,2 Å	1,5 Å
Alexa Fluor 647 C2 Maleimid*	18,7 Å	4,5 Å	9,9 Å	7,7 Å	1,5 Å

* $R_0 = 52 \text{ Å}$ für das angegebene Farbstoffpaar (Sindbert et al., 2011)

Der entsprechende Algorithmus ermittelt den Raum, den der Farbstoff aufgrund der Linkerlänge einnehmen kann, ohne sterische Probleme mit der Proteinoberfläche zu verursachen.

4.8 Farbstoffabstände unter nativen Bedingungen

Die Bestimmung von E aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor $F_{D/A}$ erfolgte wie in Kapitel 3.3.3 (Formeln 3.22-3.24) beschrieben. Zur Berechnung des Korrekturfaktors γ ist es notwendig, die Quantenausbeuten des an das Protein gebundenen Donors und Akzeptors $\Phi_{D/A}$ zu bestimmen. Dies erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden basierend auf der Helligkeit (*molecular brightness*, MB) bzw. der Lebenszeit τ der an die entsprechenden yPGK-Einzelmutanten gebundenen Donor- oder Akzeptor-Farbstoffe (Kempe et al., 2015). Die Werte aus beiden Messungen weichen nicht erheblich voneinander ab (Tabelle 4.11). Ihr Mittelwert wurde verwendet um $\langle E \rangle$ zu berechnen. Außerdem wurde das Verhältnis der Detektionseffizienzen für Akzeptor und Donor g_A/g_D bestimmt (Tabelle 4.12). Sie hängen von der Justierung der konfokalen Lochblende ab und wurden deshalb für jede Messung bestimmt.

Tabelle 4.11: Quantenausbeuten des Donors und Akzeptors in Abhängigkeit ihrer Kopplungsposition in der yPGK-Sequenz, bestimmt anhand ihrer *molecular brightness* (Φ^{MB}) und ihrer Lebenszeit (Φ^τ).

Mutante	Quantenausbeuten			
	Φ_{Donor}^{MB}	Φ_{Donor}^τ	$\Phi_{Akzeptor}^{MB}$	$\Phi_{Akzeptor}^\tau$
PGK S1C	---	0,85	---	0,57
PGK Q135C	0,83	0,84	0,49	0,47
PGK T202C	0,74	0,78	0,46	0,44
PGK D256C	0,76	0,78	0,52	0,47
PGK S290C	0,77	0,81	0,67	0,60

Tabelle 4.12: Parameter zur Bestimmung des Korrekturfaktors γ .

Mutante	$\langle \Phi_D \rangle$	$\langle \Phi_A \rangle$	$\frac{\langle \Phi_A \rangle}{\langle \Phi_D \rangle}$	$\frac{g_A}{g_D}$	γ
Interdomänen-Mutante	0,81	0,54	0,67	1,040	0,70
N-Domänen-Mutante	0,84	0,53	0,63	1,039	0,66
C-Domänen-Mutante	0,77	0,47	0,61	1,075	0,66

Abbildung 4.14 zeigt die AV (links) des Donors (blau) und Akzeptors (rot) an den Cysteinvarianten der yPGK und die Verteilungen der FRET-Effizienzen (rechts) für die Interdomänenmutante (grün), die N-Domänenmutante (rot) und die C-Domänenmutante (blau). Die Verteilungen wurden mit einer Gauß-Funktion gefittet (Kapitel 3.3.3, Formel 3.37), um die mittleren FRET-Effizienzen $\langle E \rangle$ zu bestimmen.

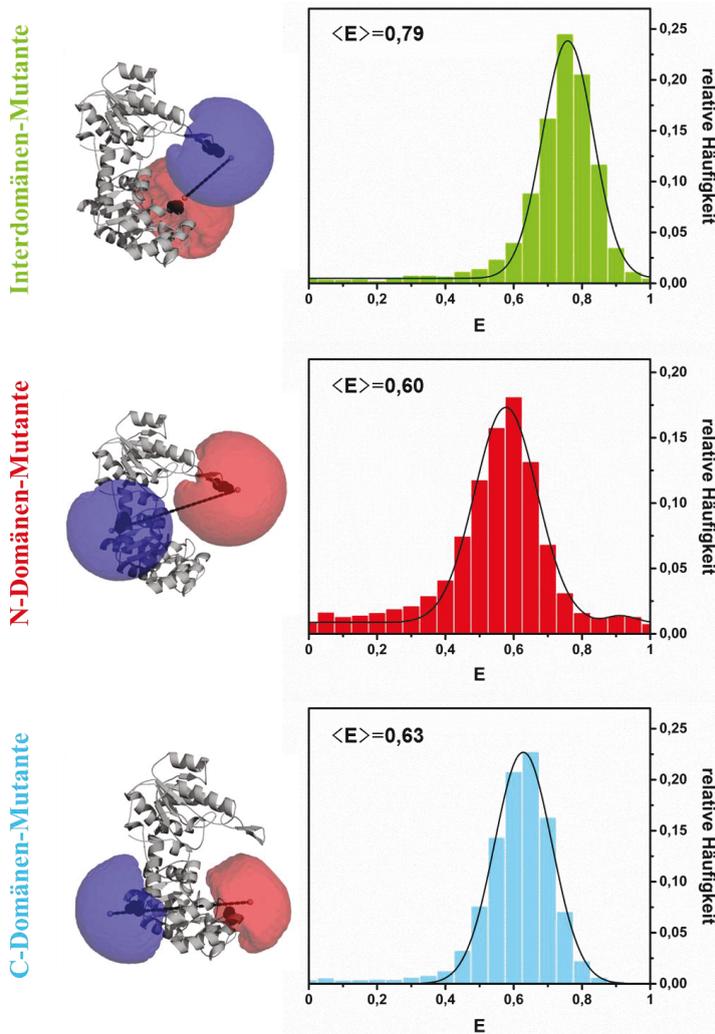


Abbildung 4.14: AV und FRET-Effizienz-Histogramme zur Berechnung der Farbstoffabstände innerhalb der yPGK-Varianten unter nativen Bedingungen.

Links: Kristallstrukturen der yPGK-Mutanten (PDB: 1QPG) mit den AV des FRET-Paares Alexa Fluor 488 (Donor, blau) und Alexa Fluor 647 (Akzeptor, rot). Die Cysteine, die als Kopplungspositionen der Farbstoffe gewählt wurden, sind schwarz hervorgehoben.

Rechts: Verteilungen der FRET-Effizienzen, aus Einzelmolekül-FRET-Messungen unter nativen Bedingungen. Die Daten wurden mit einer Gauß-Funktion gefittet (schwarze Linie), um die mittleren FRET-Effizienzen $\langle E \rangle$ zu bestimmen.

4.8 Farbstoffabstände unter nativen Bedingungen

Aus $\langle E \rangle$ wurden anschließend die Farbstoffabstände berechnet. Im Fall der Interdomänenmutante stimmen die gemessenen Farbstoffabstände (mit einer Differenz von lediglich 2 Å) sehr gut mit den Abständen der C_α -Atome der Cysteine überein. Bei den Intradomänenmutanten ergeben sich weit größere Diskrepanzen. Die Abweichungen zwischen gemessenen und aus der Kristallstruktur bestimmten Abständen betragen für die N-Domänenmutante 11 Å, für die C-Domänenmutante 16 Å (Tabelle 4.13).

Tabelle 4.13: Farbstoffabstände $R_{D/A}$ unter nativen Bedingungen berechnet anhand der Kristallstruktur $R_{D/A}^{C\alpha}$, der AV-Kalkulationen $R_{D/A}^{AV}$ und den FRET-Effizienzen $R_{D/A}^{FRET}$.

PGK Variante	Farbstoffabstände $R_{D/A}$		
	$R_{D/A}^{C\alpha}$	$R_{D/A}^{AV}$	$R_{D/A}^{FRET}$
Interdomänen-Mutante	39 Å	47 Å	41 Å
N-Domänen-Mutante	37 Å	51 Å	48 Å
C-Domänen-Mutante	33 Å	51 Å	49 Å

Die theoretischen Vorhersagen aus den AV-Kalkulationen stimmen für alle drei Cysteinmutanten mit den experimentell bestimmten Farbstoffabständen überein (Tabelle 4.13). Sie wurden deshalb für Studien über die Entfaltung des Enzyms (Interdomänenmutante) und seiner Domänen (N- und C-Domänenmutanten) im Kontext des *full-length* Proteins akzeptiert. Die Ergebnisse zeigen, dass AV-Kalkulationen eine zuverlässigere Abschätzung der Farbstoffabstände bieten als die Berechnung anhand der C_α -Atome der Cysteine in der Kristallstruktur.

4.9 Equilibrium-Entfaltungstudien an der yPGK

Mit Hilfe des in den vorangehenden Kapiteln beschriebenen Qualitätstests konnte ein System aus drei fluoreszenzmarkierten yPGK-Varianten etabliert werden, um in Einzelmolekül-FRET-Studien die Entfaltung der yPGK und ihrer Domänen zu untersuchen. Einzelmolekültechniken können die Identifizierung von Subpopulationen und Entfaltungsintermediaten ermöglichen, die in Ensemblemessungen ausgemittelt werden. Die Entfaltung wurde chemisch durch Inkubation des Proteins mit verschiedenen Konzentrationen des denaturierend wirkenden Salzes GndHCl begünstigt, um verschiedene Gleichgewichtszustände zwischen gefalteten, entfalteten und intermediären Strukturen untersuchen zu können. Die Stabilität der unmarkierten yPGK-Varianten und des Wildtyps wurde zuvor in Ensemble-Studien mit CD-Spektroskopie bestimmt. So lässt sich beobachten, inwieweit sich die Sekundärstrukturen (hier die α -Helices) in Abhängigkeit der GndHCl-Konzentration auflösen.

4.9.1 CD-Studien zur Entfaltung der yPGK-Varianten

Für die Entfaltungsstudien mit CD-Spektroskopie wurden die yPGK-Varianten auf eine Konzentration von $C_{yPGK} = 3\mu\text{M}$ in CD-Puffer (10mM MOPS, pH 7,5) mit verschiedenen Konzentrationen GndHCl ($C_{\text{GndHCl}} = 0\text{-}4\text{ M}$) verdünnt und für mindestens 1h (bei geringen GndHCl-Konzentrationen über Nacht) inkubiert, bis sich das Gleichgewicht zwischen gefalteten und entfalteten Proteinen einstellt. Für jede Variante wurden CD-Spektren unter den verschiedenen denaturierenden Bedingungen aufgenommen und für die jeweilige Proteinkonzentration und die Anzahl Residuen (Aminosäuren) korrigiert ($[\theta]_{\text{MRW}}$, Abbildung 4.15, links). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die α -Helices mit steigender GndHCl-Konzentration kontinuierlich auflösen. Die Signale bei $\lambda = 222\text{ nm}$, ein Maß für den Gehalt der α -Helices, wurde als Funktion der GndHCl-Konzentration aufgetragen (Abbildung 4.15, rechts).

4.9 Equilibrium-Unfolding studies of yPGK

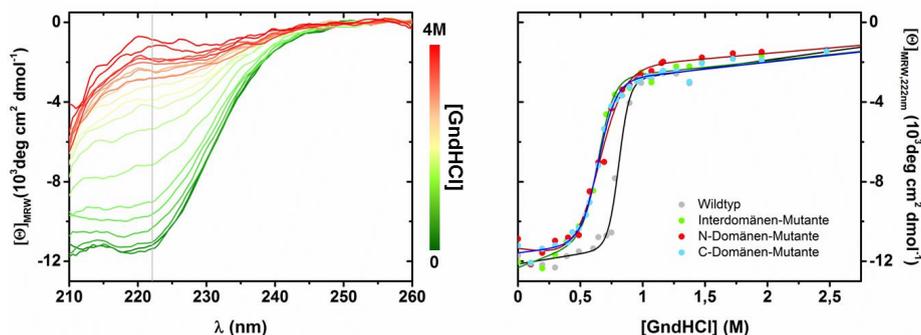


Abbildung 4.15: Entfaltungsstudien an den yPGK-Varianten mit CD-Spektroskopie.

Links: CD-Spektren, exemplarisch dargestellt für die C-Domänenmutante, bei verschiedenen GndHCl-Konzentrationen (0–4 M). Die α -Helices lösen sich mit zunehmender Konzentration des Denaturierungsmittels kontinuierlich auf.

Rechts: Die Signale bei $\lambda = 222\text{nm}$ wurden als Funktion der GndHCl-Konzentration aufgetragen. Die Entfaltungskurven der Cysteinmutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine leicht reduzierte Stabilität gegenüber GndHCl. Die Übergänge vom gefalteten zum entfalteten Zustand aller yPGK-Varianten finden zwischen 0,5 M und 1 M GndHCl statt. Die Daten wurden mit dem thermodynamischen Zwei-Zustandsmodell gefittet, um die GndHCl-Halbkonzentrationen zu bestimmen (Tabelle 4.14).

Die daraus resultierenden Entfaltungskurven der yPGK-Varianten wurden mit einem Zwei-Zustandsmodell zur Bestimmung thermodynamischer Parameter der Entfaltung globulärer Proteine gefittet (Kapitel 3.3.1, Formel 3.6). Auf diese Weise wurde, als Maß für die Stabilität der yPGK-Varianten gegenüber dem Denaturierungsmittel, die GndHCl-Halbkonzentration ($C_{1/2, \text{GndHCl}}$), d.h., die Konzentration, bei der die Hälfte der Proteine im Ensemble bereits entfaltet vorliegen, berechnet (Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14: Stabilität der yPGK-Varianten gegenüber GndHCl.

yPGK-Variante	$C_{1/2, \text{GndHCl}}$
Wildtyp	0,81 M
Interdomänen-Mutante	0,65 M
N-Domänen-Mutante	0,65 M
C-Domänen-Mutante	0,64 M

Die Stabilität der Cystein-Mutanten gegenüber GndHCl ist vergleichbar, vermutlich als Folge der Mutagenese jedoch leicht reduziert gegenüber dem Wert des Wildtyps.

4.10 Einzelmolekül-FRET-Studien zur Entfaltung der yPGK

Für Entfaltungsstudien mit Einzelmolekül-FRET wurden die Proben fluoreszenzmarkierter yPGK-Varianten für mindestens eine Stunde in FRET-Puffer (50 mM MOPS, pH 7,5; 50 mM NaCl) mit verschiedenen Konzentrationen GndHCl equilibriert. Die Messungen und Datenanalysen wurden, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, durchgeführt.

4.10.1 Entfaltung der Interdomänenmutante PGK Q135C S290C

Die Interdomänenmutante trägt ein Fluorophor (Donor o. Akzeptor) in jeder Domäne. So werden Abstandsänderungen zwischen den Domänen während der Entfaltung beobachtet, d.h., eine globale Betrachtung der Entfaltung des Proteins ist möglich.

Abbildung 4.16 (s. S. 100) zeigt die Verteilungen der FRET-Effizienzen bei verschiedenen GndHCl-Konzentrationen (0-0,9 M). Unter nativen Bedingungen ist eine Population bei $\langle E \rangle = 0,79$ präsent, die dem Ensemble nativ gefalteter yPGK entspricht. Bei 0,4 M GndHCl ist die Peakposition bereits leicht in Richtung geringerer FRET-Effizienz ($\langle E \rangle = 0,74$) verschoben und auch eine Verbreiterung der Verteilung ist erkennbar. Eine zweite Population bei $\langle E \rangle = 0,34$ erscheint bei GndHCl-Konzentrationen über 0,5 M. Sie repräsentiert die entfalteten Zustände der yPGK. Ihr Anteil wächst mit steigenden GndHCl-Konzentrationen kontinuierlich, während die gefaltete Population abnimmt. Ab 0,75 M GndHCl dominiert der entfaltete Zustand. Die Peakposition wird kontinuierlich in Richtung geringerer FRET-Effizienzen verschoben ($\langle E \rangle = 0,2$ bei $C_{\text{GndHCl}} = 0,9$ M). Bei diesen relativ hohen GndHCl-Konzentrationen liegt das Enzym vollständig entfaltet vor.

Die Analyse der Verteilungen der Donor-Lebenszeiten τ_D derselben Daten resultiert in einem ähnlichen Verhalten (Abbildung 4.17, s. S. 101) und unterstützt die fluoreszenzintensitäts-basierten Ergebnisse. Hier wird der gefaltete Zustand durch kürzere Lebenszeiten, der entfaltete Zustand durch längere Lebenszeiten des Donors repräsentiert. Unter nativen Bedingungen ist ein Peak bei $\langle \tau_D \rangle \sim 1,5$ ns sichtbar, dessen Amplitude mit steigender GndHCl-Konzentration abnimmt, während ab 0,5 M GndHCl ein zweiter Peak bei $\langle \tau_D \rangle \sim 3$ ns kontinuierlich zunimmt.

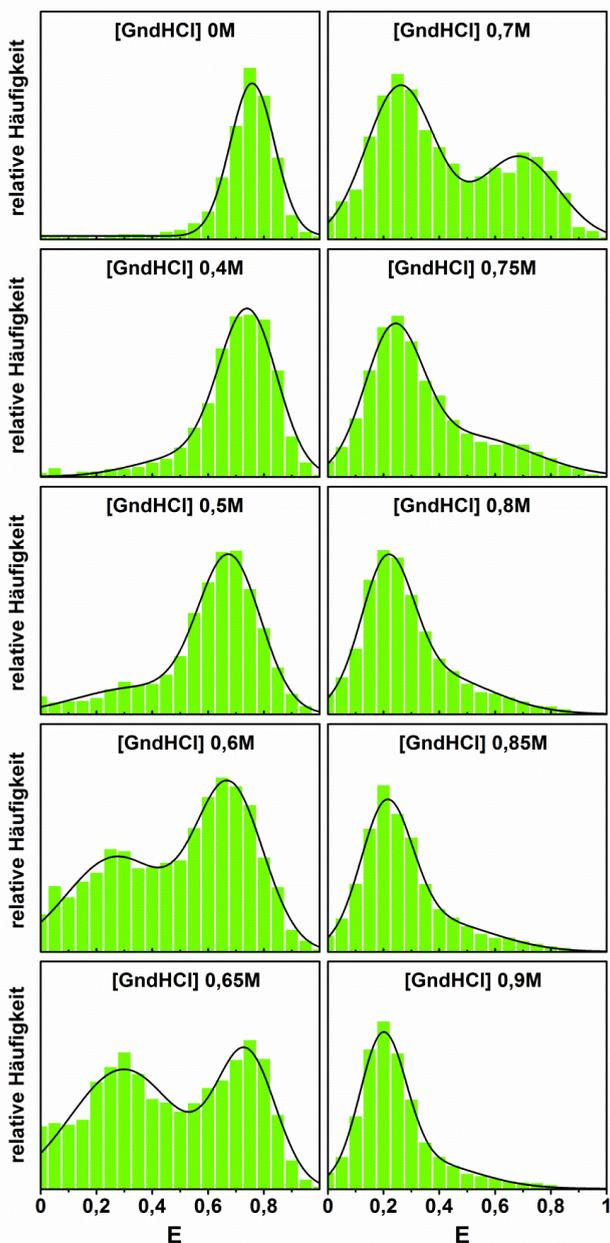


Abbildung 4.16: FRET-Effizienz-Histogramme der Interdomänenmutante bei verschiedenen GndHCl-Konzentrationen.

Die Daten wurden flächennormiert, das Binning beträgt $\Delta E = 0,05$ und die Skalierung der y-Achse wurde für jeden Datensatz angepasst. Bei den für die Entfaltung der yPGK kritischen GndHCl-Konzentrationen ($> 0,4$ M) sind zwei Populationen zu sehen, die den gefalteten (high FRET) bzw. entfalteten (low FRET) Zustand des Enzyms repräsentieren. Die Daten wurden mit zwei Gauß-Funktionen gefittet (schwarze Linie), um die mittleren FRET-Effizienzen $\langle E \rangle$ der jeweiligen Populationen zu bestimmen. Diese wurden verwendet, um die entsprechende Entfaltungskurve zu generieren (Abbildung 4.18)

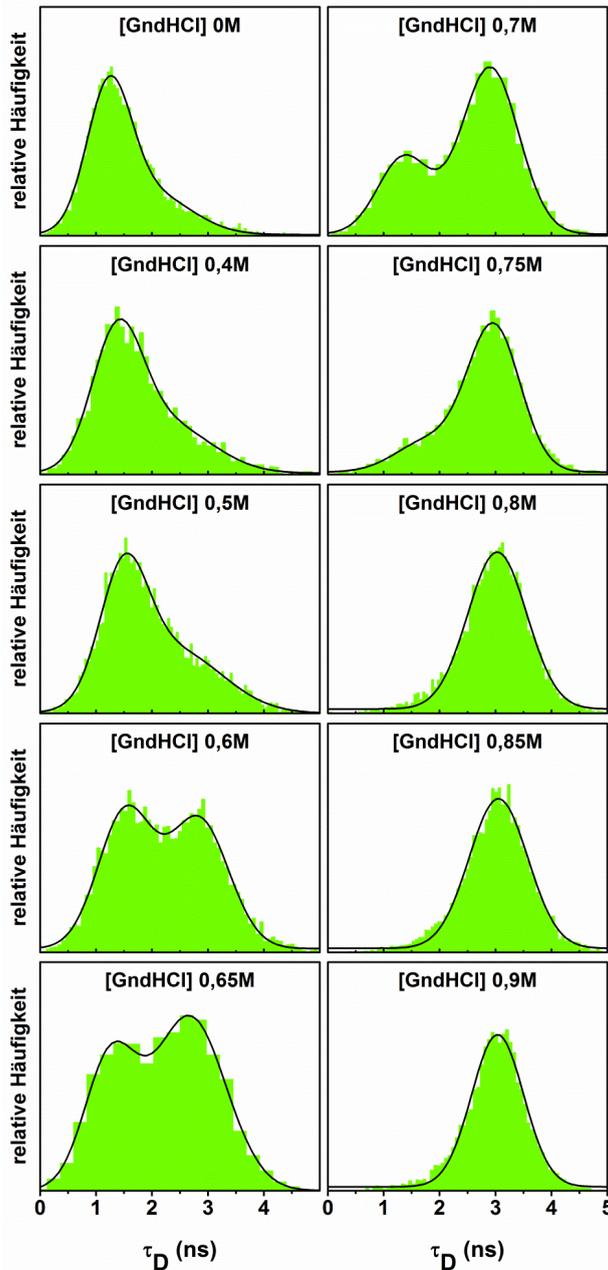


Abbildung 4.17: Häufigkeitsverteilungen der Donor-Lebenszeiten τ_D für die Interdomänenmutante. Die Daten wurden flächennormiert, das Binning wurde basierend auf der Statistik der Daten gewählt (Shimazaki und Shinomoto, 2007) und die Skalierung der y-Achse wurde jedem Datensatz angepasst. Die Verteilungen wurden mit zwei Gauß-Funktionen gefittet (schwarze Linie). Die Verteilungen der Donorlebenszeiten unterstützen die fluoreszenzintensitäts-basierten Daten (Abbildung 4.16). Bei den kritischen GndHCl-Konzentrationen ($>0,4$ M) existieren zwei Populationen. Der gefaltete Zustand wird hier durch kürzere Lebenszeiten, der entfaltete Zustand durch längere Lebenszeiten des Donors repräsentiert.

Das Verhalten der Interdomänenmutante bei chemischer Denaturierung mit GndHCl kann mit dem klassischen Zwei-Zustandsmodell erklärt werden. Dabei wird angenommen, dass ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen dem ungefalteten Zustand und dem gefalteten Zustand existiert, ohne dass Intermediate gebildet werden. Die Anteile der gefalteten und ungefalteten Populationen wurden als Funktion der GndHCl-Konzentration aufgetragen (Abbildung 4.18).

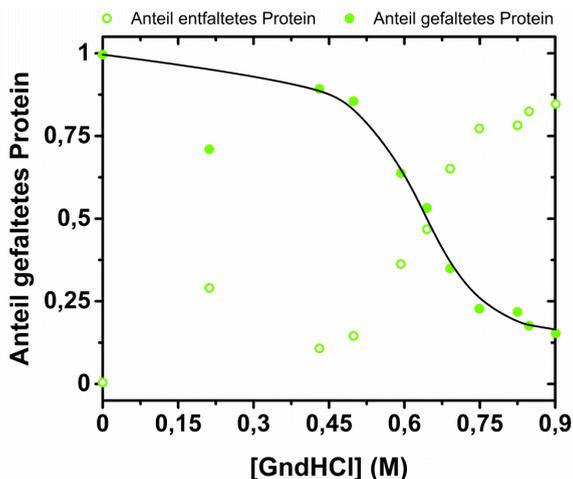


Abbildung 4.18: Entfaltungskurven der Interdomänenmutante.

Die Anteile gefalteter und ungefalteter yPGK wurden als Funktion der GndHCl-Konzentration aufgetragen. Durch Fitten der Daten mit dem klassischen Zwei-Zustandsmodell wurde eine GndHCl-Halbkonzentration von $C_{1/2} = 0,64$ M berechnet, die dem mit CD-Spektroskopie ermittelten Wert entspricht (s. Tabelle 4.14).

Die Entfaltungskurven verdeutlichen noch einmal, dass der Übergang vom gefalteten Zustand zum nicht gefalteten Zustand zwischen 0,4 M und 0,9 M GndHCl stattfindet. Die Abweichung vom allgemeinen Kurvenverlauf bei 0,2 M GndHCl ist vermutlich ein Salzeffekt, der durch die Erhöhung der Ionenstärke bei der Zugabe des geladenen Denaturierungsmittels zur Lösung verursacht wird und zunächst zu einer Kompaktierung des Proteins führt (Müller-Späth et al., 2010). Mittels Fit der Daten mit dem thermodynamischen Zwei-Zustandsmodell (Kapitel 3.3.1, Formel 3.6) wurde wiederum die GndHCl-Halbkonzentration berechnet. Für die Entfaltung der Interdomänen-Mutante ergibt sich $C_{1/2, \text{GndHCl}} = 0,64$ M. Dieser Wert entspricht der mittels CD-Studien ermittelten GndHCl-Halbkonzentration ($C_{1/2, \text{GndHCl}} = 0,65$ M).

Im Gegensatz zu der Interdomänenmutante, deren Entfaltung mit dem Zwei-Zustandsmodell erklärbar ist, zeigen die beiden Intradomänenmutanten andere Entfaltungsmuster.

4.10.2 Entfaltung der N-Domänenmutante PGK S1C Q135C

An der N-Domänenmutante können Änderungen der FRET-Effizienz, verursacht durch Abstandsänderungen innerhalb der N-terminalen Domäne der yPGK im Kontext des Gesamtproteins verfolgt werden (Abbildung 4.19, s. S. 104, 0-1,5 M GndHCl).

Die gefaltete Population zeigt unter nativen Bedingungen einen Peak bei $\langle E \rangle = 0,58$. Die Position dieses Peaks wird mit steigender GndHCl-Konzentration kontinuierlich in Richtung geringerer FRET-Effizienz verschoben.

Bei 0,5 M GndHCl wird ein zweiter Peak bei höherer FRET-Effizienz sichtbar ($\langle E \rangle = 0,75$; *high*-FRET-Peak). Dieser Peak nimmt zwischen 0,5 M und 0,7 M stetig zu während der *low*-FRET-Peak weiter in Richtung geringerer FRET-Effizienz verschoben wird ($\langle E \rangle = 0,35$ bei 0,7 M GndHCl). Seine Amplitude nimmt ab und eine Verbreiterung wird erkennbar. Ab 0,75 M GndHCl nimmt die zweite, kompakte Population wieder ab und die Population des entfalteten Zustands überwiegt. Bei 1 M GndHCl ist der *high*-FRET-Peak fast vollständig verschwunden und das Protein ist weitgehend entfaltet. Die Peak-Position wird dennoch weiter in Richtung geringer FRET-Effizienz verschoben ($\langle E \rangle = 0,17$ bei 1,5 M GndHCl), ein Phänomen, das in der Literatur als *coil-globule-transition* beschrieben wird (Sherman und Haran, 2006).

Es stellt sich nun die Frage, ob es sich bei der *high*-FRET-Population um ein kompaktes Intermediat auf dem Weg des Proteins zum entfalteten Zustand handelt.

Die Verteilungen der Donor-Lebenszeiten bei verschiedenen GndHCl-Konzentrationen geben keinen eindeutigen Hinweis darauf (Abbildung 4.20, s. S. 105). Unter nativen Bedingungen ergibt sich ein Peak bei geringer Lebenszeit ($\langle \tau_D \rangle \sim 1,9$ ns), der die gefaltete Population repräsentiert. Ab 0,55 M GndHCl wird eine zweite Population bei längerer Donor-Lebenszeit sichtbar ($\langle \tau_D \rangle = 3,5$ ns). Diese Population nimmt mit steigender GndHCl-Konzentration stetig zu, während die gefaltete Population kontinuierlich abnimmt, bis die N-Domäne bei 1 M GndHCl vollständig entfaltet vorliegt. Eine dritte kompakte Population, für die geringere Lebenszeiten erwartet werden, konnte jedoch nicht identifiziert werden.

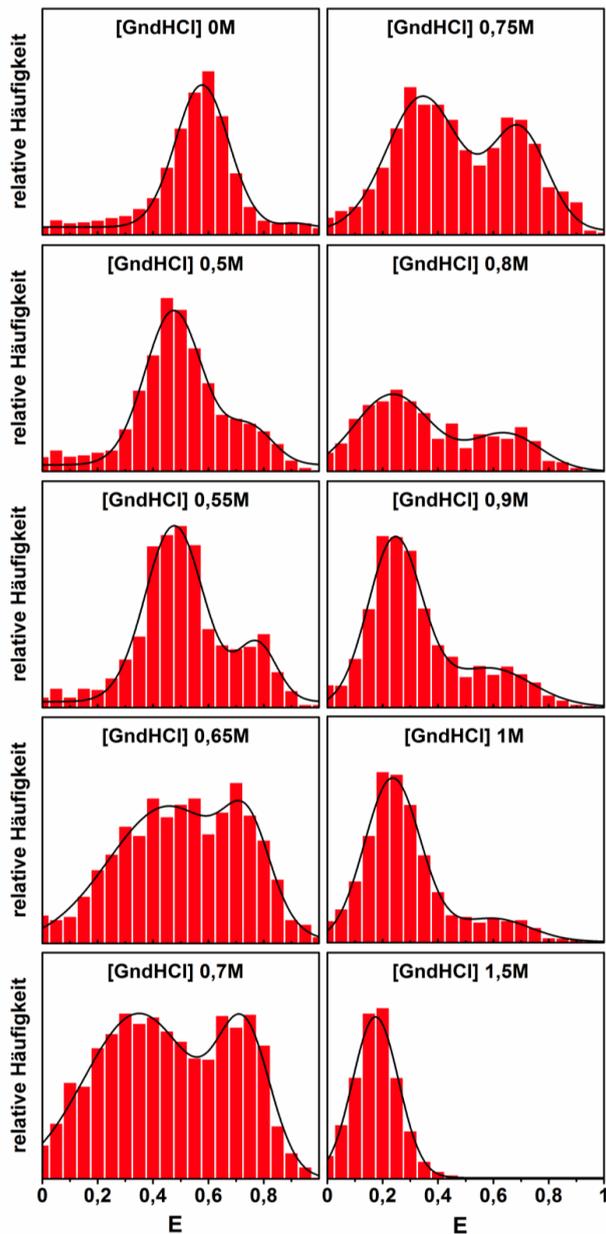


Abbildung 4.19: FRET-Effizienz-Histogramme der N-Domänenmutante bei verschiedenen GndHCl-Konzentrationen.

Die Daten wurden flächennormiert, das Binning beträgt $\Delta E = 0,05$ und die Skalierung der y-Achse wurde für jeden Datensatz angepasst. Die Verteilungen wurden mit zwei Gauß-Funktionen gefittet (schwarze Linie), um die mittleren FRET-Effizienzen $\langle E \rangle$ der auftretenden Populationen zu bestimmen. Zusätzlich zu der nativen ($\langle E \rangle = 0,58$; ohne Zusatz von GndHCl) und der entfalteten Population ($\langle E \rangle = 0,24$; bei 1 M GndHCl) wird eine dritte Population mit höherer FRET-Effizienz sichtbar, die auf eine höhere Kompaktheit der N-Domäne bei mittleren GndHCl-Konzentrationen (0,5-0,9 M) hindeutet.

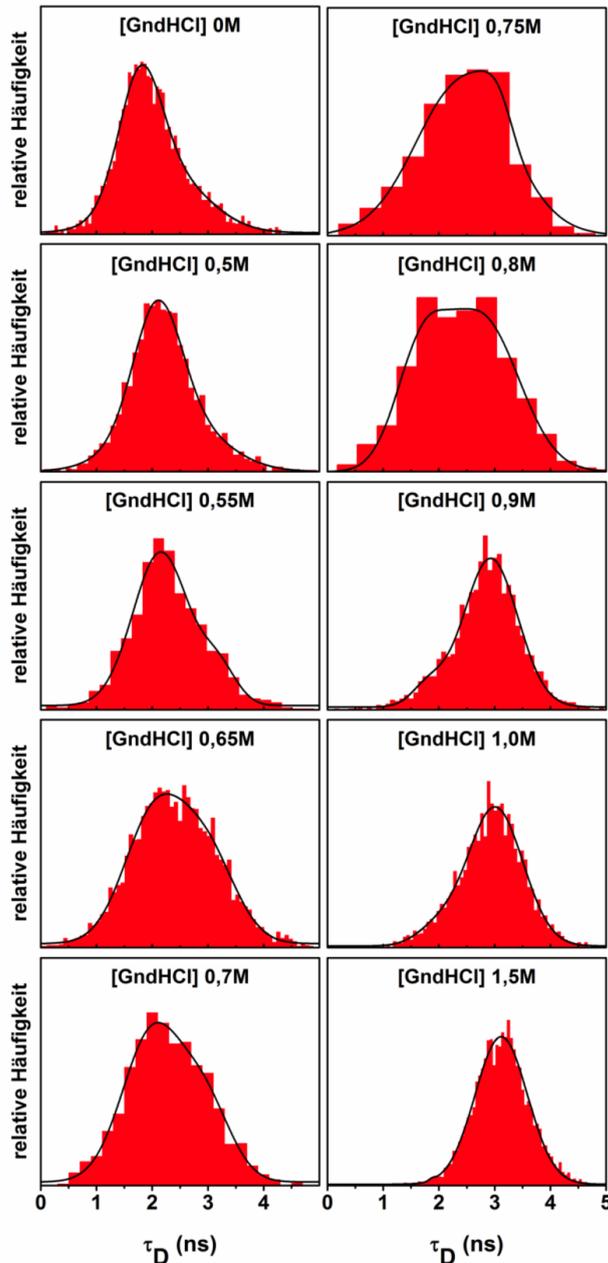


Abbildung 4.20: Häufigkeitsverteilungen der Donor-Lebenszeiten τ_D für die N-Domänenmutante.

Die Daten wurden flächennormiert, das Binning wurde basierend auf der Statistik der Daten gewählt (Shimazaki und Shinomoto, 2007) und die Skalierung der y-Achse wurde jedem Datensatz angepasst. Die Verteilungen wurden mit zwei Gauß-Funktionen gefittet (schwarze Linie). Die Verteilungen der Donor-Lebenszeiten bei den für die Entfaltungübergänge kritischen GndHCl-Konzentrationen zeigen zwei Populationen, die die gefaltete (kürzere Lebenszeit) und entfaltete (längere Lebenszeit) repräsentieren. Eine dritte, kompaktierte Population (wie in den entsprechenden FRET-Histogrammen in Abbildung 4.19) mit erwartungsgemäß geringerer Donor-Lebenszeit konnte nicht identifiziert werden.

4.10.3 Entfaltung der C-Domänenmutante PGK T202C D256C

Die C-Domänenmutante ist sensitiv gegenüber Abstandsänderungen innerhalb der C-terminalen Domäne der yPGK während der Entfaltung. Abbildung 4.22 (s. S. 108) zeigt die entsprechenden Verteilungen der FRET-Effizienzen bei verschiedenen GndHCl-Konzentrationen (0-4 M).

Zunächst ist auffällig, dass unter allen Bedingungen nur eine FRET-Population sichtbar ist. Im nativen Zustand liegt die Peak-Position bei $\langle E \rangle = 0,63$. Sie verändert sich nicht maßgeblich bis zu einer GndHCl-Konzentration von 1 M ($\langle E \rangle = 0,64$). Bei höheren GndHCl-Konzentrationen wird sie kontinuierlich in Richtung geringerer FRET-Effizienzen verschoben ($\langle E \rangle = 0,49$ bei 1,5 M GndHCl und $\langle E \rangle = 0,36$ bei 4 M GndHCl). Allerdings deuten Messungen der Tryptophanfluoreszenz² darauf hin, dass die Auflösung der Tertiärstrukturen innerhalb dieser Domäne (Abbildung 4.21) bei so hohen Konzentrationen des Denaturierungsmittels bereits (größtenteils) abgeschlossen ist. Beide Tryptophane (W308 und W333) der yPGK liegen in der C-Domäne und können deshalb als Reporter lokaler Strukturveränderungen während der Entfaltung dieser Domäne betrachtet werden.

² Messungen der Tryptophanfluoreszenz wurden von Julia Walter (I. Physikalisches Institut (IA), RWTH-Aachen) durchgeführt.

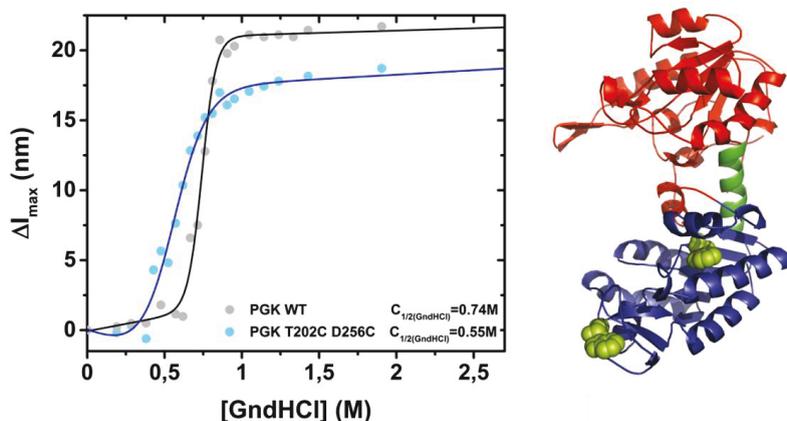


Abbildung 4.21: Entfaltungsstudien am Wildtyp und der C-Domänenmutante mit Tryptophan-Fluoreszenz.

Die Wellenlängenverschiebung der Intensitätsmaxima der Tryptophane ΔI wurde als Funktion der GndHCl-Konzentration aufgetragen (links). Die Kristallstruktur der yPGK (rechts) zeigt, dass beide Tryptophane (W308 und W333, grün) in der C-Domäne liegen. Sie können daher als Reporter für Strukturveränderungen während der Entfaltung innerhalb der C-Domäne betrachtet werden. Die Übergänge vom gefalteten zum entfalteten Zustand der C-Domäne finden zwischen 0,4 M und 1 M GndHCl statt. Die Daten wurden mit dem thermodynamischen Zwei-Zustandsmodell gefittet, um die GndHCl-Halbkonzentrationen zu bestimmen. Die Stabilität der C-Domäne der Cysteinmutante gegenüber GndHCl ist leicht reduziert im Vergleich zum Wildtyp.

Die entsprechenden Verteilungen der Donor-Lebenszeiten zeigen zunächst eine Population ($\langle \tau_D \rangle \sim 1,7$ ns), deren Position sich nicht verändert (Abbildung 4.23, s. S. 109). Bei einer GndHCl-Konzentration von 0,7 M, deutlich über der mit CD-Spektroskopie und Tryptophanfluoreszenz bestimmten GndHCl-Halbkonzentrationen, wird eine Schulter bei längeren Lebenszeiten ($\tau_D \sim 3$ ns) sichtbar, deren Amplitude mit steigender GndHCl-Konzentration zunimmt. Dies deutet darauf hin, dass eine zweite, vermutlich entfaltete, Population gebildet wird. Die Position des ersten Peaks wird in Richtung längerer Lebenszeiten verschoben und beide Verteilungen verschmelzen scheinbar bei 0,9 M GndHCl ($\langle \tau_D \rangle \sim 2,5$ ns). Die Peakposition wird mit steigenden GndHCl-Konzentrationen kontinuierlich weiter zu längeren Lebenszeiten verschoben. Die mittlere Donor-Lebenszeit bei 4 M GndHCl beträgt $\tau_D \sim 3$ ns.

4.10 Einzelmolekül-FRET-Studien zur Entfaltung der yPGK

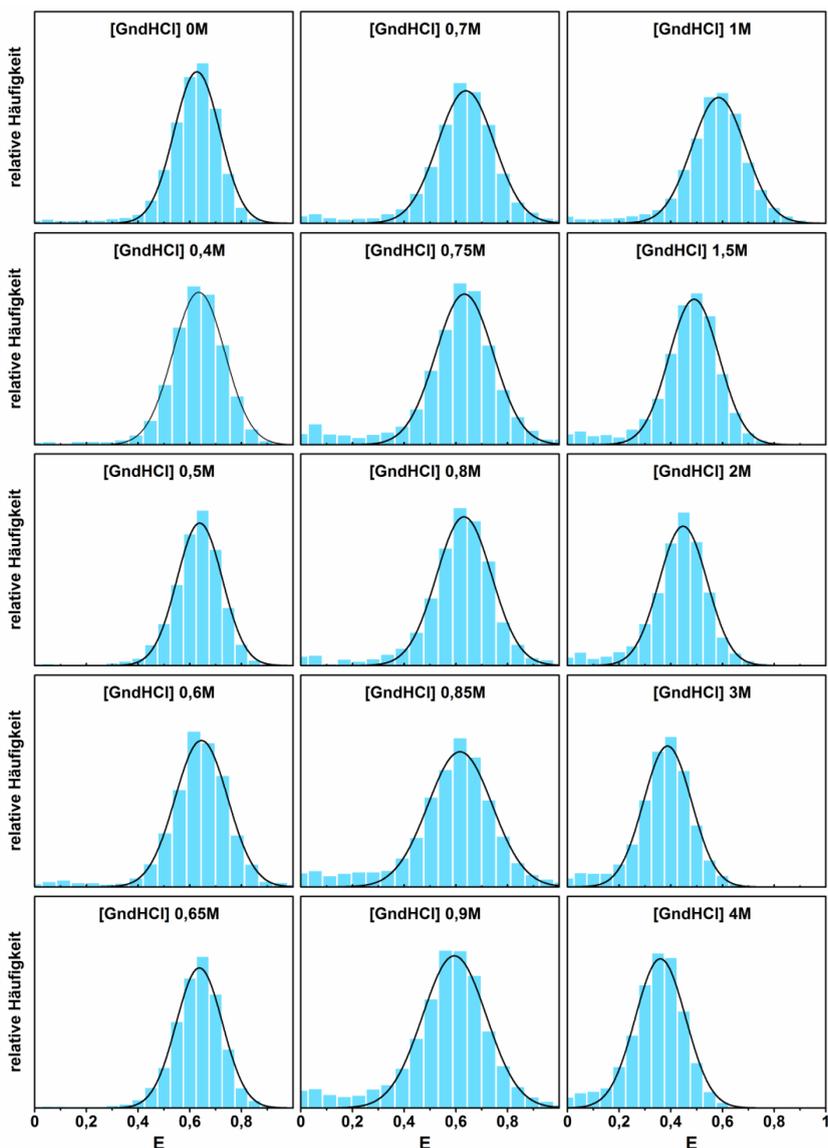


Abbildung 4.22: FRET-Effizienz-Histogramme der C-Domänenmutante bei verschiedenen GndHCl-Konzentrationen.

Die Daten wurden flächennormiert, das Binning beträgt $\Delta E = 0,05$ und die Skalierung der y-Achse wurde für jeden Datensatz angepasst. Die Verteilungen wurden mit einer Gauß-Funktion gefittet (schwarze Linie). Die Verteilungen der FRET-Effizienzen zeigen unter allen untersuchten denaturierenden Bedingungen nur eine erkennbare Population. Im nativen Zustand ist $\langle E \rangle = 0,63$. Die Peak-Position bleibt bis zu einer GndHCl-Konzentration von 1 M konstant. Der Abstand der Farbstoffe ändert sich nicht, was darauf hindeutet, dass die C-Domäne (lokal) kompakt bleibt. Bei höheren Konzentrationen des Denaturierungsmittels (1,5-4 M) wird sie kontinuierlich zu geringeren FRET-Effizienzen verschoben.

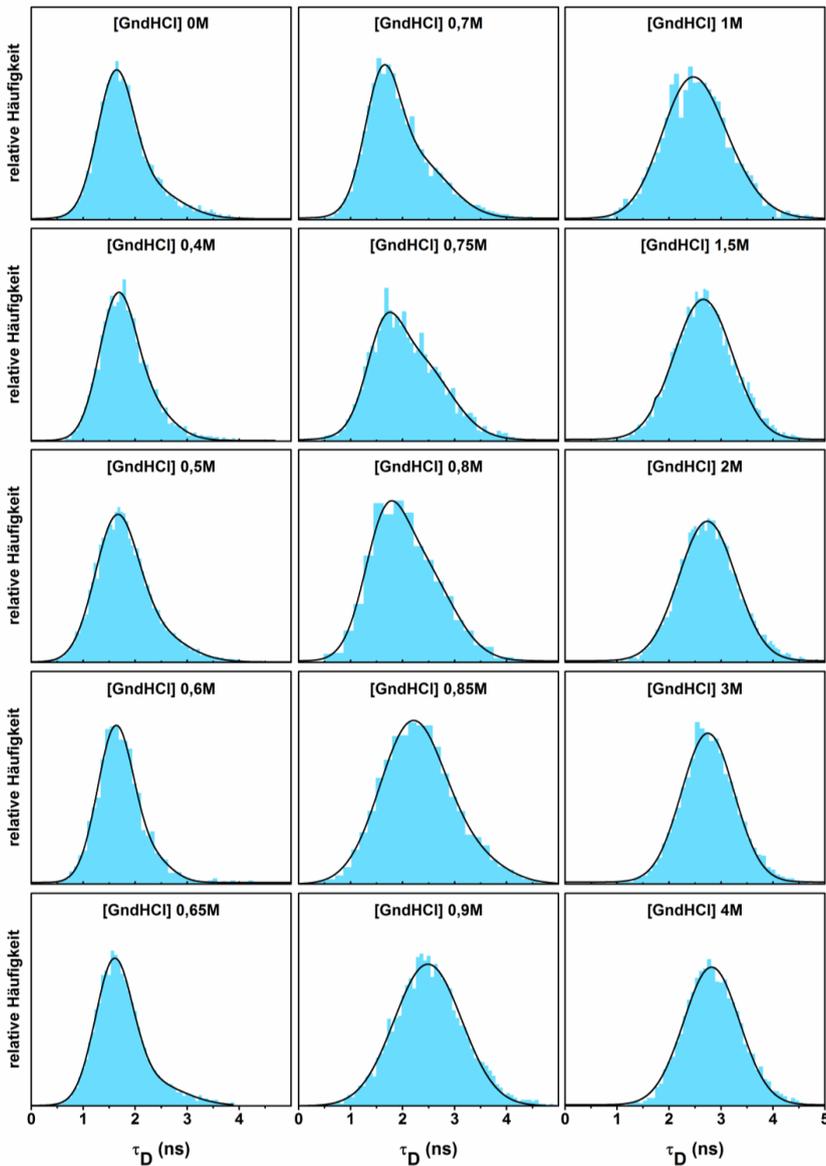


Abbildung 4.23: Häufigkeitsverteilungen der Donor-Lebenszeiten τ_D für die C-Domänenmutante. Die Daten wurden flächennormiert, das Binning wurde basierend auf der Statistik der Daten gewählt (Shimazaki und Shinomoto, 2007) und die Skalierung der y-Achse wurde jedem Datensatz angepasst. Die Verteilungen wurden mit zwei Gauß-Funktionen gefittet (schwarze Linie). Die Verteilungen der Donor-Lebenszeiten zeigen vorerst eine Population, deren Position sich zunächst nicht verändert. Bei GndHCl-Konzentrationen von 0,7-0,85 M wird (anders als in den Verteilungen der FRET-Effizienzen in Abbildung 4.22) eine Schulter bei längeren Lebenszeiten sichtbar, die auf eine zweite entfaltete Population hindeutet.

4.10 Einzelmolekül-FRET-Studien zur Entfaltung der yPGK

Abbildung 4.24 zeigt noch einmal den Verlauf der Entfaltung der C-Domäne anhand der Peakpositionen der Verteilungen der FRET-Effizienzen als Funktion der GndHCl-Konzentration. Insgesamt ergeben die Analysen der Einzelmolekül-Entfaltungsstudien anhand der gewählten Farbstoffpositionen in der C-Domäne, dass diese auch bei den kritischen GndHCl-Konzentrationen (0,5 – 0,9 M) kompakt vorliegt, was den Ergebnissen der Ensemble-Studien widerspricht.

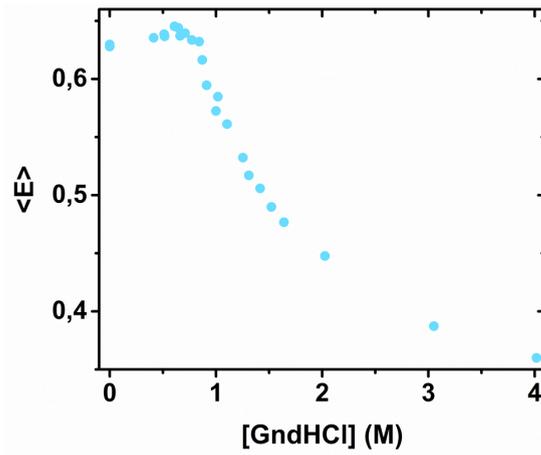


Abbildung 4.24: Entfaltungskurven der C-Domänenmutante.

Die mittleren FRET-Effizienzen $\langle E \rangle$ wurden als Funktion der GndHCl-Konzentrationen aufgetragen. Der Verlauf der Entfaltungskurve der C-Domäne zeigt, dass diese auch bei kritischen GndHCl-Konzentrationen (0,5-1 M) kompakt bleibt.

5 Diskussion und Ausblick

5.1 Mutagenese und Fluoreszenzmarkierung der yPGK

Für die in Kapitel 4.10 beschriebenen Einzelmolekül-FRET-Entfaltungsstudien wurden Cysteinvarianten der yPGK mit fluoreszierenden, maleimid-funktionalisierten Farbstoffen (Donor: Alexa Fluor 488 C5 Maleimid, Akzeptor: Alexa 647 C2 Maleimid) markiert. Maleimid reagiert unter günstigen pH-Bedingungen (pH 6,5-7,5) mit der Thiol (SH)-Gruppe von Cysteinen, wobei stabile Thioether-Verbindungen gebildet werden.

Um die Farbstoffe an spezifischen Positionen in der yPGK-Struktur koppeln zu können, müssen die dort lokalisierten Aminosäuren gegen Cysteine ausgetauscht werden. Dies erfolgte durch primerabhängige Mutagenese auf DNA-Ebene.

Die SH-Gruppe von Cysteinen ist hoch reaktiv. Durch Oxidation können kovalente Disulfidbrücken zwischen zwei Thiolen entstehen. Diese wirken oft stabilisierend, wenn sie innerhalb des Proteins ausgebildet werden (Stryer, 1995). Allerdings können intermolekulare Disulfidbrücken zur Bildung von Oligomeren führen. Das Risiko dafür ist bei den yPGK-Cysteinmutanten, die oberflächenexponierte Cysteine tragen, besonders hoch. Während der Proteinisolierung und -reinigung wurde dem mit dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) entgegengewirkt. Während der Kopplungsreaktion mit den Fluoreszenzfarbstoffen wurde hingegen Tris (2-carboxyethyl-) phosphin (TCEP) eingesetzt. DTT wurde zuvor aus den Proben entfernt, denn es kompetiert mit den Farbstoffen um die Kopplungsstelle³. TCEP enthält im Gegensatz zu DTT keine Thiole und kann während des *Labelling*-Prozesses anwesend sein.

Die Aminosäuresequenz der yPGK beinhaltet ein natürliches Cystein an Position 97. Dieses Cystein liegt an der Oberfläche der Struktur und ist zugänglich für die

³ <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/sulphydryl-reactive-crosslinker-chemistry.html>; 19.09.2016

5.1 Mutagenese und Fluoreszenzmarkierung der yPGK

Fluoreszenzfarbstoffe (Missiakas et al., 1990). Dieses Cystein wurde deshalb gegen Serin ausgetauscht. Serin ist dem Cystein hinsichtlich der Seitenkette und der Größe am ähnlichsten und kann sie, meist ohne Strukturveränderungen zu verursachen, ersetzen. Es ist bekannt, dass das Cystein der yPGK eine stabilisierende Wirkung hat (Missiakas et al., 1990, Yon et al., 1990). Cysteine stabilisieren hydrophobe Wechselwirkungen in höherem Maß als die polare Aminosäure Serin (Creighton, 1996). Die Substitution des natürlichen Cysteins der yPGK könnte daher eine Ursache für die reduzierte Stabilität der Cysteinvarianten gegenüber dem in dieser Arbeit verwendeten Denaturierungsmittels Guanidiniumhydrochlorid (GndHCl) sein. Dies kann durch weitere CD-Entfaltungsexperimente der yPGK-C97S-Variante untersucht werden.

Als Grundlage für die Auswahl potentieller Farbstoffpositionen dienten C_{α} -Abstände der Kristallstruktur (PDB: 1QPG) der PGK aus *Saccharomyces cerevisiae* mit der besten verfügbaren Auflösung von 2,4 Å. Dabei handelt es sich um eine Mutante mit einem Aminosäureaustausch (R65Q) in der basischen Tasche der N-Domäne, die die katalytische Aktivität des Enzyms beeinflusst, nicht aber die Tertiärstruktur (McPhillips et al., 1996).

Bei der Auswahl der *Labelling*-Positionen wurden verschiedene Kriterien beachtet. Zunächst gibt der FÖRSTER-Radius des Farbstoffpaares Alexa Fluor 488 (Donor) und Alexa Fluor 647 (Akzeptor), $R_0 = 52 \text{ \AA}$, einen gewissen Abstandsbereich ($0,5 \cdot R_0 < R_{D/A} < 1,5 \cdot R_0$) vor, der eingehalten werden muss, um Abstandsänderungen und damit einhergehend Änderungen der FRET-Effizienz während der Proteinfaltung detektieren zu können. Damit sind Abstände in der nativen Struktur zwischen $\sim 25 \text{ \AA}$ und $\sim 75 \text{ \AA}$ denkbar. Allerdings ist es günstiger, Abstände zu wählen, die dem FÖRSTER-Radius entsprechen, um Distanzverkleinerungen und -vergrößerungen beobachten zu können. Die Markierungspositionen müssen außerdem für die Farbstoffe zugänglich sein. Sie wurden deshalb so gewählt, dass sie möglichst in flexiblen unstrukturierten Bereichen (*loops*) exponiert zur Oberfläche des Proteins liegen. Mutationen konservierter Aminosäuren und der Aminosäuren, die in die Substratbindung involviert sind wurden vermieden. Die Serine an Position 1 und 290, sowie das Threonin an Position 202 konnten erfolgreich mit Cysteinen substituiert werden, ohne Struktur und Funktion maßgeblich zu beeinträchtigen. Die Seitenketten

des Serins und Threonins tragen eine polare Hydroxylgruppe. Beide Aminosäuren sind dem Cystein bezüglich ihrer Größe ähnlich. Auch die geladenen Aminosäuren Asparaginsäure D256 und Glutaminsäure Q135 ließen sich erfolgreich gegen Cystein austauschen. Die Cysteine an all diesen Positionen konnten mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden und die entsprechenden Doppelmutanten in Entfaltungsstudien untersucht werden.

Anders verhält es sich bei Austausch des Alanins A306 in der C-Domäne, das erhebliche Veränderungen der Sekundärstruktur in CD-Messungen zeigte (wie auch in früheren Arbeiten⁴). Ein Cystein anstelle des Lysins K244 konnte nicht mit Fluorophoren markiert werden. Es befindet sich innerhalb einer Helix der C-Domäne, also in einem strukturierten Bereich, und ist deshalb möglicherweise nicht zugänglich. Cystein-Substitutionen der Alanine A110 und A362, sowie des Isoleucins I304 konnten zwar erfolgreich exprimiert und gereinigt werden. Trotz ausreichender Funktionalität eigneten sie sich allerdings nicht für Entfaltungs-Studien mit FRET.

AV-Kalkulationen an der I304C S290C Variante ergaben, dass die Position 304 wahrscheinlich nicht zugänglich ist. Die berechneten Abstände für die markierten Varianten A110C Q135C und A362C S290C ergaben $R_{D/A}^{AV} = 59 \text{ \AA}$ und $R_{D/A}^{AV} = 23 \text{ \AA}$ und sollten damit im geeigneten Abstandsbereich liegen. Die Reinigung dieser Mutanten nach der Fluoreszenzmarkierung erfolgte jedoch noch mit einem schwachen Anionenaustausch-Material (DEAE-Sepharose), wie es in früheren Arbeiten standardmäßig verwendet wurde (Rosenkranz, 2011, Gabba, 2014). Die Trennschärfe der Ionenaustauschchromatographie wurde in dieser Arbeit optimiert, indem ein starker Anionenaustauscher (MonoQ) verwendet wurde. Durch Anwendung des optimierten Reinigungsprotokolls könnten die Donor/Akzeptor-markierten A110C Q135C und S290C A362C Mutanten vermutlich besser isoliert werden. FRET-Messungen können dann abschließend zeigen, ob sich diese zwei Varianten ebenfalls für Entfaltungsstudien eignen.

Der Vergleich der experimentell mit Einzelmolekül-FRET ermittelten Farbstoffabstände in nativen Bedingungen mit theoretischen AV-Kalkulationen zeigt, dass auf diese Art

⁴ Ilona Ritter (ICS-5, Forschungszentrum Jülich GmbH), persönliche Kommunikation

die Abstände besser voraussagt werden können als anhand der C_{α} -Abstände in der Kristallstruktur (vgl. Abweichungen von bis zu 16 Å für die C-Domänenmutante, Kapitel 4.8). Im Umkehrschluss bedeutet das, dass die AVs für das Design weiterer Markierungs-Positionen verwendet werden können und sollten, um weitere Referenzpositionen zu generieren. Die Berechnung der AVs beruht auf einem rein geometrischen Modell. Interaktionen der Farbstoffe untereinander und mit dem Protein oder die Bildung von Strukturelementen durch Wechselwirkungen von Aminosäureresten werden nicht berücksichtigt (Sindbert et al., 2011). Daher sollten die Ergebnisse mit der Kristallstruktur abgeglichen werden. Wenn die lokale Proteinstruktur um die Markierungs-Positionen und die Struktur des Farbstofflinkers sehr gut bekannt sind, dann können die Aufenthaltspositionen der Fluorophore mit Simulationen sehr viel genauer vorausgesagt werden (Sisamakris et al., 2010, Sindbert et al., 2011). Sie sind aber kompliziert, zeitaufwändig und sie brauchen sehr viel Rechenkapazität. Die Verwendung von AV-Berechnungen ist diesbezüglich ein sehr guter Kompromiss.

5.2 Reinigung der yPGK

Um die yPGK und ihre Varianten nach der Expression mit NiNTA-Affinitätschromatographie aus dem *E.coli*-Lysat zu reinigen, wurden sie mit einem 6x His-Tag markiert. His-Tags können, trotz ihrer geringen Größe, Einfluss auf Faltung und Struktur, die katalytische Aktivität, aber auch auf das Expressionslevel in *E.coli* und die Löslichkeit nehmen. Dabei kommt es besonders auf die Position des Tags an (meist am N- oder C-Terminus). N-terminale His-Tags haben i.d.R. einen positiven Effekt auf das Expressionslevel in *E.coli* (Hirel et al., 1989, Dalbøge et al., 1990, Block et al., 2009). Man geht davon aus, dass die Ursache dafür bereits auf mRNA-Ebene zu finden ist (Block et al., 2009). Sekundärstrukturen der mRNA (*hairpins*) beeinträchtigen oft die Bindung zwischen Ribosom und mRNA. Die das His-Tag kodierende Sequenz destabilisiert diese Strukturen und begünstigt die Translationsinitiation. C-terminale Tags erhöhen häufig die Löslichkeit des rekombinanten Proteins gegenüber dem Wildtyp. Sie bieten außerdem den Vorteil, dass nur vollständig synthetisierte Proteine gereinigt werden.

Der in dieser Arbeit und bereits in einer früheren Arbeit (Rosenkranz, 2011) als interner Standard verwendete Wildtyp trägt ein C-terminales His-Tag (Konstrukt: PGK WT His). Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Daten wurde dies beibehalten. C-terminal His-markierte Cysteinmutanten der yPGK konnten allerdings nur mit sehr geringer Ausbeute exprimiert werden (Ilona Ritter, persönliche Kommunikation). Diese konnten durch Expression aus dem Vektor pET15b deutlich erhöht werden. pET15b kodiert jedoch einen N-terminalen His-Tag sowie eine Thrombin-Schnittstelle, die zur Entfernung des Tags durch Proteaseverdau genutzt werden kann.

Um zu überprüfen, ob der Tag selbst und seine Position Einfluss auf die Struktur und Funktion der yPGK nehmen, wurde die WT-Sequenz ebenfalls aus pET15b exprimiert (Konstrukt: His PGK WT) und zusätzlich das His-Tag entfernt (Konstrukt: PGK WT). CD- und Aktivitätsmessungen ergaben, dass die Position des Tags keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur und einen geringen Einfluss auf die katalytische Aktivität hat. Die Entfernung des Tags ergab eine leichte Abweichung der Sekundärstruktur und eine etwas reduzierte katalytische Aktivität gegenüber dem PGK WT His. Die Proteinreinigung nach dem Verdau (Entfernung der Protease und der durch unvollständigen Verdau verbliebenen His-markierten yPGK) ist ein aufwändiger Prozess, wobei nicht auszuschließen ist, dass auch dabei Struktur und Aktivität beeinträchtigt werden. Unvollständiger Verdau bzw. unvollständige Reinigung nach dem Verdau sind schwer abzuschätzen und können bewirken, dass die Proben strukturell inhomogen sind. Außerdem wirkt sich der Prozess negativ auf die Proteinausbeuten aus. Die Entfaltungsstudien wurden, aufgrund des geringen Einflusses des Tags auf Struktur und Funktion des Enzyms, an den N-terminal His-markierten yPGK-Varianten durchgeführt.

5.3 Präparation der yPGK für Einzelmolekül-FRET

Fluoreszenzbasierte Entfaltungsstudien erfordern eine hohe Probenqualität, d.h. eine möglichst hohe Reinheit und Homogenität bezüglich der markierten Spezies. Auf der anderen Seite können, im Gegensatz zu Ensemble-FRET, Kontaminationen bis zu einem gewissen Grad aus den Messresultaten herausgefiltert werden.

Die meisten Proteine enthalten Cysteine. Sind diese zugänglich für die maleimid-funktionalisierten Farbstoffe, werden sie fluoreszenzmarkiert und können unter Umständen zum Signal beitragen und die Messergebnisse beeinflussen. Das gleiche gilt für Degradationsprodukte, Oligomere und Aggregate des zu untersuchenden Proteins. Die mit einem 6x His-Tag markierten Cysteinvarianten wurden mit NiNTA-Affinitätschromatographie isoliert. Allerdings sind Kontaminationen durch His-reiche Proteine, die ebenfalls an die Matrix binden können, denkbar und auch wahrscheinlich. Eine eingehende Untersuchung mittels Protein-Elektrophorese und Westernblot sind daher essentiell. Die Proteinreinigung wurde durch einen zusätzlichen Gelfiltrationsschritt (Größenausschlusschromatographie, SEC) verbessert, mit dem Kontaminationen durch Oligomere/ Aggregate und Degradationsprodukte minimiert werden konnten. Mit SDS-PAGE konnte eine deutliche Optimierung der Reinheit der Proben gegenüber NiNTA-IMAC allein gezeigt werden. Die Neubildung von Oligomeren wurde durch Zugabe von TCEP eingeschränkt.

Dadurch, dass für Donor- und Akzeptor die gleiche Kopplungsschemie angewandt wurde, enthalten die Proben nach der Farbstoffreaktion verschiedene Spezies, die nur schwer voneinander isoliert werden können (Kapitel 4.6). Die mit einem und doppelt mit dem gleichen Farbstoff markierten Spezies können in Einzelmolekül-FRET-Messungen aussortiert werden. Während Akzeptor-markierte Spezies in FRET-Experimenten nicht angeregt werden, können Donor-markierte Spezies mittels PIE erkannt und nicht in die Datenanalyse einbezogen werden. Diese Technik hat aber ihre Grenzen, deshalb müssen die Proben so homogen wie möglich sein. Die Ionenaustauschchromatographie könnte diesbezüglich z.B. durch Streckung des Gradienten oder Anwendung von Stufengradienten zur besseren Auftrennung der Spezies im Probengemisch, optimiert werden. Eine Alternative hierzu wären

orthogonale *Labelling*-Strategien, wobei verschiedene Kopplungsreaktionen verwendet werden. Dazu werden meist unnatürliche Aminosäuren in die Proteinsequenz eingeführt, die sehr spezifisch markiert werden können (Plass et al., 2011, van Hest und van Delft, 2011, Milles et al., 2012). Diese Techniken schließen zwar gemischte Populationen aus, die Mutagenese (mit schwer abschätzbaren Folgen), der Qualitätstest und gegebenenfalls eine Optimierung von Reinigung und Markierung müssen aber trotzdem durchgeführt werden.

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Farbstoffe und möglicherweise ihrer Ladung neigen auch die bereits fluoreszenzmarkierten yPGK-Varianten dazu zu oligomerisieren oder zu aggregieren. Dies konnte mit relativ hohen NaCl-Konzentrationen im Puffer der Proteinlösung zur Abschirmung negativer Ladungen reduziert werden. Aggregate wurden durch Zentrifugierung der Stock-Lösung aus der Probe entfernt.

5.4 Charakterisierung der yPGK

In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt der Probencharakterisierung auf den unmarkierten Cysteinvarianten im Vergleich zum Wildtyp. Es wurde eingehend untersucht, welchen Einfluss das His-Tag und die substituierten Aminosäuren auf Struktur und Funktion des Enzyms haben. Mit nativer Protein-Elektrophorese konnte der Grad der Oligomerisierung aufgrund der eingeführten Cysteine abgeschätzt werden, in CD-Studien und Aktivitätstests wurde die Integrität der Sekundärstruktur und die katalytische Aktivität der yPGK nach der Mutagenese validiert. Zusätzlich wurden DLS-Messungen durchgeführt, um die native Faltung im Hinblick auf die hydrodynamischen Radien zu untersuchen.

Die Charakterisierung der markierten Varianten gestaltet sich schwieriger, schon deshalb, weil der Vergleich zum Wildtyp schwer zu ziehen ist. Hier könnte helfen, das natürliche Cystein zu markieren, so wären z.B. FCS-Messungen am Wildtyp möglich. Außerdem sind die Alexa-Farbstoffe groß (0,7 bzw. 1,3 kDa), geladen und hydrophob. Lokale Wechselwirkungen mit Proteinresten oder sterische Behinderung der Substratbindung sind durchaus denkbar. CD-Messungen und Aktivitätstests am doppelt

markierten Protein sollten in weiteren Schritten in den Qualitätstest einbezogen werden, unverzichtbar sind sie für Untersuchungen zu Substratbindung und -umsatz. Dabei ist es allerdings schwierig abzuschätzen, inwiefern die Farbstoffe die Messung oder die Proteinstruktur beeinflussen bzw. Substratbindung und -umsatz behindern. Für reine (Ent-)Faltungsstudien erscheint der hier etablierte Qualitätstest der unmarkierten yPGK-Varianten jedoch ausreichend. Im Vergleich zu früheren Arbeiten konnte insbesondere die Oligomerisierung reduziert werden. Durch Verbesserungen der Ionenaustauschchromatographie konnte die Probenqualität optimiert werden.

5.5 Wirkung von Guanidiniumhydrochlorid

Eine Unwägbarkeit in Entfaltungsexperimenten mit chemischer Denaturierung ist, dass der mikroskopische Wirkmechanismus des vielfach verwendeten GndHCl nicht geklärt ist. Grundsätzlich hängt die Stabilität eines Proteins von der Ionenstärke, dem pH-Wert und der Temperatur seiner Umgebung ab. Sie wird außerdem durch die Anwesenheit anderer Makromoleküle (Kofaktoren, Chaperone) beeinflusst. Besonders innerhalb der Zelle spielt auch der limitierte Raum, den ein Protein einnehmen kann, eine Rolle (*crowding effect*) (England und Haran, 2011).

GndHCl hat eine destabilisierende Wirkung, wenn es in hohen Konzentrationen (meist im höheren millimolaren bis molaren Bereich) eingesetzt wird. Es interagiert also nur relativ schwach. Bei geringen Konzentrationen wird meist eine Kompaktierung beobachtet (Salzeffekt, elektrostatische Interaktionen) (O'Brien et al., 2007). Es bleibt die Frage, ob GndHCl die Eigenschaften des Lösungsmittels (Wasser) und damit die Interaktionen zwischen Protein und Umgebung moduliert, oder ob es direkt mit dem Protein an Positionen, die normalerweise durch Wassermoleküle eingenommen werden, interagiert. Ist letzteres der Fall, kommen Interaktionen mit dem Peptidrückgrad und/oder bestimmten Aminosäureseitenketten in Frage (England und Haran, 2011).

Die Energie eines Proteins setzt sich aus van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbindungen und elektrostatischen Interaktionen innerhalb des Proteins und mit seiner Umgebung zusammen (England und Haran, 2011). Ein Teil hiervon ist der hydrophobe Effekt. Schwächen chemische Denaturierungsmittel den hydrophoben

Effekt, stabilisieren sie auch entfaltete Zustände, in denen hydrophobe Reste exponiert vorliegen, gegenüber dem nativ gefalteten Zustand. Alternativ könnten entfaltete Zustände auch dadurch stabilisiert werden, dass polare Aminosäuren, die während der Entfaltung an die Oberfläche geraten, mit dem polaren Denaturierungsmittel interagieren. *Molecular dynamics* (MD)- Simulationen ergaben, dass sich GndHCl mit seiner planaren nichtpolaren Seite an hydrophobe Bereiche der Proteine anlagert, wobei die geladenen Kanten zum Lösungsmittel exponiert liegen. Auf diese Weise kann es den hydrophoben Effekt schwächen und den denaturierten Zustand mit exponierten hydrophoben Bereichen stabilisieren (Mason et al., 2003, Mason et al., 2004, Godawat et al., 2010, England und Haran, 2011).

Einigkeit herrscht darüber, dass GndHCl (und Urea) dabei helfen, nichtpolare Seitenketten und Rückgradbereiche in Lösung zu bringen und so nichtgefaltete Zustände stabilisieren. Dabei ist allerdings nicht klar, welcher Effekt von höherer Priorität ist. Außerdem kann GndHCl eine strukturelle Expansion, über die Auflösung der nativen Sekundär- und Tertiärstrukturen hinaus, verursachen, die der *coil-globule transition* der Polymere ähnlich ist (Sherman und Haran, 2006). Auch für die yPGK konnte dieser Effekt bei GndHCl-Konzentrationen > 1 M beobachtet werden (vgl. CD-Entfaltungsstudien in Kapitel 4.9.1) (Kempe et al., 2016). Dies führt allerdings zu einer weiteren Frage, nämlich der, wie der ungefaltete Zustand eines Proteins generell aussieht. Möglicherweise ist er kein *random coil*, wie allgemein angenommen, sondern enthält noch Strukturelemente wie z.B. transiente Sekundärstrukturen (England und Haran, 2011).

5.6 Entfaltung der yPGK

Ein System aus Inter- und Intradomänenmutanten wurde hergestellt, charakterisiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, das sich für Einzelmolekül-FRET-Entfaltungsstudien eignet. Das System ermöglicht es, Distanzänderungen zwischen den Domänen, aber auch innerhalb der individuellen Domänen während der Entfaltung der PGK zu untersuchen. Im Gegensatz zu CD-spektroskopischen Untersuchungen, die globale Informationen über die Veränderung der Sekundärstrukturen liefern, lassen sich mit Einzelmolekül-FRET-Studien, abhängig von den Farbstoffpositionen, sehr lokale Strukturveränderungen während der Entfaltung ableiten. Erste Entfaltungsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen konnten für alle drei bisher im System enthaltenen Varianten durchgeführt werden.

Globales Entfaltungsmuster (Interdomänenmutante)

Die Interdomänenmutante wurde mit je einem Farbstoff in jeder Domäne markiert und erlaubt so die Betrachtung des Gesamtproteins während der Entfaltung. Diese Variante der yPGK wurde bereits in einer früheren Studie untersucht (Rosenkranz, 2011), deren Ergebnisse hier bestätigt werden konnten. Die optimierte Probenpräparation und -charakterisierung führte zu einer definierten nativen Population, repräsentiert durch einen Peak bei reproduzierbarer mittlerer FRET-Effizienz, wohingegen zuvor beobachtete Mischpopulationen eliminiert werden konnten. Das Entfaltungsmuster der Interdomänenmutante bei chemischer Denaturierung mit GndHCl zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem klassischen Zwei-Zustands-Modell, das davon ausgeht, dass ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen einem gefalteten und einem entfalteten Zustand herrscht. Der Übergang vom gefalteten zum entfalteten Zustand findet bei GndHCl-Konzentrationen zwischen 0,4 und 0,9 M ($C_{1/2, \text{GndHCl}} = 0,64 \text{ M}$) statt und liegt damit im Bereich der Literaturwerte. Bei höheren GndHCl-Konzentrationen liegt die yPGK vollständig entfaltet vor. Ensemble (CD) und Einzelmolekül (FRET) -Studien stimmen darin überein.

Entfaltung der N-Domäne

Die Analysen der FRET-Effizienzverteilungen, gemessen an der N-Domänenmutante, weisen auf eine Kompaktierung der N-Domäne bei moderaten GndHCl-Konzentrationen zwischen 0,5 M - 0,9 M hin. Entsprechende Beobachtungen konnten auch in Ensemble-Studien bei mittleren Konzentrationen des Denaturierungsmittels GndHCl (~ 0,5 M) gemacht werden (Sherman et al., 1995). Die Autoren dieser Studien interpretieren dies als ein kompaktes Entfaltungsintermediat der N-Domäne. Die Existenz eines solchen intermediären Zustands konnte hier durch Analysen der Donor-Lebenszeiten allerdings nicht abschließend validiert werden. Bei Erhöhung der FRET-Effizienz, wie sie bei mittleren GndHCl-Konzentrationen anhand der intensitätsbasierten Daten beobachtet wurde, wird eine Reduzierung der Donor-Lebenszeit erwartet. Im Widerspruch dazu zeigte sich in diesem Konzentrationsbereich ein zusätzlicher Peak bei längeren Lebenszeiten. Die Donor-Lebenszeit ist aber nicht nur sensitiv gegenüber Veränderungen der Energieübertragungseffizienz durch Distanzänderungen. Zusätzlich ist die Quanteneffizienz (und damit die Lebenszeit) abhängig von der lokalen Umgebung, die sich während der Entfaltung des Proteins ändern kann. Dies kann wiederum die Interpretation der Daten erschweren. Denkbar wäre zum Beispiel, dass die Emission des Donors im nativen Zustand der yPGK aufgrund der Konfiguration der Aminosäuren in seiner unmittelbaren Umgebung partiell gequencht wird, was im teilweise entfalteten Zustand möglicherweise nicht mehr der Fall ist. Um Szenarios dieser Art zu überprüfen und das Verhalten der N-Domäne während ihrer Entfaltung besser interpretieren zu können sind weiterführende Messungen, vor allem der Quantenausbeuten und Anisotropie bei mittleren GndHCl-Konzentrationen, nötig. Ab GndHCl-Konzentrationen über 0,9 M liegt die N-Domäne entfaltet vor, was wiederum mit dem globalen Bild aus CD- und FRET-Studien an der Interdomänenmutante übereinstimmt.

Entfaltung der C-Domäne

Die Analysen der Einzelmolekül-FRET-Studien anhand der gewählten Farbstoffpositionen innerhalb der C-Domäne ergaben keine Veränderung der mittleren FRET-Effizienzen bei kritischen GndHCl-Konzentrationen (0,5 M bis 1 M). Blicke die C-Domäne intakt, während die N-Domäne bereits entfaltet ist, widerspricht das dem in der Literatur dargestellten Bild, welches zeigt, dass im Kontext des *full-length* Proteins, die C-Domäne zuerst entfaltet bzw. instabiler gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln ist als die N-Domäne (Beechem et al., 1995). Dies widerspricht ebenfalls den Ergebnissen aus Tryptophan-Entfaltungsstudien, die darauf hindeuten, dass der Übergang vom gefalteten zum entfalteten Zustand der C-Domäne bei GndHCl-Konzentrationen zwischen 0,5 M und 1 M erfolgt. Die Verteilungen der Donor-Lebenszeiten zeigen allerdings eine zusätzliche Schulter bei GndHCl-Konzentrationen zwischen 0,7 M und 0,85 M, also etwas oberhalb der kritischen Konzentrationen (CD: $c_{1/2, \text{GndHCl}} = 0,64 \text{ M}$; Trp-Fluoreszenz: $c_{1/2, \text{GndHCl}} = 0,55 \text{ M}$). Dies könnte daraufhin hindeuten, dass strukturelle Veränderungen während der Entfaltung stattfinden, die C-Domäne aber lokal kompakt bleibt.

5.7 Ausblick

Die in Kapitel 4.10 dargestellten Ergebnisse sind die Resultate erster Messungen, um die Eignung der Markierungs-Positionen für Einzelmolekül-FRET-Entfaltungsstudien zu überprüfen. Das System aus den drei beschriebenen Mutanten zur positionsspezifischen Fluoreszenzmarkierung bietet bereits erste Einblicke in den Entfaltungsprozess der yPGK auf Einzelmolekülebene. Die Ergebnisse zeigen sowohl Übereinstimmungen mit als auch Widersprüche zu bisherigen Studien mit Ensemble-Techniken. Besonders interessant ist es nun, den vermeintlich kompakten intermediären Zustand der N-Domäne zu validieren und wirkliche Bezüge zu dessen (residualer) Struktur herstellen zu können. Ebenso interessant ist auch das bisher schwer interpretierbare Verhalten der C-Domäne während der Entfaltung. Ensemble-Studien zeigen, dass sich die C-Domäne bei moderaten GndHCl-Konzentrationen entfaltet. Es ist also nicht so, dass die C-Domäne eine höhere Stabilität gegenüber dem Denaturierungsmittel zeigt als die N-Domäne. Aber möglicherweise bleiben lokale Strukturen kompakt, während sich die Domäne insgesamt entfaltet.

Um die Ergebnisse in Zukunft besser interpretieren zu können, müssen weiterführende Experimente durchgeführt werden, d.h. Messungen und Datenanalyse sollten weiterentwickelt werden. Generell ist es denkbar, dass die FRET-Effizienzen nicht nur von einer reinen Abstandsänderung der Farbstoffe beeinflusst werden. Eventuelle Einflüsse anderer Parameter (z.B. Farbstoff-Linker-Dynamiken, *quenching*, Brechungsindex) müssen darum entsprechend quantifiziert werden. Eine wiederkehrend diskutierte Problematik ist auch der Orientierungsfaktor κ^2 . Dieser wird üblicherweise als $\kappa^2 = 2/3$ angenommen. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass die Farbstoffe frei rotieren können. Hier können Anisotropie-Messungen helfen, die Beweglichkeit der an spezifischen Positionen an das Protein gebundenen Farbstoffe zu untersuchen. Es ist unwahrscheinlich, aber doch möglich, dass diese aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Protein und Farbstoff eingeschränkt ist. Ebenso könnten sich die Quantenausbeuten bei den verschiedenen denaturierenden Bedingungen verändern. Diese sollten daher bestimmt und die FRET-Effizienzen entsprechend korrigiert werden (Kempe et al., 2016).

Zudem können Analysen der Breite der FRET-Effizienzverteilungen und eventueller Veränderungen zusätzliche Informationen beinhalten. Hierzu kann durch *shot-noise*-Analysen die experimentelle intrinsische Breite abgeschätzt werden. Einer Verbreiterung der Verteilung im Vergleich zum *shot-noise*-Limit oder im Verlauf der Entfaltung können (zunehmende) Proben-Heterogenität oder dynamische Prozesse (z.B. Übergänge zwischen verschiedenen Zuständen) zugrunde liegen.

Um Einblicke in die Details des Entfaltungswegs der yPGK und ihrer Domänen zu erhalten, ist es nötig, weitere Markierungs-Positionen zu designen. Verschiedene Referenzpunkte innerhalb und zwischen den Domänen aber auch an spezifischen Positionen in der *interface*-Region können ein vollständigeres Bild der Entfaltung und der Rolle, die Domäneninteraktionen dabei spielen, ergeben. Aussichtsreiche Kandidaten sind bereits vorhanden. Zudem müssen Entfaltung und Faltung nicht zwangsläufig dieselben intermediären Zustände durchlaufen und auch die Geschwindigkeiten, mit der die beiden Prozesse ablaufen, können deutlich voneinander abweichen. Rückfaltungsexperimente im Ensemble und mit Einzelmolekül-FRET können eventuelle Unterschiede aufdecken.

Für quantitative Strukturanalysen basierend auf Einzelmolekül-FRET-Daten ist eine Interpretation der Abstandsänderungen der gebundenen Farbstoffe in Bezug auf Bewegungen des Makromoleküls nötig. Hier könnte die Kombination mit Simulationen sehr wirkungsvoll sein, um die experimentellen Werte in reale Strukturinformationen zu übertragen.

6 Zusammenfassung

Proteine sind in nahezu alle Prozesse involviert, die für die Vitalität der Zelle essentiell sind. Um ihre vielfältigen Funktionen ausführen zu können, ist es notwendig, dass Proteine ihre native Struktur einnehmen. Welche Wege Polypeptide während der Faltung beschreiten und wie ihre Aminosäuresequenz Einfluss auf den Faltungsprozess nimmt, ist noch nicht vollständig verstanden. In diesem Zusammenhang hat sich die Phosphoglycerat-Kinase aus *Saccharomyces cerevisiae* (yPGK) als Modell für spektroskopische Untersuchungen zur (Ent-) Faltung von Multi-Domänen-Proteinen bewährt. Aufgrund des Aufbaus aus zwei globulären Domänen (N- und C-Domäne) ist ihre Struktur ausreichend komplex, um z.B. Domäneninteraktionen und -bewegungen während der (Ent-) Faltung zu untersuchen. Für Entfaltungsstudien an der yPGK mit Einzelmolekül-FÖRSTER-Resonanz-Energietransfer (FRET) wurde ein System aus Inter- und Intradomänenmutanten entwickelt. Das etablierte System ermöglicht es, Abstandsänderungen zwischen den Domänen aber auch innerhalb der individuellen Domänen im Kontext des Gesamtproteins zu beobachten. Die dafür notwendige Markierung des Proteins erfolgte über an spezifischen Positionen eingeführte Cysteine. Die Probenpräparation und -reinigung der entsprechenden Cysteinvarianten der yPGK wurde optimiert und alle Proben bezüglich ihrer Reinheit mit Elektrophorese und Größenausschlusschromatographie untersucht. Die Integrität der Struktur nach der Mutagenese wurde mit Zirkulardichroismus (CD) –Spektroskopie und dynamischer Lichtstreuung (DLS) eingehend charakterisiert. Außerdem wurde die katalytische Aktivität überprüft. Damit konnte ein Qualitätstest etabliert werden, um die Eignung fluoreszenzmarkierter yPGK-Varianten für Entfaltungsstudien mit Einzelmolekül-FRET zu überprüfen. Erste Einzel-Molekül-Studien (mit chemischer Denaturierung durch Zugabe von GndHCl) unter Gleichgewichtsbedingungen konnten für die drei bisher im System enthaltenen Varianten durchgeführt werden. Anhand der Interdomänenmutante, die je einen Farbstoff in jeder ihrer Domänen trägt, konnte gezeigt werden, dass das globale Entfaltungsmuster der yPGK dem klassischen Zwei-Zustands-Modell folgt. Dieses klassische (Ent-) Faltungsmodell basiert darauf, dass ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen einem gefalteten und einem entfaltenen Zustand herrscht. Im Gegensatz dazu ergibt sich ein komplexeres Entfaltungsmuster der Intradomänen-

mutanten. Die FRET-Studien deuten auf einen kompakten intermediären Zustand der N-Domäne hin. Für die C-Domäne wurde beobachtet, dass sie während ihrer Entfaltung (bis weit über die kritischen Konzentrationen des Denaturierungsmittels hinaus) lokal kompakt bleibt. Tiefere Einblicke in die Details des Entfaltungsweges der yPGK und ihrer Domänen können in weiterführende Studien, basierend auf der optimierten Probenpräparation und dem etablierten Qualitätstest, geben. Aussichtsreiche Kandidaten für eine Erweiterung des vorgestellten Systems konnten ebenfalls bereits identifiziert werden.

7 Summary

Proteins maintain life through a multitude of tasks within biological systems. To gain their functionality, it is crucial that proteins obtain their native structure which is hidden within their amino acid sequence. Deciphering how the amino acid code translates into 3D structures is the key to understand how proteins really work. In this context, the two-domain protein phosphoglycerate kinase (PGK) has proven to be an excellent model for multi-domain proteins. It is known that both domains of PGK interact during folding. The N-terminal domain only gains its native structure in presence of the C-terminal domain. The C-domain also folds individually but the process is facilitated by the N-domain. In addition, at least one intermediate state is involved. A detailed picture of the folding pathway of PGK and to what extent intermediates are populated is still missing. It is challenging to unravel the mechanisms of tertiary structure formation, especially since subpopulations are hard to identify with ensemble methods. To avoid averaging over all conformations, single-molecule methods are a promising tool to distinguish and quantify intermediate states. Here, a set of three yPGK cysteine variants for site-specific labeling with fluorescent dyes for single molecule fluorescence resonance energy transfer (FRET) was established. This system is designed to follow motions in between and within the individual domains displayed by distance changes of fluorophores during unfolding transitions under denaturing conditions. It was verified that secondary and tertiary structures were not considerably affected by cysteine mutations applying circular dichroism (CD) spectroscopy and dynamic light scattering (DLS). In addition, all PGK cysteine mutants were catalytically active. The native states of the double labeled PGK variants were thoroughly characterized by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and single molecule FRET. Thus, a quality test to proof the suitability of yPGK variants for single-molecule FRET studies was established. First unfolding experiments (applying GndHCl for chemical denaturation) under equilibrium conditions were performed for all variants of the system. Unfolding of the inter-domain mutant, carrying a fluorophor in each of its domains, follows the classical two-state model. In contrast, the intra-domain mutants show more complex unfolding patterns. The results indicate that the N-domain forms a compact intermediate. The C-domain seems to stay locally compact even beyond the critical range of denaturant concentrations. Further studies based on the optimized sample preparation and the

7 Summary

established quality test will provide detailed insights into the unfolding pattern of yPGK and its domains. Promising candidates to extend the proposed system were already identified.

8 Literaturverzeichnis

- Aragón, S.R. und Pecora, R. (1976). *Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics* J. Chem. Phys. 64: 1791-1803.
- Bai, Y. und Englander, S.W. (1996). *Future directions in folding: The multi-state nature of protein structure*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 24 (2): 145-151.
- Banks, R.D., Blake, C.C.F., Evans, P.R., Haser, R., Rice, D.W., Hardy, G.W., Merrett, M. und Phillips, A.W. (1979). *Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme*. Nature 279 (5716): 773-777.
- Batey, S., Nickson, A.A. und Clarke, J. (2008). *Studying the folding of multidomain proteins*. HFSP Journal 2 (6): 365-377.
- Becker, W. (2005). *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques*, Springer Berlin, Heidelberg, Deutschland.
- Beechem, J.M., Sherman, M.A. und Mas, M.T. (1995). *Sequential Domain Unfolding in Phosphoglycerate Kinase: Fluorescence Intensity and Anisotropy Stopped-Flow Kinetics of Several Tryptophan Mutants*. Biochemistry 34 (42): 13943-13948.
- Bernstein, B.E., Michels, P.A.M. und Hol, W.G.J. (1997). *Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation*. Nature 385 (6613): 275-278.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. und Schäfer, F. (2009). *Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review*. Methods Enzymol. R. B. Richard and P. D. Murray, Academic Press. 463: 439-473.
- Bücher, T. (1947). *Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment*. Biochim. Biophys. Acta 1: 292-314.
- Buschmann, V., Krämer, B., Koberling, F., Macdonald, R. und Rüttinger, S. (2009). *Quantitative FCS: Determination of the Confocal Volume by FCS and Bead Scanning with the MicroTime200*. PicoQuant GmbH Application Note: Quantitative FCS v. 1.1.
- Campbell, N.A. und Reece, J.B. (2002). *Biology*, Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. und Righetti, P.G. (2004). *Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. ELECTROPHORESIS 25 (9): 1327-1333.

- Corpet, F. (1988). *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*. Nuc. Acids Res. 16 (22): 10881-10890.
- Creighton, T.E. (1996). *Proteins-Structures and Molecular Properties*, W. H. Freeman and Company, New York, USA
- Dalbøge, H., Bayne, S. und Pedersen, J. (1990). *In vivo processing of N-terminal methionine in E. coli*. FEBS Letters 266 (1): 1-3.
- Dobson, C.M. (2003). *Protein folding and misfolding*. Nature 426 (6968): 884-890.
- dos Remedios, C.G. und Moens, P.D.J. (1995). *Fluorescence Resonance Energy Transfer Spectroscopy Is a Reliable "Ruler" for Measuring Structural Changes in Proteins: Dispelling the Problem of the Unknown Orientation Factor*. J. Struct. Biol. 115 (2): 175-185.
- Eggeling, C., Fries, J.R., Brand, L., Günther, R. und Seidel, C.A.M. (1998). *Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. 95 (4): 1556-1561.
- England, J.L. und Haran, G. (2011). *Role of Solvation Effects in Protein Denaturation: From Thermodynamics to Single Molecules and Back*. Annu. Rev. Phys. Chem. 62 (1): 257-277.
- Englander, S.W. und Mayne, L. (2014). *The nature of protein folding pathways*. Proc. Natl. Acad. Sci. 111 (45): 15873-15880.
- Epstein, C.J., Goldberger, R.F. und Anfinsen, C.B. (1963). *The Genetic Control of Tertiary Protein Structure: Studies With Model Systems*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 28: 439-449.
- Förster, T. (1948). *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann. Phys. 437: 55-75.
- Gabba, M. (2014). *Interdomain Functional Dynamics of Phosphoglycerate Kinase studied by Single-Molecule FRET*. Forschungszentrum Jülich GmbH, Institute of Complex Systems (ICS), Molecular Biophysics (ICS-5), Dissertation.
- Godawat, R., Jamadagni, S.N. und Garde, S. (2010). *Unfolding of Hydrophobic Polymers in Guanidinium Chloride Solutions*. J. Phys. Chem. 114 (6): 2246-2254.
- Greenfield, N.J. (2007). *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. Nat. Protocols 1 (6): 2876-2890.
- Han, J.-H., Batey, S., Nickson, A.A., Teichmann, S.A. und Clarke, J. (2007). *The folding and evolution of multidomain proteins*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 8 (4): 319-330.

- Hartl, F.U. und Hayer-Hartl, M. (2009). *Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo*. Nat. Struct. Mol. Biol. 16 (6): 574-581.
- Hirel, P.H., Schmitter, M.J., Dessen, P., Fayat, G. und Blanquet, S. (1989). *Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid*. Proc. Natl. Acad. Sci. 86 (21): 8247-8251.
- Höfig, H., Gabba, M., Poblete, S., Kempe, D. und Fitter, J. (2014). *Inter-Dye Distance Distributions Studied by a Combination of Single-Molecule FRET-Filtered Lifetime Measurements and a Weighted Accessible Volume (wAV) Algorithm*. Molecules 19 (12): 19269-19291.
- Horecker, B.L. und Kornberg, A. (1948). *The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides*. J. Biol. Chem. 175 (1): 385-390.
- Hutchison, C.A., Phillips, S., Edgell, M.H., Gillam, S., Jahnke, P., Smith, M., Edgell, M.H., Gillam, S., Jahnke, P. und Smith, M. (1978). *Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence*. J. Biol. Chem. 253 (18): 6551-6560.
- Johnson, C.S.J. und Gabriel, D.A. (1994). *Laser Light Scattering*, Dover Publications Inc., New York, USA.
- Kalinin, S., Peulen, T., Sindbert, S., Rothwell, P.J., Berger, S., Restle, T., Goody, R.S., Gohlke, H. und Seidel, C.A.M. (2012). *A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling*. Nat. Meth. 9 (12): 1218-1225.
- Kapusta, P. (2010). *Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data for FCS Calibration*. PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland.
- Kempe, D., Cerminara, M., Poblete, S., Schöne, A., Gabba, M. und Fitter, J. (2016). *Single-molecule FRET measurements in additive-enriched aqueous solutions*. Anal. Chem. under revision.
- Kempe, D., Schöne, A., Fitter, J. und Gabba, M. (2015). *Accurate Fluorescence Quantum Yield Determination by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. J. Phys. Chem. B 119 (13): 4668-4672.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. Nature 227 (5259): 680-685.
- Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA.
- Levinthal, C. (1969). *How to fold graciously*. Mossbauer spectroscopy in biological systems. M. E. DeBrunner J.T.P. Allerton House, Monticello, Illinois: University of Illinois Press: 22-24.
- Lillo, M.P., Szpikowska, B.K., Mas, M.T., Sutin, J.D. und Beechem, J.M. (1997). *Real-Time Measurement of Multiple Intramolecular Distances during Protein Folding*

Reactions: A Multisite Stopped-Flow Fluorescence Energy-Transfer Study of Yeast Phosphoglycerate Kinase. Biochemistry 36 (37): 11273-11281.

Mason, P.E., Neilson, G.W., Dempsey, C.E., Barnes, A.C. und Cruickshank, J.M. (2003). *The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution.* Proc. Natl. Acad. Sci. 100 (8): 4557-4561.

Mason, P.E., Neilson, G.W., Enderby, J.E., Saboungi, M.-L., Dempsey, C.E., MacKerell, A.D. und Brady, J.W. (2004). *The Structure of Aqueous Guanidinium Chloride Solutions.* J. Am. Chem. Soc. 126 (37): 11462-11470.

McPhillips, T.M., Hsu, B.T., Sherman, M.A., Mas, M.T. und Rees, D.C. (1996). *Structure of the R65Q Mutant of Yeast 3-Phosphoglycerate Kinase Complexed with Mg-AMP-PNP and 3-Phospho-d-glycerate.* Biochemistry 35 (13): 4118-4127.

Medintz, I. und Hildebrandt, N. (2014). *FRET- Förster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications*, Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland.

Milles, S., Tyagi, S., Banterle, N., Koehler, C., VanDelinder, V., Plass, T., Neal, A.P. und Lemke, E.A. (2012). *Click Strategies for Single-Molecule Protein Fluorescence.* J. Am. Chem. Soc. 134 (11): 5187-5195.

Missiakas, D., Betton, J.M., Minard, P. und Yon, J.M. (1990). *Unfolding-refolding of the domains in yeast phosphoglycerate kinase: comparison with the isolated engineered domains.* Biochemistry 29 (37): 8683-8689.

Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator-Molekularbiologie/Genomics*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Deutschland.

Müller-Späh, S., Soranno, A., Hirschfeld, V., Hofmann, H., Rügger, S., Reymond, L., Nettels, D. und Schuler, B. (2010). *Charge interactions can dominate the dimensions of intrinsically disordered proteins.* Proc. Natl. Acad. Sci. 107 (33): 14609-14614.

Müller, B.K., Zaychikov, E., Bräuchle, C. und Lamb, D.C. (2005). *Pulsed Interleaved Excitation.* Biophys. J. 89 (5): 3508-3522.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 263-273.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988). *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.* ELECTROPHORESIS 9 (6): 255-262.

Nozaki, Y. (1972). *[3] The preparation of guanidine hydrochloride.* Methods Enzymol., Academic Press. 26: 43-50.

- O'Brien, E.P., Dima, R.I., Brooks, B. und Thirumalai, D. (2007). *Interactions between Hydrophobic and Ionic Solutes in Aqueous Guanidinium Chloride and Urea Solutions: Lessons for Protein Denaturation Mechanism*. J. Am. Chem. Soc. 129 (23): 7346-7353.
- Osváth, S., Köhler, G., Závodszy, P. und Fidy, J. (2005). *Asymmetric effect of domain interactions on the kinetics of folding in yeast phosphoglycerate kinase*. Prot. Sci. 14 (6): 1609-1616.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. und Gray, T. (1995). *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Prot. Sci. 4 (11): 2411-2423.
- Parrini, C., Taddei, N., Ramazzotti, M., Degl'Innocenti, D., Ramponi, G., Dobson, C.M. und Chiti, F. (2005). *Glycine Residues Appear to Be Evolutionarily Conserved for Their Ability to Inhibit Aggregation*. Structure 13 (8): 1143-1151.
- Plass, T., Milles, S., Koehler, C., Schultz, C. und Lemke, E.A. (2011). *Genetically Encoded Copper-Free Click Chemistry*. Angew. Chem. Int. Ed. 50 (17): 3878-3881.
- Richardson, J.S. und Richardson, D.C. (2002). *Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation*. Proc. Natl. Acad. Sci. 99 (5): 2754-2759.
- Rigler, R., Mets, Ü., Widengren, J. und Kask, P. (1993). *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion*. Eur. Biophys. J. 22: 169-175.
- Robertson, A.D. und Murphy, K.P. (1997). *Protein Structure and the Energetics of Protein Stability*. Chem. Rev. 97 (5): 1251-1268.
- Rosenkranz, T. (2011). *Time-Resolved Single Molecule FRET Studies on Folding/Unfolding Transitions and on Functional Conformational Changes of Phosphoglycerate Kinase*. Forschungszentrum Jülich GmbH, Institute of Complex Systems (ICS), Molecular Biophysics (ICS-5), Dissertation.
- Rüttinger, S., Macdonald, R., Krämer, B., Koberling, F., Roos, M. und Hildt, E. (2006). *Accurate single-pair Förster resonant energy transfer through combination of pulsed interleaved excitation, time correlated single-photon counting, and fluorescence correlation spectroscopy*. J. Biomed. Opt. 11 (2): 024012-024012-024019.
- Schägger, H. (2003). *5 - Blue Native Electrophoresis*. Membrane Protein Purification and Crystallization (Second Edition). San Diego, Academic Press: 105-130.
- Schägger, H., Cramer, W.A. und von Jagow, G. (1994). *Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis*. Anal. Biochem. 217 (2): 220-230.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1991). *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form*. Anal. Biochem. 199 (2): 223-231.

- Schuler, B. (2013). *Single-molecule FRET of protein structure and dynamics - a primer*. J. Nanobiotechnol. 11 (Suppl 1:S2).
- Schwille, P. und Haustein, E. (2002). *Fluorescence Correlation Spectroscopy An Introduction to its Concepts and Applications*. Biophysics Textbook Online.
- Sherman, E. und Haran, G. (2006). *Coil-globule transition in the denatured state of a small protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. 103 (31): 11539-11543.
- Sherman, M.A., Beechem, J.M. und Mas, M.T. (1995). *Probing Intradomain and Interdomain Conformational Changes during Equilibrium Unfolding of Phosphoglycerate Kinase: Fluorescence and Circular Dichroism Study of Tryptophan Mutants*. Biochemistry 34 (42): 13934-13942.
- Shimazaki, H. und Shinomoto, S. (2007). *A Method for Selecting the Bin Size of a Time Histogram*. Neural Computation 19 (6): 1503-1527.
- Sindbert, S., Kalinin, S., Nguyen, H., Kienzler, A., Clima, L., Bannwarth, W., Appel, B., Müller, S. und Seidel, C.A.M. (2011). *Accurate Distance Determination of Nucleic Acids via Förster Resonance Energy Transfer: Implications of Dye Linker Length and Rigidity*. J. Am. Chem. Soc. 133 (8): 2463-2480.
- Sisamakris, E., Valeri, A., Kalinin, S., Rothwell, P.J. und Seidel, C.A.M. (2010). *Chapter 18 - Accurate Single-Molecule FRET Studies Using Multiparameter Fluorescence Detection*. Methods Enzymol. G. W. Nils, Academic Press. 475: 455-514.
- Steward, A., Adhya, S. und Clarke, J. (2002). *Sequence Conservation in Ig-like Domains: The Role of Highly Conserved Proline Residues in the Fibronectin Type III Superfamily*. J. Mol. Biol. 318 (4): 935-940.
- Stryer, L. (1995). *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Deutschland.
- Symphotime64-Hilfe (PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland).
- Tellinghuisen, J., Goodwin, P.M., Ambrose, W.P., Martin, J.C. und Keller, R.A. (1994). *Analysis of fluorescence lifetime data for single Rhodamine molecules in flowing sample streams*. Anal. Chem. 66 (1): 64-72.
- van Hest, J.C.M. und van Delft, F.L. (2011). *Protein Modification by Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition*. ChemBioChem 12 (9): 1309-1312.
- Watson, H.C., Walker, N.P., Shaw, P.J., Bryant, T.N., Wendell, P.L., Fothergill, L.A., Perkins, R.E., Conroy, S.C., Dobson, M.J. und Tuite, M.F. (1982). *Sequence and structure of yeast phosphoglycerate kinase*. The EMBO Journal 1 (12): 1635-1640.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C. und Richardson, C.C. (1968). *Enzymatic Breakage and Joining of Deoxyribonucleic Acid: VI. FURTHER PURIFICATION AND PROPERTIES OF POLYNUCLEOTIDE LIGASE FROM*

ESCHERICHIA COLI INFECTED WITH BACTERIOPHAGE T4. J. Biol. Chem. 243 (17): 4543-4555.

Widengren, J., Rigler, R. und Mets, Ü. (1994). *Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy*. J. Fluoresc. 4 (3): 255-258.

Wittig, I., Braun, H.-P. und Schagger, H. (2006). *Blue native PAGE*. Nat. Protocols 1 (1): 418-428.

Yon, J.M., Desmadril, M., Betton, J.M., Minard, P., Ballery, N., Missiakas, D., S, G.-M., Perahia, D. und Mouawad, L. (1990). *Flexibility and folding of phosphoglycerate kinase*. Biochimie 72 (6): 417-429.

Young, T.A., Skordalakes, E. und Marqusee, S. (2007). *Comparison of Proteolytic Susceptibility in Phosphoglycerate Kinases from Yeast and E. coli: Modulation of Conformational Ensembles Without Altering Structure or Stability*. J. Mol. Biol. 368 (5): 1438-1447.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion unterstützt haben.

Prof. Dr. Jörg Fitter möchte ich dafür danken, dass er mich in seine Jülicher Arbeitsgruppe aufgenommen und mir damit die Möglichkeit zur Promotion gegeben hat. Ich danke ihm für die Betreuung in wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen.

Prof. Dr. Schwaneberg danke ich dafür, dass er sich bereit erklärt hat, die Zweitbegutachtung der Dissertation zu übernehmen.

Der IHRS BioSoft Graduate School on Biophysics and Soft Matter und ihrem Koordinator Dr. Thorsten Auth verdanke ich die Teilnahme an vielen lehrreichen Vorlesungen und Kursen und finanzielle Unterstützung.

Vielen Dank an das Team des ICS-5. Es war und ist mir eine große Freude mit euch zu arbeiten. Ein besonderer Dank an:

Michele, Iris und Matteo für die gute Zusammenarbeit, für viele Diskussionen, Anregungen und hilfreiche Erklärungen.

Tina, die mir bei der Planung und Durchführung von Experimenten zur Seite stand, für die vielen guten Anregungen und Ratschläge bei der Vorbereitung von Vorträgen und Konferenzpostern und für die Nervennahrung aus „der Schublade“.

Tina und Iris danke ich außerdem für die Korrektur des Manuskripts.

Ilona möchte ich für ihre Unterstützung im Labor, Birgit für ihre Hilfe in Verwaltungsangelegenheiten und beiden zusammen für all ihre guten Ratschläge in schwierigen Lebensfragen danken.

Daryan Kempe und Julia Walter am Physikalischen Institut der RWTH Aachen danke ich für die gut organisierte Zusammenarbeit.

Andrea Knops möchte ich für die aufopferungsvolle Betreuung meines Sohnes bis spät in den Abend hinein und notfalls auch über Nacht danken. Es hat mich tief beeindruckt, wie viel Einsatz sie gezeigt hat, damit ich und all die anderen berufstätigen Mütter, deren Kinder sie versorgt hat und immer noch versorgt, Familie und Beruf optimal vereinbaren können.

Meinem Freund Stefan, der mit mir ins Rheinland gezogen ist, möchte ich ebenfalls danken. Ich weiß, dass er sich hier nicht so richtig wohl fühlt und ich weiß gerade deshalb sehr zu schätzen, dass er trotzdem immer an meiner Seite ist. Und ein „Danke“ an unseren Sohn, Jannes, der mich mit seinem sonnigen Gemüt jeden Tag zum Lachen bringt und der es immer geduldig ertragen hat, der Letzte zu sein, der von der Tagesmutter oder aus der KITA abgeholt wird.

Meiner Mutter, Elke Schöne, und meinem kleinen Bruder, „Onkel“ Kurt, danke ich vor allem dafür, dass sie manchmal den weiten Weg aus dem Dreiländereck Deutschland-Polen-Tschechien, hierher auf sich genommen haben, um mit uns Aachen, Köln, die Eifel und das Ruhrgebiet zu erkunden.

Nicht zuletzt danke ich meinen lieben Großeltern, Margot und Günter Schöne, die mich von klein auf über alle Maßen unterstützt haben. Ohne Sie hätte ich das alles nicht geschafft.

Band / Volume 129

**Strain and electric field mediated manipulation of magnetism
in $\text{La}_{(1-x)}\text{Sr}_x\text{MnO}_3/\text{BaTiO}_3$ heterostructures**

M. Schmitz (2016), VI, 141 pp

ISBN: 978-3-95806-164-4

Band / Volume 130

**High-Throughput Live-Cell Imaging for Investigations of Cellular
Heterogeneity in *Corynebacterium glutamicum***

S. Helfrich (2016), xvi, 217 pp

ISBN: 978-3-95806-167-5

Band / Volume 131

**Laser-Induced Ultrafast Electron- and Spin-Dynamics in the Electronic
Band Structure of Co(001)**

M. A. Plötzing (2016), ii, 109, XXXIV pp

ISBN: 978-3-95806-168-2

Band / Volume 132

**Robot-Assisted Phenotyping of Genome-Reduced *Corynebacterium
glutamicum* Strain Libraries to Draft a Chassis Organism**

S. Unthan (2016), 122 pp

ISBN: 978-3-95806-169-9

Band / Volume 133

**Characterization of amino acid ammonia lyases & aminomutases
for the production of chiral α - and β -amino acids**

A. Dreßen (2016), ix, 112 pp

ISBN: 978-3-95806-176-7

Band/Volume 134

7th Georgian-German School and Workshop in Basic Science

Kacharava, A. (Ed.) erscheint nur als CD (2016)

ISBN 978-3-95806-179-8

Band / Volume 135

Crystal growth and scattering studies on two ferrites

S. Adiga (2016), iv, 150 pp

ISBN: 978-3-95806-183-5

Band / Volume 136

**Manipulating the Structural and Electronic Properties
of Epitaxial NaNbO_3 Films via Strain and Stoichiometry**

B. Cai (2016), VI, 114 pp

ISBN: 978-3-95806-185-9

Band / Volume 137

Surface Potential of Metallic Surfaces and Self-Assembling Organic Monolayers in Various Electrolytes

J. Wang (2016), ii, 58 pp

ISBN: 978-3-95806-188-0

Band / Volume 138

Ab initio investigation of hybrid molecular-metallic interfaces as a tool to design surface magnetic properties for molecular spintronics

R. Friedrich (2016), 277 pp

ISBN: 978-3-95806-194-1

Band / Volume 139

Topological Matter - Topological Insulators, Skyrmions and Majoranas

Lecture Notes of the 48th IFF Spring School 2017

27 March – 07 April 2017, Jülich, Germany

ed. by S. Blügel, Y. Mokrousov, T. Schäpers, Y. Ando (2017), ca 1000 pp

ISBN: 978-3-95806-202-3

Band / Volume 140

In situ studies of the growth and oxidation of complex metal oxides by pulsed laser deposition

C. Xu (2017), iv, 159 pp

ISBN: 978-3-95806-204-7

Band / Volume 141

Intrinsic and extrinsic spin-orbit torques from first principles

G. Géranton (2017), 122 pp

ISBN: 978-3-95806-213-9

Band / Volume 142

Magnetic Proximity Effects in Nanoparticle Composite Systems and Macrocrytals

G. Wilbs (2017), III, 230 pp

ISBN: 978-3-95806-233-7

Band / Volume 143

Etablierung eines Systems aus Cysteinmutanten der Phosphoglycerat-Kinase für Entfaltungsstudien mit Einzelmolekül-FRET

A. Schöne (2017), 137 pp

ISBN: 978-3-95806-237-5

**Schlüsseltechnologien /
Key Technologies
Band / Volume 143
ISBN 978-3-95806-237-5**

