



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Die SDS-induzierte Entfaltung des Aquaglyceroporins GlpF

Entfaltungstudien und Untersuchungen zur Rolle der Tryptophane im GlpF-Tetramer

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Margareta Trefz

geb. in Kirow

Mainz, 2019

D 77

Für meine Familie

“I almost wish I hadn't
gone down that rabbit-hole
- and yet - and yet -
it's rather curious, you know,
this sort of life!”

— Lewis Carol, *Alice's Adventures in Wonderland*

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Trefz, M.*, Klein, N.* and Schneider, D. (2019) Covalently linking oligomerization-impaired GlpF protomers does not completely re-establish wild-type channel activity, *Int. J. Mol. Sci.*, 20(4), 927 (*contributed equally)

Trefz, M., Keller, R., Vogt, M. and Schneider, D. (2018) The GlpF residue Trp219 is part of an amino-acid cluster crucial for aquaglyceroporin oligomerization and function, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 1860, 887-894

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen in Vorbereitung:

Schmüser, L., **Trefz, M.**, Roeters, S., Beckner, W., Pfaendtner, J., Woutersen, S., Bonn, M., Schneider, D. and Weidner, T., (2019) Relaxing the aquaporin X-ray structure in a membrane with surface vibrational spectroscopy and simulation, *J. Phys. Chem. Lett.*, Manuskript eingereicht.

Trefz, M., Maxeiner, K. and Schneider, D., (2019), SDS-induced unfolding of the tetrameric aquaglyceroporin GlpF reveals the presence of multiple unfolding stages. Manuskript in Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Membranen und Membranproteine	5
1.1.1 Biologische Membranen	5
1.1.2 Struktur integraler Membranproteine	6
1.2 Die Faltung α-helikaler Membranproteine	8
1.2.1 Vergleich mit der <i>in vivo</i> -Faltung löslicher Proteine.....	8
1.2.2 <i>In vitro</i> -Faltung α -helikaler Membranproteine	9
1.2.3 Das Drei-Stufen-Modell	10
1.2.3.1 <i>Membraninsertion und Sekundärstrukturausbildung</i>	11
1.2.3.2 <i>Helix-Helix-Wechselwirkungen</i>	11
1.2.3.3 <i>Die Rolle aromatischer Aminosäuren bei der Faltung von Membranproteinen</i>	13
1.2.3.4 <i>Oligomerisierung /Quartärstruktur</i>	14
1.3 Untersuchung der (Ent)faltung von Membranproteinen	14
1.3.1 Das Zweizustandsmodell der (Ent)faltung einfacher löslicher Proteine.....	14
1.3.2 Faltungsmodelle	20
1.3.3 Der Entfaltungsbegriff bei Membranproteinen.....	21
1.3.4 Vergleich der Entfaltung löslicher Proteine und Membranproteine.....	22
1.4 Das Aquaglyceroporin GlpF als Modell zur Untersuchung der Entfaltung eines oligomeren α-helikalen Membranproteins	25
1.4.1 Die Aquaporin-Familie	25
1.4.2 Die Tetramerisierung der Aquaglyceroporine	29
1.4.3 Untersuchungen zur Entfaltung des Aquaglyceroporins GlpF.....	30
2 Ziele der Arbeit	33
3 Material und Methoden	35
3.1 Laborgeräte	35
3.2 Materialien	36

3.3	Programme.....	36
3.4	Chemikalien.....	36
3.5	Kulturmedien und Puffer.....	37
3.6	Verwendete Kits	39
3.7	Marker und Größenstandards	39
3.8	Antikörper	40
3.9	Enzyme.....	40
3.10	Plasmide.....	40
3.11	Primer	40
3.12	Bakterienstämme	41
3.13	Molekularbiologische Methoden.....	41
3.13.1	Klonierung.....	41
3.13.1.1	<i>Ortsspezifische Mutagenese (site-directed mutagenesis).....</i>	41
3.13.1.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....</i>	42
3.13.1.3	<i>Agarosegelelektrophorese.....</i>	43
3.13.1.4	<i>DNA-Minipräparation.....</i>	43
3.13.1.5	<i>DNA-Konzentrationsbestimmung.....</i>	43
3.13.1.6	<i>DNA-Sequenzierung.....</i>	43
3.14	Mikrobiologische Methoden	44
3.14.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	44
3.14.2	Transformation	44
3.14.3	Kultivierung und Zellernte von <i>E. coli</i>	44
3.15	Biochemische Methoden.....	45
3.15.1	Isolierung von GlpF	45
3.15.1.1	<i>Zellaufschluss und schrittweise Isolierung der Membranfraktion von E. coli.....</i>	45
3.15.1.2	<i>Solubilisierung in Detergenz</i>	45
3.15.1.3	<i>Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC).....</i>	46
3.15.2	SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)-Analyse	46

3.15.3	Coomassie-Färbung	47
3.15.4	Membranpräparation	47
3.15.5	<i>Semi-Dry</i> Western Blot-Analyse mit immunochemischem Nachweis	48
3.15.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	48
3.15.6.1	<i>Absorption bei 280 nm</i>	48
3.15.6.2	<i>BCA-Test</i>	49
3.15.7	SDS-Titration	49
3.16	Biophysikalische Methoden	50
3.16.1	Fluoreszenzspektroskopie	50
3.16.2	Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie	52
3.16.3	<i>Stopped-Flow</i> -basierte spektroskopische Methoden	54
3.16.3.1	<i>In vivo</i> -Aktivitätsmessung von GlpF mittels statischer Lichtstreuung	55
3.16.3.2	<i>Kinetische Messung der Entfaltung von GlpF mittels Fluoreszenzspektroskopie</i>	56
4	Ergebnisse	59
4.1	Rolle der Tryptophane bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers	59
4.1.1	Mutationen der lipidzugewandten Tryptophane zeigen keine Änderung der GlpF-Tetramerstabilität	61
4.1.2	Untersuchungen des Tryptophan 42 in der Tetramerpore von GlpF	63
4.1.3	Die proteinzugewandten Tryptophane in GlpF sind relevant für die Aktivität und Stabilität des GlpF-Tetramers	65
4.1.3.1	<i>Das zentral gelegene Tryptophan 48 hat Einfluss auf die Stabilität und Aktivität von GlpF.</i>	65
4.1.3.2	<i>Der Austausch von Tryptophan 219 beeinflusst maßgeblich die Aktivität und Stabilität des GlpF-Tetramers</i>	67
4.2	Tryptophan 219: Relevanz für die Oligomerisierung und Funktion von GlpF	71
4.2.1	Tryptophan 219 ist in Aquaglyceroporinen hoch konserviert	71
4.2.2	Die Tryptophan 219-Umgebung ist für die Tetramerstabilität von GlpF essenziell	74
4.3	Untersuchung der SDS-induzierten Entfaltung von GlpF unter Gleichgewichtsbedingungen.	77
4.3.1	Die GlpF-Tryptophane werden bei Entfaltung in eine hydrophilere Umgebung exponiert ...	78

4.3.2	Die Entfaltung der Tertiärstruktur von GlpF lässt sich über die Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ verfolgen.....	79
4.3.3	Bereits geringe χ_{SDS} haben einen destabilisierenden Effekt auf den Faltungszustand des GlpF-Tetramers.....	81
4.3.4	Tertiär- und Quartärstruktur von GlpF entfalten bei unterschiedlichen χ_{SDS}	82
4.3.5	Die Veränderung von $\langle\lambda\rangle$ setzt nicht die Existenz eines GlpF-Tetramers voraus	84
4.3.6	Die Änderung von $\langle\lambda\rangle$ beruht auf einer Änderung der Trp 219-Umgebung.....	85
4.3.6.1	<i>GlpF W219A zeigt bei ansteigenden χ_{SDS} keine Änderung von $\langle\lambda\rangle$ auf</i>	85
4.3.6.2	<i>Die Änderung von $\langle\lambda\rangle$ beruht auf Änderungen der Fluoreszenz von Trp 219.....</i>	86
4.3.6.3	<i>Die partielle Entfaltung der Trp 219-Umgebung bedingt die Änderung von $\langle\lambda\rangle$.....</i>	87
4.3.7	Das Zentrum des GlpF-Tetramers und seine peripheren Bereiche weisen unterschiedliche Stabilitäten auf	89
4.3.8	Ansätze zur Rückfaltung von entfaltetem GlpF	91
4.3.8.1	<i>Monomerisiertes GlpF liegt nach SDS-Verdünnung erneut als Tetramer vor.....</i>	91
4.3.8.2	<i>Ent- und Rückfaltung von GlpF verlaufen bei unterschiedlichen χ_{SDS}</i>	93
4.4	Kinetische Untersuchungen zur Entfaltung von GlpF	97
4.4.1	Die Interaktion von GlpF mit SDS resultiert in einem rapiden Abfall der Fluoreszenzintensität	97
4.4.2	Der Chevronplot von k_2 weicht von dem Verlauf eines Zweizustands-Entfaltungsmechanismus ab	99
4.4.3	Die Interaktion einiger GlpF-Varianten mit SDS resultiert in einer atypischen Relaxation .	102
5	Diskussion	105
5.1	Einfluss der Tryptophane auf die Stabilität des GlpF-Tetramers.....	105
5.1.1	Die Tryptophane 76 und 215 sind für die Stabilität des GlpF-Tetramers nicht relevant.....	106
5.1.2	Trp 42 hat nur bedingt Einfluss auf die Tetramerstabilität von GlpF	108
5.1.3	Die zentrale Position von Trp 48 ist für die allgemeine Stabilität von GlpF relevant	109
5.1.4	Trp 219 hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität des GlpF-Tetramers.....	110
5.1.5	Zur Rolle der Tryptophane bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers	112
5.2	Die Rolle von Trp 219 im periplasmatischen GlpF-Vestibül	113

5.2.1	Trp 219 trägt zur Stabilisierung der Vestibülregion in GlpF bei.....	113
5.2.2	Ein Aminosäurecluster um Trp 219 stabilisiert das GlpF-Vestibül.....	115
5.2.3	Zur Funktion von Tryptophan 219 in GlpF.....	117
5.3	Zur Untersuchung der SDS-induzierten Entfaltung von GlpF unter „quasi“- Gleichgewichtsbedingungen	119
5.3.1	Die Entfaltung von GlpF ist unter den gegebenen Bedingungen nicht reversibel	119
5.3.2	Die Entfaltung löslicher Bereiche des GlpF-Vestibüls ist potenzielle Ursache für die Umgebungsänderung von Trp 219.....	121
5.3.3	Die SDS-induzierte Entfaltung von GlpF ist ein mehrstufiger Prozess.....	123
5.3.3.1	<i>Die Strukturebenen von GlpF weisen unterschiedliche Stabilitäten auf.....</i>	<i>123</i>
5.3.3.2	<i>GlpF wird auf löslicher und auf Transmembranebene destabilisiert.....</i>	<i>126</i>
5.4	Kinetik der SDS-induzierten Entfaltung von GlpF	131
5.4.1	GlpF entfaltet in mehreren Schritten, die unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen	132
5.4.2	Der Chevronplot von k_2 weist auf kinetische Intermediate und parallele Wege bei der Entfaltung von GlpF hin.....	134
5.4.3	Schlussfolgerung der kombinierten Modelle aus Kap. 5.3 und Kap. 5.4 zur SDS- induzierten Entfaltung von GlpF	141
6	Literaturverzeichnis.....	142
7	Abkürzungsverzeichnis	159
8	Abbildungsverzeichnis.....	162
9	Tabellenverzeichnis.....	165
10	Anhang	167
	Danksagung.....	179
	Lebenslauf.....	181

Zusammenfassung

Die Untersuchung der Faltung und Stabilität von Membranproteinen ist im Vergleich zur Analyse löslicher Proteine durch viele Faktoren erschwert. Aus diesem Grunde ist die Zahl untersuchter oligomerer α -helikaler Membranproteine gering, obwohl diese in Biomembranen besonders zahlreich vorkommen und als potenzielle *drug targets* für pharmazeutische Wirkstoffe von Interesse sind. In dieser Arbeit wurde das α -helikale, tetramere Membranprotein GlpF, ein Aquaglyceroporin aus *E. coli*, verwendet, um dessen Entfaltung sowie die Stabilisierung seines tetrameren Zustandes in Mizellenumgebung zu untersuchen. Aquaglyceroporine ermöglichen den Fluss von Wasser und linearen Polyalkoholen wie z.B. Glycerin über biologische Membranen und sind in allen Domänen des Lebens präsent.

Die in dieser Arbeit behandelten Problemstellungen lassen sich in zwei Abschnitte unterteilen:

Die Aminosäure Tryptophan (Trp) nimmt in Membranproteinen eine prävalente Rolle bei der Stabilisierung und Strukturausbildung ein. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit ist daher die potenzielle Beteiligung der Tryptophane bei der Stabilisierung des Tetramers von GlpF anhand unterschiedlicher GlpF-Varianten beschrieben. Die in physiologischer Umgebung lipidzugewandten Tryptophane weisen keine Relevanz für die Stabilität des GlpF-Tetramers auf. Die in das Innere des Proteins ragenden Tryptophane hingegen wirken maßgeblich auf die Stabilität des GlpF-Tetramers ein. Da der Einfluss dieser Tryptophane allgemeine Auswirkungen auf Stabilität und Aktivität des Gesamtproteins hat, besteht aber keine direkte Relevanz der ins Proteininnere ragenden Tryptophane für die Stabilität des GlpF-Tetramers.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse wurde die besondere Rolle von Trp 219, das in der periplasmatischen Vestibülregion von GlpF verortet ist, genauer analysiert. Laut Sequenzanalysen ist Trp 219 in Aquaglyceroporinen hoch konserviert, aber in einem Bereich lokalisiert, der in den ausschließlich wasserleitenden Aquaporinen vollständig fehlt. Mutationsstudien an Aminosäuren in Interaktionsreichweite zu Trp 219 weisen auf die Existenz eines überwiegend aromatischen Clusters hin, der von Aminosäuren des Loop C und der Helix 4 gebildet wird. Trp 219 stellt daher einen möglichen Fixpunkt im periplasmatischen Vestibül von GlpF dar, der für dessen Stabilisierung notwendig ist. Aufgrund seiner hoch konservierten Position könnte diese Funktion in allen Aquaglyceroporinen von Bedeutung sein.

Im zweiten Abschnitt wurde die SDS-induzierte Entfaltung von GlpF auf unterschiedlichen Strukturebenen betrachtet. Durch Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen des anionischen Detergenz SDS konnte die Entfaltung von GlpF in gemischten DDM/SDS-Mizellen induziert und nach Einstellen eines Gleichgewichtes spektroskopisch und mit Hilfe der seminativen SDS-PAGE

verfolgt werden. Die strukturelle Ursache der beobachteten Fluoreszenzänderung ist auf eine Änderung der Umgebung von Trp 219 zurückzuführen, die potenziell mit der Entfaltung der löslichen Loopregion von Loop C oder Loop E zusammenhängt. Diese Entfaltung findet bereits im GlpF-Tetramer statt, welches erst unter Einfluss höherer SDS-Konzentrationen monomerisiert. Als Konsequenz bildet sich bei der Entfaltung von GlpF unter gegebenen SDS-Konzentrationen ein Intermediat aus, welches als Tetramer vorliegt, aber eine partiell entfaltete Tertiärstruktur besitzt. Schon der Einfluss geringerer SDS-Konzentrationen weist auf eine Destabilisierung von GlpF hin, die unter zunehmenden SDS-Konzentrationen von der Tetramerperipherie gerichtet zum Tetramerkern verläuft. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Schema für die schrittweise Destabilisierung von GlpF unter dem Einfluss sukzessive ansteigender SDS-Konzentrationen erstellt. Ansätze zur Rückfaltung von GlpF weisen jedoch eine Hysterese zwischen Ent- und Rückfaltung auf und lassen daher auf einen irreversiblen Prozess schließen.

Die Kinetik der Entfaltung von GlpF nach Vermischen mit SDS wurde über *Stopped-Flow*-Messungen fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die Entfaltung verläuft in mehreren zeitlichen Phasen und lässt sich über zwei Geschwindigkeitskonstanten, $k_{1,2}$, charakterisieren, wobei k_2 die größere der beiden Konstanten darstellt und k_1 auf einen langsameren, parallelen Entfaltungsprozess schließen lässt. Der Verlauf von k_2 spricht für die Existenz eines möglichen Faltungsintermediats unter Einfluss geringerer SDS-Konzentrationen. Eine weitere Änderung des Verlaufs von k_2 deutet auf einen parallelen Entfaltungsweg hin, der möglicherweise mit der Dissoziation des GlpF-Tetramers korreliert. Die beobachteten Resultate wurden in einem Modell für eine Entfaltungslandschaft zusammengefasst, die eine mögliche zeitliche Entfaltung von GlpF bei ansteigenden SDS-Konzentrationen rekonstruiert. Die SDS-induzierte *in vitro*-Entfaltung von GlpF folgt einem komplexen Ablauf, der sich auf unterschiedlichen zeitlichen und räumlichen Ebenen abspielt und die potenzielle Ausbildung von Intermediaten beinhaltet.

Da Aquaglyceroporine strukturell hoch konserviert sind, sind die hier für GlpF gewonnenen Erkenntnisse zur SDS-induzierten *in vitro*-Entfaltung und Tetramerstabilität für alle Aquaglyceroporine von potenzieller Relevanz.

Abstract

Folding and stabilization of oligomeric α -helical membrane proteins is a current yet poorly investigated field of research. In this thesis, the SDS-induced *in vitro* unfolding of the tetrameric α -helical membrane protein GlpF was investigated. As an aquaglyceroporin, GlpF mediates the flux of water and glycerol across the *E. coli* inner membrane. Due to its well known structure and function, GlpF was chosen as a model for membrane protein folding experiments. Two focuses were set in the course of this work regarding membrane protein folding:

Firstly, the impact of tryptophan residues on the stability of the GlpF tetramer was investigated. Even though they are a major factor in driving helix-helix interactions and a key residue in hot spots of structure-forming interactions in general, the tryptophan residues of GlpF have not been found to play a particular role in tetramer stabilization. Yet one tryptophan residue, Trp 219, has been identified as key residue in stabilizing GlpF's periplasmic vestibule and therefore to be of crucial importance for the overall stability of GlpF.

Secondly, the SDS-induced *in vitro* unfolding of GlpF has been investigated kinetically as well as under almost-equilibrium conditions. My results indicate a complex multi-stage unfolding mechanism and the occurrence of unfolding intermediates as well as potential parallel unfolding pathways. Unfolding occurs not only on various structural levels, but is also divided between the unfolding of soluble regions as well as the dissociation of GlpF's transmembrane segments.

Although not completely understood, the here described results present an insight on the stability and SDS-induced unfolding pathways for GlpF and members of the aquaporin family in general.

1 Einleitung

Die wichtige Rolle von Membranproteinen im medizinisch-pharmazeutischen Bereich ist heutzutage unumstritten: Nahezu 60 % der zurzeit erhältlichen Arzneimittel wirken an Membranproteinen [1] und rund ein Drittel der im menschlichen Genom codierten Proteine sind Membranproteine [2]. Trotz ihres zahlreichen Auftretens und ihrer Relevanz, machen Membranproteine jedoch weniger als 1 % der zurzeit bekannten Proteinstrukturen aus [3]. Die Untersuchung der Struktur, Funktion und Interaktionen von Membranproteinen ist daher Gegenstand aktueller Forschung. Stabilisierende Faktoren und potenzielle Angriffspunkte für die zukünftige Entwicklung neuer Medikamente können mit Hilfe von Entfaltungsexperimenten an Membranproteinen bestimmt werden. Im Vergleich zu löslichen Proteinen ist die Faltung von Membranproteinen deutlich weniger gut verstanden. Ein Verständnis der grundlegenden Stabilisierungs- und Entfaltungsprozesse in Membranproteinen ist daher für ihre weitere Untersuchung essenziell.

1.1 Membranen und Membranproteine

1.1.1 Biologische Membranen

Die Abgrenzung unterschiedlicher Bereiche innerhalb einer biologischen Einheit (Kompartimentierung) war Voraussetzung für die Entstehung höherer Lebensformen [4]. Aus diesem Grund spielen Biomembranen eine prävalente Rolle als Barriere vor äußeren Einflüssen, in der Aufrechterhaltung diverser Konzentrationsgefälle und in der Abgrenzung verschiedener Reaktionsbereiche [5]. Eine Biomembran setzt sich zu unterschiedlichen Anteilen aus verschiedenen Lipidmolekülen zusammen: Glycerophospholipide, Sphingolipide, Glykolipide und Sterine stellen die wesentlichen Komponenten einer eukaryotischen Biomembran dar [6]; die Lipidzusammensetzung prokaryotischer Organismen wird von den Glycerophospholipiden Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin dominiert [7]. Durch die Veresterung zweier Acylreste mit Glycerin-3-phosphat, welches ebenfalls zusätzlich mit einem Aminoalkohol oder Kohlehydratrest verestert ist, erhalten Glycerophospholipide einen amphiphilen Charakter (Abbildung 1). Ihr zylindrischer Aufbau führt zur Entstehung einer planaren Lipiddoppelschicht, in der die hydrophoben Fettsäureschwänze zueinander und die hydrophilen Kopfgruppen in Richtung der löslichen Umgebung ausgerichtet sind (Abbildung 2). Zusammensetzung und Eigenschaften der Lipiddoppelschicht können sowohl innerhalb der unterschiedlichen Organismen, als auch innerhalb der Zelle variieren [8,9]. Die amphiphile Grundstruktur der Lipide (Abbildung 2) ist jedoch in allen Biomembranen gleich.

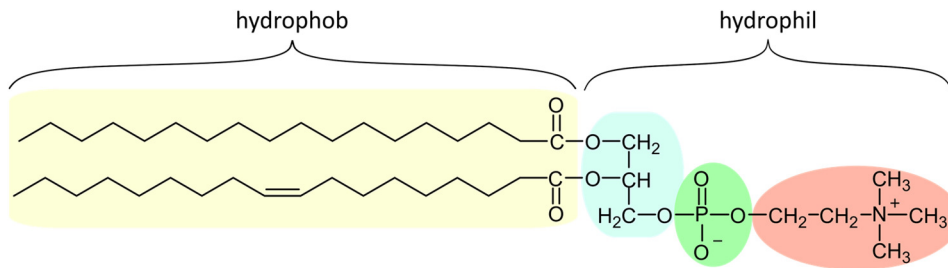


Abbildung 1: Aufbau eines Glycerophospholipids am Beispiel des Phosphatidylcholins. Die zwei Fettsäureketten (gelb) bilden den hydrophoben Teil des Phospholipids und sind über Hydroxylgruppen mit Glycerin-3-phosphat (Glycerin: blau; Phosphat: grün) verestert. Die Phosphatgruppe ist zusätzlich mit einem Cholin (rot) verestert. In anderen Glycerophospholipiden ist das Cholin durch einen anderen Aminoalkohol oder Kohlenhydratrest ersetzt.

Entgegen Abbildung 2 ist die Lipiddoppelschicht nicht strikt in hydrophobe und hydrophile Bereiche eingeteilt. Der Übergang verläuft graduell vom hydrophoben Zentrum in der Mitte in beide Richtungen über den Zwischenbereich, das sogenannte *interface*, zu den hydrophilen Kopfgruppen. Das *interface*, zu dem auch der hydrophile Kopfgruppenbereich gehört, weist je Seite eine Dicke von 15 Å auf [10] und nimmt dementsprechend einen Bereich der Dicke des hydrophoben Zentrums (ca. 30 Å) ein. Membrandurchspannende Segmente müssen daher sowohl an die Beschaffenheit des hydrophoben Kerns als auch an die der *interface*-Region angepasst sein.

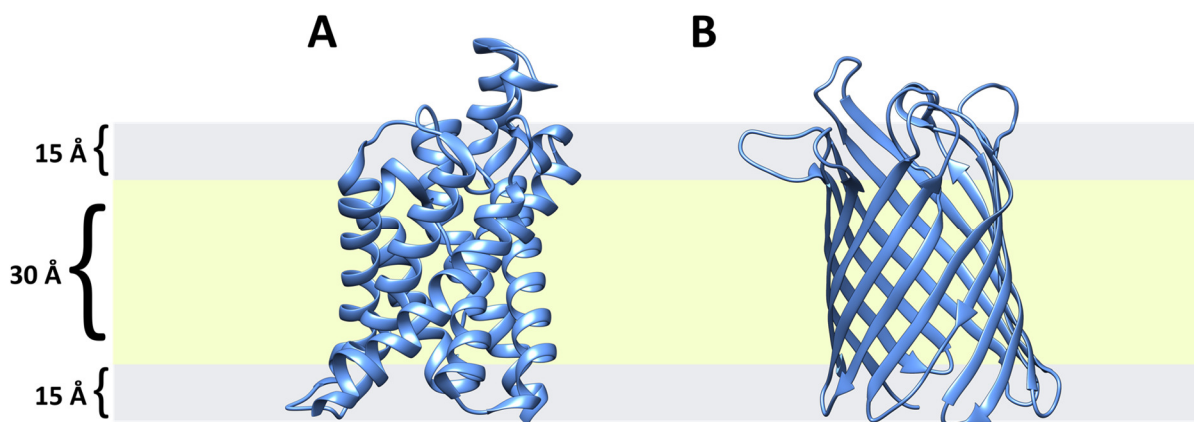


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lipiddoppelschicht mit integralen Membranproteinen. Der hydrophobe Kernbereich der Membran ist in Gelb, der Zwischenbereich (*interface*) in Grau dargestellt. Integrale Membranproteine kommen als (A) α -Helix-Bündel (z.B. GlpF, PDB-ID: 1FX8), oder als (B) β -Fässer (z.B. OmpG, PDB-ID: 2IWW) vor, die die Membran durchspannen.

1.1.2 Struktur integraler Membranproteine

Trotz der hydrophoben Barriere der Biomembran müssen die Passage löslicher Substanzen und die Weitergabe relevanter Signale für die jeweiligen Kompartimente (eukaryotische Zelle, Zellorganell, Bakterium) sichergestellt werden. Dies geschieht über eine Vielzahl an Proteinen, die in die Membran eingebettet sind oder diese durchspannen und als integrale Membranproteine bezeichnet werden. Im Gegensatz zu löslichen Proteinen sind integrale Membranproteine an eine

amphiphile Umgebung angepasst und entsprechend ihrer Funktion in der Membran orientiert. Integrale Membranproteine enthalten mindestens ein membrandurchspannendes Segment (bitope Membranproteine) und setzen sich aus α -Helices oder β -Faltblättern zusammen [11]. Polytope Membranproteine bilden nach der Membraninsertion α -Helix-Bündel (Abbildung 2 A) oder β -Fässer (Abbildung 2 B) aus; die Membraninsertion beider Strukturen wird dabei aufgrund der vollständigen Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrücken entlang des Peptidrückgrats innerhalb der α -Helix oder des β -Fasses energetisch begünstigt [12]. β -Fässer sind zylindrische Strukturen, die aus 8 bis 24 [5] parallel oder antiparallel zueinander angeordneten β -Faltblättern zusammengesetzt sind. Hydrophobe, der Lipidschicht zugewandte Aminosäureseitenketten alternieren mit polaren Seitenketten, welche in das Poreninnere zeigen [13]. Dies gewährleistet die Passage löslicher Substanzen durch die hydrophobe Membran. β -Fässer kommen in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und in eukaryotischen Mitochondrien und Chloroplasten vor und liegen größtenteils in Form von Porinen vor, die die Diffusion ungeladener gelöster Stoffe von bis zu 600 Da (z.B. von Mono- und Disacchariden) durch die äußere Membran ermöglichen [5,14,15].

α -Helikale-Membranproteine, welche im Fokus dieser Arbeit stehen, sind die am häufigsten vorkommenden Transmembranproteine [16]. Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, die parallel zur Helixachse verlaufen, führt bei α -Helices zu einer wendelförmigen Verdrehung der Polypeptidkette, die in einer rechtsgängigen Helix resultiert. Im Gegensatz zum β -Faltblatt, welches sich während der Insertion in die Membran zu einem β -Fass zusammenlagert, ist innerhalb der α -Helix die maximale Zahl der nichtkovalenten Bindungen erreicht, weshalb diese kompakte Form bereits nach der Sekundärstrukturausbildung inseriert werden kann [17]. Da der hydrophobe Teil einer Membran nur in der α -helikalen Konformation durchlaufen werden kann, sind α -Helices von Membranproteinen mit 20-30 Aminosäuren durchschnittlich deutlich länger als die α -Helices löslicher Proteine, welche im Durchschnitt aus 12 Aminosäuren bestehen [18,19]. α -helikale Membranproteine sind vielfältig in ihren Funktionen und kommen in der (inneren) Membran von Bakterien und den Plasmamembranen von Eukaryoten vor.

Der Aufbau integraler Membranproteine spiegelt ihre Anpassung an die amphiphile Lipidumgebung wider. Da integrale Membranproteine zu großen Teilen aus hydrophoben Bereichen bestehen können, geschehen Proteinbiosynthese, Insertion und Faltung ebenfalls im geschützten Milieu [20]. Auch lösliche Proteine bestehen aus hydrophoben Bereichen, die während der Proteinfaltung vor der löslichen Umgebung geschützt werden müssen, doch die posttranslationale Prozessierung und Faltung von löslichen und membranintegrierten Proteinen findet auf unterschiedliche Weise statt.

1.2 Die Faltung α -helikaler Membranproteine

1.2.1 Vergleich mit der *in vivo*-Faltung löslicher Proteine

Die Synthese löslicher Proteine findet in der Regel im Cytoplasma einer Zelle an nicht-membranassoziierten Ribosomen statt. Die Faltung eines Proteins wird von seiner Primärstruktur vorgegeben, weshalb einige, überwiegend kleine globuläre Polypeptide, spontan und bereits während ihrer sukzessiven Synthese am Ribosom in ihre native Struktur falten können [21]. Vor allem der hydrophobe Effekt, d.h. die maximale Assoziierung hydrophober Gruppen im naszierenden Protein, ist ein steuernder Faktor für die native Faltung eines Proteins [22,23]. Auch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken [24] und die Entstehung von van-der-Waals-Wechselwirkungen [25] sowie der Beitrag aromatischer Interaktionen [26] und Salzbrücken [27] sind zusätzliche Faktoren für die korrekte Faltung löslicher Proteine.

Durch die durchschnittlich hohe Proteinkonzentration in der Zelle (bis zu 250 g/L) sowie den verhältnismäßig langsamen Ablauf der Polypeptidsynthese (4-20 Aminosäuren pro Sekunde), besteht die Gefahr von Fehlfaltungen und der Ausbildung von Aggregaten im naszierenden Polypeptid, vor allem bei der Synthese längerer Peptidstränge [28]. Um dies zu verhindern, lagern sich cytoplasmatische Faltungshelfer, sog. Chaperone, an die hydrophoben Bereiche der naszierenden Polypeptidkette an und bewahren diese vor der Ausbildung unspezifischer Wechselwirkungen und Fehlfaltungen [29]. Die meisten Chaperone gehören zur Familie der Hitzeschockproteine (Hsp) und werden auch unter Stressbedingungen (z.B. durch thermischen Stress) vermehrt produziert [30]. Die Faltung mit Hilfe von Chaperonen findet (meist) unter Verbrauch von ATP statt und kann abhängig von der Komplexität des ungefalteten Proteins die Beteiligung weiterer Chaperone oder Kochaperone erfordern [31].

Die Faltung von Membranproteinen weicht in vielen Aspekten von der Faltung löslicher Proteine ab: Die Proteinbiosynthese eines Membranproteins erfolgt in Eukaryoten am Ribosom des rauen endoplasmatischen Retikulums, wohingegen in Prokaryoten das Ribosom an die Cytoplasmamembran der Zelle assoziiert ist. Die Integration und Faltung von Membranproteinen verläuft mithilfe eines komplexen oligomeren Proteins, dem Translocon, dessen grundlegende Prozesse in Pro- und Eukaryoten ähnlich sind [32]. In prokaryotischen Organismen besteht das Translocon in seiner Grundstruktur aus einem trimeren Porenkomplex, der über die Interaktion mit verschiedenen Untereinheiten die Membranintegration und -translokation bewirkt [5]. Es besteht sowohl aus membranintegrierten (SecYEG), als auch aus membranassoziierten (SecA) und cytoplasmatischen (SecB) Einheiten [5]. Die Funktion des Translocons spielt sich dabei in zwei Dimensionen ab: Neben der Membranintegration dient der Porenkomplex des Translocons auch

der sequenziellen oder kotranslationalen Passage des Polypeptids durch die Membran ins Periplasma oder in den Extrazellulärraum [33].

1.2.2 *In vitro*-Faltung α -helikaler Membranproteine

Die Membranintegration α -helikaler Membranproteine über das Translocon stellt einen hochkomplexen Ablauf dar, der das Wechselspiel zahlreicher Untereinheiten impliziert. Der Beitrag zusätzlicher zellulärer Faktoren zur korrekten Insertion, Faltung und Assemblierung von Membranproteinen sowie potenzielle Interaktionen mit der Membranumgebung erschweren die Untersuchung der Membranproteinfaltung *in vivo*. Aus diesem Grund ist die Untersuchung einzelner Aspekte der schrittweisen Membranproteinfaltung *in vitro* von besonderer Relevanz [34].

Membranproteine können sowohl miteinander als auch mit der Membranumgebung interagieren und werden von ihr beeinflusst [35,36]. Doch die Biomembran einer Zelle stellt kein homogenes Gebilde aus nur wenigen Komponenten dar: Verschiedene Lipidsorten unterschiedlicher Zusammensetzung, mögliche Lipopolysaccharide und membrangebundene Proteine können die Untersuchung von Membranproteinen erschweren [5]. Membranproteine werden typischerweise für *in vitro*-Untersuchungen in eine künstliche Membranumgebung, bestehend aus einer oder mehreren Lipid- oder Detergenzsorten, überführt. Detergenzien, meist amphiphile Moleküle mit polarer Kopfgruppe und nur einem hydrophoben Kohlenwasserstoffschwanz, können sich an die hydrophoben Transmembranregionen anlagern und nach Erreichen einer kritischen Konzentration (*critical micellar concentration*, CMC) Mizellen um das Protein ausbilden [37]. Dabei werden die Membranproteine aus der ursprünglichen Lipidumgebung gelöst (solubilisiert) und in die Detergenzumgebung aufgenommen. Diese Umgebung spiegelt nur bedingt die natürliche Membranumgebung wider und die beobachteten Faltungsmechanismen können sich von der tatsächlichen Biogenese in der Zelle maßgeblich unterscheiden [5]. Dennoch können durch *in vitro*-Experimente Informationen zu Faltungsschritten und stabilisierenden Faktoren gewonnen werden, die bei der tatsächlichen Faltung eines Membranproteins von Bedeutung sind. *In vitro*-Experimente waren auch für die Untersuchung grundlegender Mechanismen und Modelle und der reversiblen Faltung einiger Membranproteine von Bedeutung [38–44]. Basierend auf *in vitro*-Experimenten konnte das sog. Zwei-Stufen-Modell für die Faltung von Membranproteinen postuliert werden, welches später auf das Drei-Stufen-Modell erweitert wurde (Abbildung 3). Auch in dieser Arbeit wurden die Untersuchungen zur Stabilität des betrachteten Membranproteins weitestgehend *in vitro* durchgeführt.

1.2.3 Das Drei-Stufen-Modell

Ein etabliertes Modell, welches die Faltung von Membranproteinen beschreibt, ist das sogenannte Zwei-Stufen-Modell [45]. Dieses beruht auf der Annahme der Insertion und der Ausbildung einzelner α -helikaler Transmembransegmente in der ersten und einer anschließenden Assemblierung dieser Segmente in der zweiten Stufe (Abbildung 3). Diesem Modell liegt die Beobachtung zugrunde, dass Insertion (Schritt 1) und Faltung (Schritt 2) von Membranproteinen jeweils durch zwei verschiedene Faktoren gesteuert werden. Dieses Modell wurde später um einen dritten Schritt erweitert, der die Bindung prosthetischer Gruppen, die Faltung von Schleifenregionen und die Ausbildung von Oligomeren einbezieht (Drei-Stufen-Modell) [46]. Das Drei-Stufen-Modell kann zur thermodynamischen Betrachtung auch in weitere Stufen unterteilt werden [47].

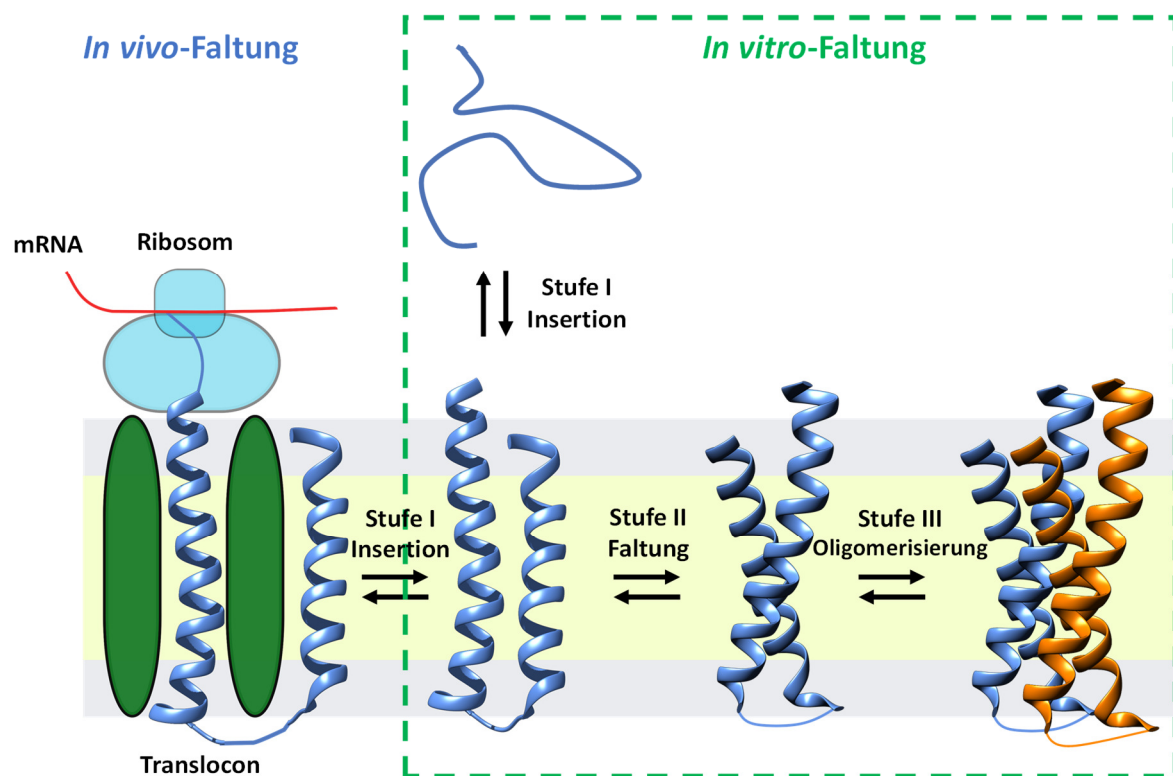


Abbildung 3: Das Drei-Stufen-Modell der Faltung α -helikaler Membranproteine.

Die Polypeptidkette wird *in vivo* am Ribosom synthetisiert und durch Andocken an den Translocon-Komplex (hier in Grün stark vereinfacht dargestellt) in die Membran eingeschleust. Dabei bildet sich die Sekundärstruktur der membraninsertierten Bestandteile aus. *In vitro* erfolgt zunächst die Sekundärstrukturausbildung eines hypothetisch vollständig entfalteten Polypeptidstranges. Die Insertion der Helices erfolgt in der ersten Stufe über den hydrophoben Effekt. In der zweiten Stufe finden die Faltung und Ausbildung der Tertiärstruktur statt. Die Oligomerisierung sowie der Einbau prosthetischer Gruppen und die Faltung extramembranärer Loop-Regionen bzw. von *re-entry* loops finden in einer potenziellen dritten Stufe statt. Verändert nach [48].

1.2.3.1 Membraninsertion und Sekundärstrukturausbildung

Der hydrophobe Effekt ist der entscheidende Faktor bei der Faltung löslicher Proteine [22,49]. Hydrophobe Bereiche lagern sich aneinander an, wohingegen lösliche Bereiche Wasserstoffbrücken mit der Umgebung ausbilden können. Die exponierte Oberfläche der unpolaren Bereiche des Proteins, die keine Wasserstoffbrücken ausbilden können, wird verringert, was in einem Anstieg der Umgebungsentropie resultiert. Auf diese Weise wird die Faltung löslicher Proteine angetrieben. Bei der Faltung von Membranproteinen kann der hydrophobe Effekt nach diesem Prinzip nicht maßgeblich sein. Im Gegensatz zu löslichen Proteinen weisen Membranproteine eine stark hydrophobe Proteinzusammensetzung im äußeren lipidzugewandten Bereich auf, der die Hydrophobizität des Inneren sowohl von Membran- als auch von löslichen Proteinen übertrifft [50]. Aus diesem Grund und aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Umgebung dieser beiden Proteingruppen, lässt sich die Faltung von Membranproteinen nicht über den hydrophoben Effekt erklären bzw. welcher überdies in der hydrophoben Membran nicht wirken könnte [50]. Der hydrophobe Effekt induziert jedoch die Insertion von Transmembransegmenten in die Membran und stellt damit den treibenden Faktor für die erste Stufe des Drei-Stufen-Modells, die Insertion, dar [37].

Das Gleichgewicht zwischen der energetisch günstigen Insertion hydrophober und der energetisch ungünstigen Insertion hydrophiler Bereiche in die Membran entscheidet über die Insertion einer α -Helix in der Membrenumgebung [33]. Das Insertionspotenzial einer Polypeptidkette hängt dabei von der Hydrophobizität der einzelnen Aminosäureseitenketten eines Polypeptidsegments ab, das mit Hilfe von Hydrophobizitätsskalen experimentell ermittelt werden kann [51–53]. Der energetische Aufwand, der sich durch die Insertion des polaren Polypeptidrückgrats ergibt, wird größtenteils durch die Ausbildung der α -helikalen Struktur und die damit verbundenen neu gebildeten intrahelikalen Wechselwirkungen kompensiert [54].

Nur wenige α -helikale Membranproteine können spontan in die Membran inserieren, weshalb die meisten von ihnen *in vivo* zunächst über das Translocon in die Membran integriert werden müssen (Abbildung 3)[55]. Da in *in vitro*-Experimenten zur Faltung eines Membranproteins in der Regel kein Translocon vorhanden ist, wird im Drei-Stufen-Modell das ungefaltete Protein als lösliche Polypeptidkette dargestellt. Dies ist eine hypothetische Darstellung, die der Veranschaulichung der unterschiedlichen Stufen dient. Ein löslicher, ungefalteter Zustand existiert bei α -helikalen Membranproteinen typischerweise nicht [55].

1.2.3.2 Helix-Helix-Wechselwirkungen

Nach Ausbildung der Transmembranhelices und Insertion in die Membran werden die Tertiär- und Quartärstruktur des Membranproteins durch unterschiedliche Wechselwirkungen

(van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoff- und Salzbrücken, aromatische Wechselwirkungen) gebildet [55]. Experimente an verschiedenen Varianten der B-Helix von Bacteriorhodopsin haben gezeigt, dass van-der-Waals-Wechselwirkungen von besonderer Relevanz bei der Faltung von Membranproteinen sind [56] und maßgeblich zur Stabilisierung der Gesamtstruktur beitragen. Da van-der-Waals-Wechselwirkungen nur über kurze Distanzen stabilisierend sind, tragen sie beim Aneinanderlagern benachbarter Helices (*helix packing*) maßgeblich zur Ausbildung der nativen Struktur bei [57,58]. Auch bei Interaktionen zwischen den interhelikalen Schleifenregionen untereinander und den prosthetischen Gruppen mit dem Protein wirken van-der-Waals-Wechselwirkungen strukturbildend. Durch das *helix packing* erfolgt eine Reduktion der Helix-Lipid-Interaktionen [55]. Dies führt zur Ausbildung relativ rigider helikaler Proteinstrukturen, die sich stetig von der flexiblen Lipidumgebung während der Faltung abgrenzen [5].

Helices werden über van-der-Waals-Wechselwirkungen nach dem *knobs into holes*-Prinzip über ihre zueinander komplementären Strukturen in räumliche Nähe gebracht [57,58]. Strukturelle Ausbuchtungen (*knobs*) in einer Transmembranhelix, gelegentlich auch verzweigte Aminosäuren wie z.B. Isoleucin oder Valin, werden durch Aussparungen (*holes*) in der Struktur der benachbarten Helix (über die Aminosäure Glycin) komplementiert. Spezifische Helix-Helix-Wechselwirkungen können auch mit Hilfe von Interaktionsmotiven ausgebildet werden: Das GxxxG-Motiv (x steht hierbei für eine beliebige Aminosäure, G für Glycin), welches ebenfalls zu einer *knobs into holes*-vermittelten Helix-Helix-Interaktion führt, kommt in den Transmembranhelices von Membranproteinen besonders häufig vor [59]. Nicht nur die Anwesenheit des GxxxG-Motivs, sondern auch die Beschaffenheit seiner direkten Sequenzumgebung sind für eine GxxxG-vermittelte Interaktion relevant [60]. Abwandlungen dieses Helix-Dimerisierungsmotivs mit anderen kleinen Aminosäuren wie Alanin anstelle von Glycin sind ebenfalls vorzufinden ((klein)xxx(klein)-Motiv) [61]. Kleine Aminosäuren sind daher an Interaktionsbereichen von Transmembranhelices prozentual besonders zahlreich vertreten, da durch sie ein enger Kontakt zwischen zwei identischen Helices ermöglicht wird [62]. Auch polare Aminosäuren können Teil von Dimerisierungsmotiven (wie beispielsweise bei TxxxSxxxG [63]) sein. Im sog. *leucine zipper*-Motiv, das bei der Interaktion löslicher *coiled-coil*-Strukturen eine Rolle spielt, wird jede vierte Position eines siebenstelligen Helix-Wiederholungsmotivs (*heptad repeat*) von einem Leucin, Isoleucin oder Valin eingenommen [64]. Die Rolle vom *leucine zipper*-Motiven als Helix-Dimerisierungsmotiv in Membranproteinen ist nicht geklärt [65], obwohl *leucine zipper*-ähnliche Motive in manchen Fällen die Ursache für Helix-Helix-Interaktionen zu sein scheinen [66,67].

Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken über entsprechende Aminosäuren (Thr, Tyr, Asp, Asn, Glu, Gln und Ser) kommt bei der Ausbildung von Helix-Helix-Wechselwirkungen in Membranproteinen ebenfalls vor [68–71], ist aber nicht häufig [72]. Die Ausbildung von Salzbrücken zwischen geladenen Aminosäuren (Asp, Glu, Arg, Lys) verschiedener Helices sind ebenfalls nur vereinzelt vorhanden [73], obgleich diese Wechselwirkungen in hydrophoben Umgebungen besonders stark sind. Grund für ihre geringe Relevanz ist der hohe energetische Aufwand, der bei der Insertion dieser Aminosäureseitenketten in die Membran anfallen würde [51].

1.2.3.3 Die Rolle aromatischer Aminosäuren bei der Faltung von Membranproteinen

Aromatische Aminosäuren können auf unterschiedliche Weise zur Helix-Helix-Assoziation beitragen, da sie sowohl über van-der-Waals-Wechselwirkungen als auch über hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und aromatische π -stacking Wechselwirkungen wirken können [74]. Letztere können über eine Distanz von bis zu 7 Å wirken [75] und durch lokale Akkumulation mehrerer aromatischer Aminosäuren (*aromatic clustering*) in diesem Interaktionsradius maßgeblich zur Assoziierung und Stabilisierung von Transmembranhelices beitragen [76–78]. Die aromatische Aminosäure Tryptophan kommt statistisch besonders häufig in Membranproteinen vor und ist vor allem im *interface* der Lipiddoppelschicht vorzugsweise auf der Außenseite der Membran [79] zu finden. Es wird angenommen, dass Tryptophane in Membranproteinen als Lipidanker dem sogenannten *hydrophobic mismatch*, d.h. der unerwünschten Diskrepanz zwischen der Länge membrandurchspannender Proteinbereiche und der Dicke der Membran, entgegenwirken [80–85]. Auf diese Weise bildet Tryptophan zusammen mit Tyrosin in vielen Membranproteinen einen *aromatic belt* (aromatischer Gürtel), der das Protein entlang der Lipidgrenzfläche radial umgibt [86,87].

Im Zusammenhang mit Helix-Helix-Wechselwirkungen wird die Rolle der Tryptophane ebenfalls diskutiert: Versuche an Transmembranhelix-Paaren (abgeleitet von der Struktur löslicher *leucine zipper* Domänen [61]) haben gezeigt, dass Tryptophane vor allem in Sequenzen mit hoher helikaler Interaktionsaffinität vorkommen und für ebendiese verantwortlich sind [80]. Diese Affinität korreliert stark mit der Position des Tryptophans in der Helix-Struktur, die aber auch von der Beschaffenheit seiner umgebenden Aminosäuren abhängig ist. Diese und weitere Versuche [74] lassen auf eine wichtige Rolle von aromatischen Aminosäuren, insbesondere von Tryptophan, bei der Ausbildung und Stabilisierung der Tertiärstruktur von Membranproteinen schließen.

1.2.3.4 Oligomerisierung /Quartärstruktur

Die dritte Stufe des Drei-Stufen-Modells erfasst die Integration prosthetischer Gruppen und die Faltung und ggf. Membraninsertion von Loop-Regionen, aber auch die Oligomerisierung der im zweiten Schritt gefalteten Untereinheiten eines Membranproteins [88,89]. Die Ausbildung oligomerer Strukturen ist eine Eigenschaft, die oft in Membranproteinen verbreitet ist [88]. Membranproteine sind durch ihre Position in der Membran räumlich eingeschränkt, können aber aufgrund dieser eingeschränkten Orientierung mit Untereinheiten über nicht-kovalente Bindungen einfacher interagieren [90]. Bei obligatorischen Oligomeren ist die Oligomerisierung für die Funktion des Proteins unabdingbar; fakultative Oligomere sind (bzw. wären) auch im monomeren Zustand aktiv [91]. Bei letzteren kann die Ausbildung oligomerer Einheiten die Stabilität und Rigidität von Membranproteinen erhöhen, Abbau und Denaturierung verlangsamen und zusätzliche allosterisch regulierte Funktionen ermöglichen [92].

Die Ausbildung oligomerer Einheiten bei Membranproteinen kann, ähnlich wie die der Helix-Helix-Wechselwirkungen, über bestimmte Interaktionsmotive, wie z.B. das (klein)xxx(klein)-Motiv oder das *leucine zipper*-Motiv, stattfinden [65,93]. Die Ausbildung und die Stabilität der entsprechenden Oligomere ist zusätzlich von den Aminosäuren abhängig, die die Interaktionsmotive umgeben, sowie von der Wechselwirkung mit der Lipidumgebung [60,94]. Diese Faktoren variieren innerhalb der Proteinklassen und können auch für jedes Protein individuell ausfallen, um die Oligomerisierung mit strukturell verwandten, aber unterschiedlichen Proteinen zu verhindern.

1.3 Untersuchung der (Ent)faltung von Membranproteinen

1.3.1 Das Zweizustandsmodell der (Ent)faltung einfacher löslicher Proteine

Die (Ent)faltung eines Proteins aus seinem nativen in den ungefalteten Zustand wird über die Änderung seiner Stabilität beobachtet. Die Stabilität eines Proteins bezeichnet allgemein die Resistenz gegenüber dem Einfluss denaturierender physikalischer oder chemischer Einflüsse [95]. Als Maß der thermodynamischen Stabilität eines Proteins dient die Änderung der Gibbs'schen freien Energie ΔG , welche sich aus der Differenz der Gibbs'schen freien Energien G des ungefalteten und des nativen Zustandes des Proteins bestimmen lässt [96]. Diese setzt sich entsprechend Formel (I) aus der Änderung einer enthalpischen und entropischen Komponente (bei konstanter Temperatur) zusammen.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (I)$$

Wobei gilt: H: Enthalpie, kcal/mol; T: Temperatur, K; S: Entropie, kcal/mol.

Die Änderung der Enthalpie ΔH beschreibt in diesem Zusammenhang die freigegebene oder aufgenommene Wärme, die sich durch das Entstehen oder Aufbrechen von Bindungen während der (Ent)faltung ändert. Bei der Faltung eines löslichen Proteins nimmt die Entropie des Protein-Systems ab, die Entropie des umgebenden Systems hingegen zu; bei Entfaltung trifft der umgekehrte Fall zu. Die Entropie ist ein Maß für die möglichen Zustände bzw. Konformationen oder Freiheitsgrade, die ein Protein einnehmen kann [97]. Die aus diesen Komponenten bestehende Änderung der freien Energie ΔG ist negativ, wenn die Faltung oder Entfaltung eines Proteins spontan abläuft.

Das ungefaltete Protein kann in verschiedenen Konformationen vorliegen, wohingegen meist nur ein gefalteter Zustand des Proteins existiert, weshalb die Entropie während der Faltung sukzessive abnimmt [95]. Der native Faltungszustand ist meist zugleich der thermodynamisch stabilste Zustand, den das Protein unter physiologischen Bedingungen einnehmen kann [98]. Aus diesem Grund befindet sich die Gibbs-Energie im nativen Zustand in einem globalen Minimum. Zustände, die energetisch in der Nähe des Minimums liegen, werden ebenfalls in geringen Mengen populiert [5]. Dadurch können Fluktuationen zwischen dem energetisch niedrigsten Zustand und seinen benachbarten Zuständen stattfinden [5]. Dennoch ist die Energiedifferenz ΔG bzw. die Stabilität zwischen dem ungefalteten und dem nativen Zustand aus physiologischer Sicht nicht groß (ca. 1-15 kcal/mol) [99], da Zellen imstande sein müssen, Proteine abzubauen und zu synthetisieren und Flexibilität für ihre Funktion zu gewährleisten [100].

Das einfachste Modell der Entfaltung eines kleinen globulären Proteins (Molekulargewicht bis 20 kDa) kann als eine chemische Reaktion dargestellt werden, dessen nativer (N) bzw. entfalteter (U, *unfolded*) Zustand das Edukt bzw. das Produkt repräsentieren [95]. Diesem Fall weist das Protein ein sogenanntes Zweizustandsverhalten (*two-state behaviour*) auf [101,102].



Wobei gilt: N: Nativer Zustand; U: Entfalteter Zustand; k_u : Entfaltungsrate; k_f : Rückfaltungsrate.

Nach (II) liegt das Protein nur im nativen oder entfalteten Zustand vor (Abbildung 4). Die Geschwindigkeitskonstante oder Rate k_f , mit der ein Protein von seinem entfalteten U Zustand in seinen nativen Zustand N gelangen kann, hängt von der Energiedifferenz $\Delta G_{U-\ddot{U}}$ zwischen dem entfalteten Zustand und dem Übergangszustand (\ddot{U}) ab. Analog wird die Geschwindigkeit der Entfaltung über die Differenz $\Delta G_{N-\ddot{U}}$ zwischen dem nativen und dem Übergangszustand bestimmt. Die Überwindung dieses Zustandes (oder auch mehrerer solcher Zustände) stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer Proteinfaltung dar (Abbildung 4). ΔG beschreibt die Netto-Energiedifferenz, die nach Überwinden des Übergangszustandes zwischen entfaltetem und nativem Zustand besteht.

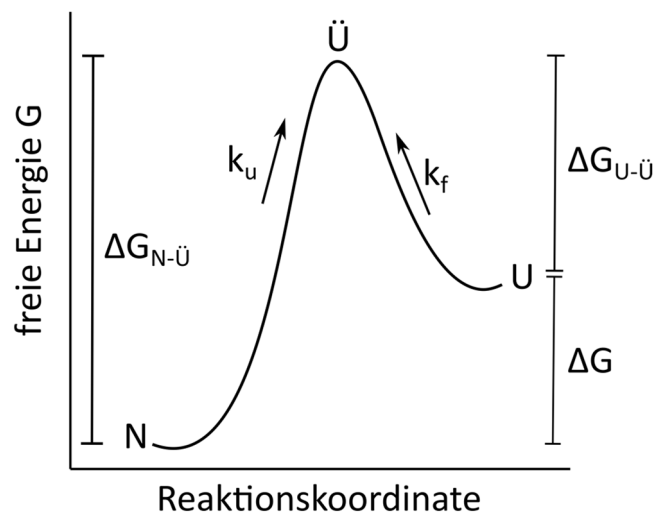


Abbildung 4: Beispiel der Energielandschaft einer Entfaltung entsprechend dem Zweizustandsmodell.

Die Gibbs'sche freie Energie G eines nativen (N) Proteins ändert sich im Laufe der Entfaltung des Proteins in seinen entfalteten Zustand (U). Bei der Entfaltung wird der hochenergetische Übergangszustand (\ddot{U}) über die Energiedifferenz $\Delta G_{N-\ddot{U}}$ überwunden. Die entgegengesetzte Reaktion, die Rückfaltung des Proteins, muss eine Energiedifferenz $\Delta G_{U-\ddot{U}}$ überwinden. Die Geschwindigkeitskonstante k_u gibt die Geschwindigkeit der Entfaltungsreaktion, die Konstante k_f die Geschwindigkeit der entgegengesetzten Faltungsreaktion wieder. Die Stabilität des Proteins wird über die resultierende Energiedifferenz ΔG zwischen dem nativen und entfalteten Zustand ausgedrückt.

Das Verhältnis zwischen den Konzentrationen des entfalteten und nativen Zustandes bzw. das Verhältnis zwischen den Geschwindigkeitskonstanten k_f und k_u wird über die Gleichgewichtskonstante K ausgedrückt [97]. Über die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K lässt sich die Energiedifferenz ΔG einer (Ent)faltungsreaktion ermitteln.

$$\frac{[U]}{[N]} = \frac{k_u}{k_f} = K \quad (III)$$

Wobei gilt: [U]: Konzentration des entfalteten Zustandes; [N]: Konzentration des nativen Zustandes; k_u : Entfaltungsrate; k_f : Rückfaltungsrate; K: Gleichgewichtskonstante der (Ent)faltungsreaktion.

Die Entfaltung von Proteinen wird unter kinetischen (Vorgleichgewicht) und unter Gleichgewichtsbedingungen beobachtet. Untersuchungen unter Gleichgewichtsbedingungen geben Auskunft über Parameter, die die Stabilität eines Proteins charakterisieren und dem Vergleich mit anderen Proteinen dienen [103]. Kinetische Untersuchungen sind für die Detektion möglicher Intermediate relevant, die sich während der Entfaltung ausbilden können und somit Aufschluss über den Verlauf der Entfaltung geben [104]. Beide Messverfahren fließen in die Rekonstruktion der Faltung und Entfaltung von Proteinen ein und können bei der Suche stabilisierender und destabilisierender Faktoren der Protein(ent)faltung eingesetzt werden. Die Beobachtung der Entfaltung eines Proteins unter Gleichgewichtsbedingungen findet über die Analyse ihrer Entfaltungskurve statt [105,106]. In Abbildung 5 A ist der Anteil f_N des gefalteten (oder f_u des ungefalteten) Proteins gegen die Konzentration der denaturierenden Substanz aufgetragen. Anstelle von f_N wird auch oft ein messbarer Parameter (z.B. die Fluoreszenzintensität) angegeben, der proportional zum Anteil des gefalteten Proteins ist.

Die Entfaltungskurve besitzt üblicherweise einen sigmoidalen Verlauf, da sich im Bereich hoher bzw. niedriger Denaturanskonzentrationen das Gleichgewicht zwischen gefaltetem und ungefaltetem Protein nur gering verändert, sich jedoch im Zwischenbereich das Gleichgewicht signifikant ändert. Die Steigung m ist hierbei ein Maß für die Kooperativität des Entfaltungsprozesses, wohingegen der Wendepunkt c_m (*denaturant concentration at midpoint*) der Entfaltungskurve die Denaturanskonzentration angibt, bei der die entfaltete und die native Spezies in gleichen Konzentrationen vorliegen.

Zur Darstellung der Kinetik der Entfaltung eines Proteins wird hingegen der sogenannte Chevronplot verwendet [95,107,108], in dem der Logarithmus der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} gegen die Konzentration der denaturierenden Substanz aufgetragen ist. k_{obs} wird über die Anpassung einer Exponentialfunktion an den Verlauf der Ent- oder Rückfaltungskurve einer (Ent)faltungsmessung bestimmt. Da die Entfaltung des Proteins einem dynamischen chemischen Gleichgewicht entspricht, setzt sich die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} für jede Messung aus der Summe der

Geschwindigkeitskonstanten der Ent- und Rückfaltung bei entsprechender Denaturanskonzentration zusammen [103]:

$$k_{obs} = k_f + k_u \quad (IV)$$

Wobei gilt: k_{obs} : gemessene Geschwindigkeitskonstante der beobachteten Entfaltung, s^{-1} ; k_f : Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung, s^{-1} ; k_u : Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung, s^{-1} .

In Abbildung 5 B ist der typische Verlauf eines Chevronplots einer Entfaltung nach dem Zweizustandsmodell (siehe (II), Abbildung 4) gezeigt. Der linke Arm des Chevronplots wird als (Rück)faltungsarm, der rechte Arm als Entfaltungsarm bezeichnet. Die Datenpunkte der entsprechenden Arme werden aus Rückfaltungs- bzw. Entfaltungsexperimenten generiert, da k_{obs} nur bei deutlichen Signaländerungen zuverlässig bestimmt werden kann und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei geringen Änderungen der Ent- und Rückfaltung zu klein ist. Folglich wird das gemessene k_{obs} des Rückfaltungsarms von k_f dominiert, wohingegen k_{obs} des Entfaltungsarms von k_u dominiert wird. Das Minimum gibt die Konzentration an, bei der $k_u = k_f$ gilt. Damit entspricht im Zweizustandsmodell das Minimum des Chevronplots dem Wendepunkt (c_m) der oben erwähnten Entfaltungskurve, die unter Gleichgewichtsbedingungen aufgenommen wird (vgl. c_m in Abbildung 5 A und B). Der V-förmige Verlauf des Chevronplots ergibt sich aus der linearen Abhängigkeit des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten k_f und k_u von der Konzentration des Denaturans. Es gilt:

$$\log k_f = \log k_f^0 - m_f [D] \quad (V)$$

$$\log k_u = \log k_u^0 + m_u [D] \quad (VI)$$

Durch Kombination der Formeln (V) und (VI) ergibt sich die allgemeine Formel für den gesamten Chevronplot:

$$\log k_{obs} = \log(k_f + k_u) = \log(k_f^0 * 10^{-m_f [D]} + k_u^0 * 10^{m_u [D]}) \quad (VII)$$

Wobei gilt: k_{obs} : gemessene Geschwindigkeitskonstante, s^{-1} ; k_f : Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung, s^{-1} ; k_f^0 : Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturans, s^{-1} ; m_f : Proportionalitätskonstante der Rückfaltungsgeschwindigkeit/ Steigung des Rückfaltungsarms im Chevronplot; k_u : Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung, s^{-1} ; k_u^0 : Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturans, s^{-1} ;

m_n : Proportionalitätskonstante der Entfaltungsgeschwindigkeit/Steigung des Entfaltungsarms im Chevronplot; $[D]$: Denaturationskonzentration.

Abweichungen von der typischen Form des Chevronplots (z.B. in Form von gebogenen Rück- oder Entfaltungsarmen oder einer Verschiebung des Minimums) deuten auf einen abweichenden Verlauf der Entfaltung des Proteins hin, der nicht der einfachen Entfaltung nach dem Zweizustandsmodell entspricht. Auch wenn Membranproteine aufgrund ihrer Membranumgebung komplexere Strukturen als lösliche Proteine aufweisen können, konnten Entfaltungsprozesse nach dem einfachen Zweizustandsmodell auch bei Membranproteinen beobachtet werden [109,110]. Komplexere Faltungsmechanismen können beispielsweise ein oder mehrere Intermediate enthalten, um die das Zweizustandsmodell dann gegebenenfalls erweitert werden muss.

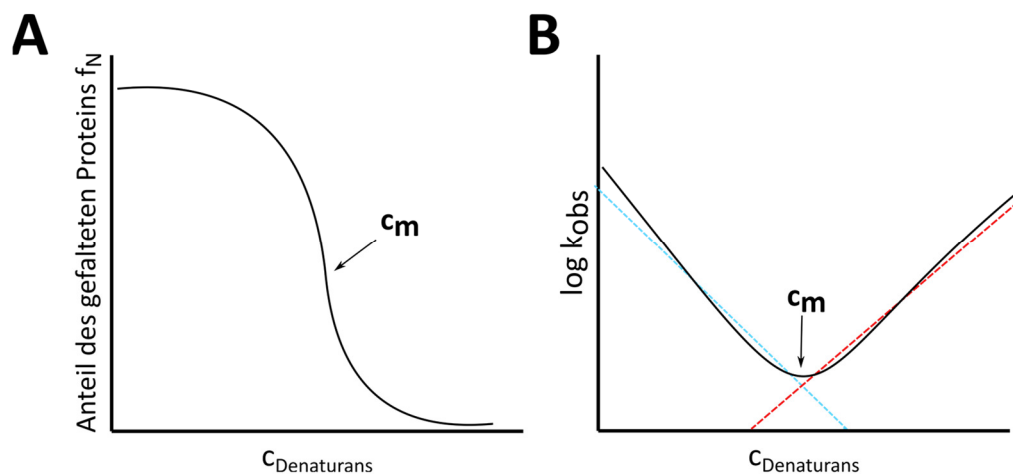


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Entfaltungskurve unter Gleichgewichtsbedingungen und eines Chevronplots einer (Ent)faltung nach dem Zweizustandsmodell. (A) Die Entfaltungskurve eines Proteins zeigt die konformationsbedingte Änderung eines Proteins über die Änderung eines repräsentativen Parameters. Diese Änderung wird durch den Einfluss ansteigender Denaturationskonzentrationen induziert, das Signal wird nach dem Einstellen des Gleichgewichtes aufgenommen. Die Entfaltungskurve besitzt einen sigmoidalen Übergang, dessen Wendepunkt c_m die Denaturationskonzentration im Gleichgewicht anzeigt, an dem nativer und entfalteter Zustand zu gleichen Teilen vorliegen. (B) Der Chevronplot charakterisiert den (Ent)faltungsweg, der vor Einstellen des Gleichgewichts zurückgelegt wird. Aus dem Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten beider Messungen ergibt sich ein winkelförmiger Verlauf (*chevron*, schwarz). Die Geschwindigkeitskonstanten werden über die Signaländerung bei Ent- (rot) und Rückfaltung (blau) des Proteins ermittelt. Der Schnittpunkt des Chevronplots c_m entspricht der Denaturationskonzentration, bei der die Faltungsrate k_f der Entfaltungsrate k_u entspricht. Diese stimmt im Zweizustandsmodell mit dem c_m -Wert der Entfaltungsmessung unter Gleichgewichtsbedingungen (siehe (A)) überein. Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von Denaturans können die Geraden des Entfaltungs- (rot) und Rückfaltungsarmes (blau) extrapoliert werden (hier nur angedeutet).

1.3.2 Faltungsmodelle

Die Darstellung der (Ent)faltung eines Proteins über die sequenzielle, hierarchische Abfolge möglicher Zwischenschritte (ähnliche einer Reaktionsgleichung, siehe Gleichung (II)) wird als klassische Betrachtungsweise (*classical view*) der Proteinfaltung bezeichnet [111,112]. Passend dazu konnten in *in vitro*-Experimenten das entfaltete Protein Ribonuklease A erneut spontan in einen funktionsfähigen, spektroskopisch von der nativen Form nicht unterscheidbaren Zustand zurückgefaltet werden [113]. Diese Resultate deuten auf die reversible, wegunabhängige Faltung eines Proteins in seinen finalen, nativen Zustand aus einer großen Anzahl denaturierter Zustände hin. Die Information für die gefaltete Struktur eines Proteins ist bereits demnach in dessen Primärstruktur enthalten. Das globale Energieminimum des Proteins (der gefaltete Zustand) ist daher wegunabhängig.

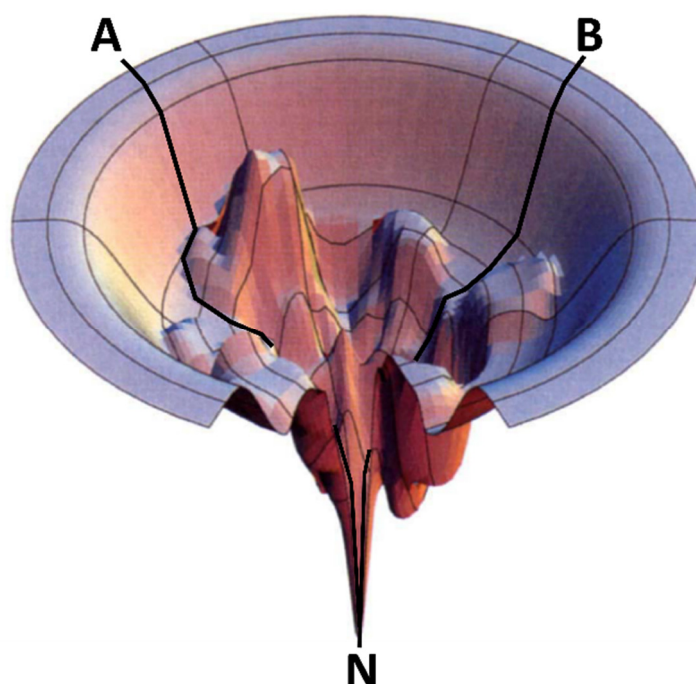
Da der native Zustand eines Proteins einzigartig ist, würde die Suche nach diesem in der Menge denaturierter Zustände sehr viel Zeit in Anspruch nehmen. Das sogenannten Levinthal-Paradoxon schließt daher die Möglichkeit der Faltung eines Proteins durch das zufällige „Ausprobieren“ potenzieller Anordnungen der beteiligten Aminosäuren aus [114]: Eine Polypeptidkette bestehend aus 150 Aminosäuren würde nach der ursprünglichen Vorstellung bis zu 10^{24} Jahre benötigen, bis die Kombination aus verschiedenen Aminosäureseitenketten sowie ihrer möglichen Konformationen (z.B. aufgrund verschiedener Rotationswinkel) zur nativen Form führen würde (Unter der Annahme, dass je Aminosäure nur zwei Konformationen möglich sind und eine Konformationsänderung einen Zeitraum von 10^{-13} s einnimmt) [115]. Die Faltung eines Proteins muss daher als gesteuerter bzw. gerichteter Prozess verlaufen [116].

Um beide Modelle – die des ungerichteten Faltens unabhängig von der Konformation des entfalteten Zustandes und die des gerichteten, wegabhängigen Faltens, welches schnell geschieht – zu vereinen, wurde eine neue Sichtweise (*new view*) vorgeschlagen [111,117]. Diese sieht die Faltung als ein Durchlaufen einer trichterförmigen Energielandschaft (Abbildung 6). Der native Zustand wird nicht mehr als ein „Energieloch“, d.h. als ein punktuell Minimum in einem flachen Feld aus möglichen denaturierten Zuständen gesehen (ähnlich zu Loch in einem Golfplatz), sondern als der niedrigste Punkt in einer trichterförmigen Energielandschaft betrachtet, die ein ungefaltetes Protein in Richtung des nativen Zustandes durchläuft, wobei es graduell stabilere Konformationen einnimmt (Abbildung 6). Auf diese Weise kann die Faltung von unterschiedlichen Positionen (d.h. mit unterschiedlichen Konformationen) am Rand des Faltungstrichters beginnen und dennoch gerichtet zum nativen Zustand verlaufen. So entfällt die Entscheidung über eine pfadabhängige oder pfadunabhängige Faltung. Mit diesem Modell lässt sich auch die Existenz paralleler Faltungswege erklären, die unterschiedliche Ausgangspunkte haben und unter

bestimmten Bedingungen bevorzugt werden. Der Faltungstrichter besitzt keine glatte Oberfläche, die direkt zum Minimum, dem nativen Zustand führt, sondern ist durch eine zerklüftete Landschaft aus energetischen Erhöhungen und Tälern gekennzeichnet, durch die sich das faltende Protein einen Weg bahnt (Abbildung 6). Die Erhöhungen stellen dabei Übergangszustände dar, die ein Protein während der Faltung überwinden muss, um zum nativen Zustand zu gelangen. Täler hingegen sind die Intermediate, die auf dem Weg zum nativen Zustand populierte werden. Die Zugabe von denaturierenden Substanzen kann die „Tiefe“ des Faltungstrichters herabsetzen und somit den entgegengesetzten Weg aus dem Trichter heraus, die Entfaltung, begünstigen.

Abbildung 6: Faltungstrichter-Modell zur Beschreibung der graduellen Faltung von Proteinen. Die Gibbs'sche freie Energie wird über die Tiefe, die Anzahl der Freiheitsgrade (mögliche Konformationen) über die Breite des Trichters dargestellt. Die Faltung kann aus einer Vielzahl ungefalteter Zustände (z.B. aus Zustand A und B) erfolgen und über unterschiedliche parallele Faltungswege ablaufen. Die Berge der zerklüfteten Landschaft des Trichters stellen besonders hohe energetische, zu überwindende Übergangszustände, die Senken mögliche Faltungsintermediate dar. Mit fortschreitender Faltung verringert sich die Anzahl der möglichen Konformationen und das Protein geht in die stabilste, die native Konformation (N) über, die sich im Energieminimum befindet.

Entnommen und verändert aus [117].



Über die hier vorgestellten Modelle hinaus gibt es noch zahlreiche weitere Faltungsmodelle, die in vielen Fällen Anwendung finden [118–121]. In dieser Arbeit wurde allerdings in erster Linie auf die oben beschriebenen Modelle für die Interpretation der Entfaltung von GlpF zurückgegriffen.

1.3.3 Der Entfaltungsbegriff bei Membranproteinen

Nach Tanford beschreibt die Denaturierung eines Proteins eine maßgebliche Änderung seiner ursprünglichen nativen Struktur, ohne dabei Einfluss auf seine Primärstruktur und ihre kovalenten Bindungen zu nehmen [101]. Diese Definition ist allerdings nicht universell und wird in der

Literatur unterschiedlich verwendet. Häufig gilt der Begriff der Entfaltung eines Proteins als Synonym für dessen Denaturierung. In anderen Arbeiten bezeichnet die Entfaltung nur die partielle und nur einige Bereiche betreffende Auflösung der Tertiärstruktur eines Proteins, bei der das Protein nicht bis zur Primärstruktur dissoziiert [55]. Besonders für α -helikale Membranproteinen ist eine genaue Trennung beider Begrifflichkeiten – der Entfaltung und der Denaturierung – relevant [33]. Die α -helikale Sekundärstruktur eines Membranproteins wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidbindungen ausgebildet. Die ungesättigten Wasserstoffbrückendonoren sind durch die entstandene α -helikale Struktur gebunden. Dadurch wird der energetische Aufwand der Insertion in die Membran maßgeblich verringert. Die in dieser Umgebung generierte Struktur ist aus diesem Grund besonders stabil. Das Aufbrechen der Bindungen einer membranintegrierten Transmembranhelix würde einen enormen energetischen Aufwand bedeuten, weswegen der membraninsetierte Teil eines α -helikalen Membranproteins auch unter denaturierenden Bedingungen meist in seiner helikalen Form bleibt [122,123]. Aus diesem Grund denaturieren α -helikale Membranproteine nicht entsprechend der oben genannten Definition bis zu ihrer Primärstruktur, sondern werden meist maximal bis zu ihrer Sekundärstruktur entfaltet. Darüber hinaus erschwert die Existenz einer natürlichen oder künstlichen Membranumgebung den Zugang denaturierender Substanzen zur Transmembranregion der Membranproteine.

In dieser Arbeit wird die Entfaltung eines Membranproteins als das Auflösen seiner Quartär- und Tertiärstruktur definiert. Die Entfaltung kann auch nur auf einzelne Bereiche innerhalb des Proteins begrenzt sein und zur Denaturierung dieser Bereiche führen, sofern es sich um lösliche Bereiche des Proteins handelt. Ein vollständig entfaltetes Membranprotein weist nach der Definition in dieser Arbeit immer noch Sekundärstrukturelemente in seiner Transmembranregion auf. Ein denaturiertes Membranprotein hingegen ist vollständig (Primärstruktur) entfaltet.

1.3.4 Vergleich der Entfaltung löslicher Proteine und Membranproteine

Die grundlegenden Mechanismen der Proteinfaltung wurden durch Entfaltungsexperimente an kleinen löslichen Proteinen etabliert: In der Regel wird die Denaturierung eines Proteins durch die Erhöhung der Temperatur bzw. durch die Zugabe denaturierender Substanzen induziert und mit Hilfe spektroskopischer Methoden verfolgt [103]. Ein Anstieg der Temperatur führt dabei zur Erniedrigung der enthalpischen und entropischen Bestandteile der Gibbs'schen freien Energie, was in einer Abnahme von ΔG resultiert.

Bei der chemischen Entfaltung werden Substanzen eingesetzt, die die entfaltenen Konformationen des löslichen Proteins stabilisieren und auf diese Weise die freie Gibbs'sche Energie verringern. Chaotrope Substanzen wie Guanidiniumchlorid (GdCl) und Harnstoff, destabilisieren interne

nicht-kovalente Bindungen und können auf diese Weise den hydrophoben Effekt, den treibenden Faktor der Faltung löslicher Proteine, schwächen [95]. Diese Substanzen binden mit erhöhter Affinität an ungefaltete Bereiche, indem sie Wasserstoffbrücken mit geladenen Aminosäureseitenketten und Carbonylgruppen ausbilden, aber auch die Wasserlöslichkeit von unpolaren Seitenketten und Rückgratgruppen erhöhen [95]. Das Gleichgewicht der Faltung wird zugunsten des ungefalteten Zustandes verschoben und die Bereiche des ursprünglich hydrophoben Kerns im Protein in die wässrige Umgebung verlegt. Der Einsatz chaotroper Substanzen führt typischerweise zum Verlust der Tertiär- sowie der Sekundärstruktur des Proteins.

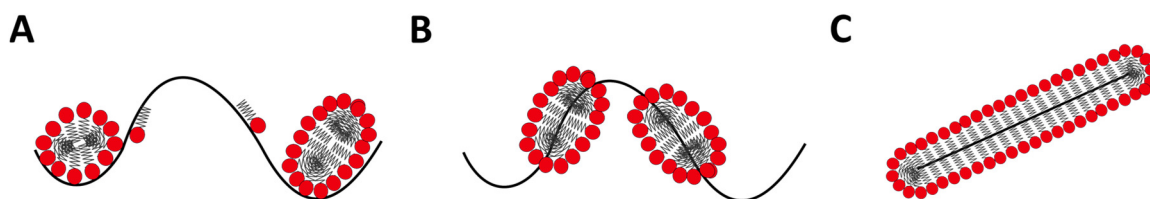


Abbildung 7: Schematische Darstellung der möglichen SDS-induzierten Denaturierung löslicher Proteine.

Das denaturierte Protein ist als schnurförmiger schwarzer Polypeptidstrang dargestellt. Die negativ geladene Kopfgruppe von SDS ist in Rot gezeigt. (A) Nach dem *decorated-micelles*-Modell winden sich spezifische Regionen des denaturierenden Proteins um die geladenen Kopfgruppen des SDS. (B) Im *pearl-necklace*-Modell lagern sich die hydrophoben Alkylketten des SDS knäuelartig um hydrophobe Regionen des Proteins und verhindern dadurch native Interaktionen, was in der Denaturierung des Proteins resultiert. (C) Im *rod-like micelle*-Modell wird das denaturierte Protein von den hydrophoben Ketten des SDS vollständig umschlossen. Verändert aus [95].

Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) wird ebenfalls zur Denaturierung löslicher Proteine verwendet, weist aber einen anderen Bindungsmechanismus als die vorgestellten chaotropen Substanzen auf (Abbildung 7): Aufgrund seines amphiphilen Charakters kann es sowohl mit den geladenen Aminosäureseitenketten der Polypeptidkette interagieren als auch hydrophobe Wechselwirkungen mit aliphatischen und aromatischen Aminosäuren eingehen. Letztere Interaktion leistet einen begünstigenden entropischen Beitrag, da hydrophobe Bereiche von der löslichen Umgebung abgeschirmt werden [95]. Basierend auf diesen Wechselwirkungen kann SDS entweder vereinzelte hydrophobe Ansammlungen (*cluster*) um die hydrophoben Bereiche des Proteins ausbilden (*pearl-necklace*-Modell, [124]) oder von der sich entfaltenden Polypeptidkette entlang der geladenen Kopfgruppen umwunden werden (*decorated micelles*-Modell, [125]). Eine weitere Anordnung ist das *rod-like micelle*-Modell [126], in dem das entfaltete Protein vollständig von den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten des SDS umschlossen ist.

Die für lösliche Proteine üblicherweise eingesetzten Substanzen zur chemischen Denaturierung haben nur einen geringen Einfluss auf die Entfaltung der vergleichsweise stabilen membranintegrierten Komponenten der α -helikalen Membranproteine (siehe Kap. 1.3.3). Aus diesem Grund wird häufig das anionische Detergenz SDS zur Untersuchung der Entfaltung von Membranproteinen *in vitro* nach der Methode von Lau und Bowie verwendet [127]. Zum in nicht-ionischen, milden Detergenz solubilisierten Membranprotein wird SDS in jeweils ansteigender Konzentration hinzugegeben. Die SDS-induzierte Entfaltung weicht von der in löslichen Proteinen ab [55,95]: SDS bildet sogenannte gemischte Mizellen mit dem Detergenz, in dem das Membranprotein bereits solubilisiert vorliegt, und übt eine destabilisierende Wirkung auf das Protein in der Mizelle aus, was zur Entfaltung des Membranproteins führt. Dabei lässt sich nur schwer feststellen, wie viele der eingesetzten SDS-Moleküle tatsächlich gemischte Mizellen mit dem ursprünglichen Detergenz ausbilden, weswegen der vorhandene SDS-Molenbruch (χ_{SDS}) im Verhältnis zum Gesamtdetergenz der Probe anstatt der eingesetzten SDS-Konzentration angegeben wird [127]. Der auf diese Weise berechnete Anteil an SDS liegt dabei in guter Näherung zum experimentell bestimmten Anteil an SDS in den gemischten Mizellen [127].

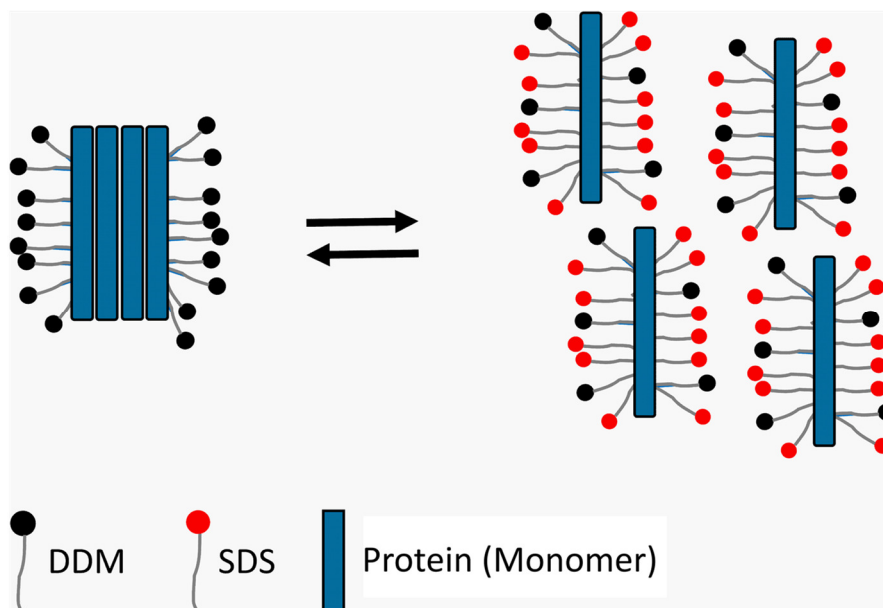


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Ausbildung gemischter DDM/SDS-Mizellen am Beispiel der Entfaltung eines tetrameren Proteins.

Die hydrophoben Transmembranregionen des Proteins sind vom neutralen Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) umgeben. Durch Zugabe von SDS entstehen gemischte SDS/DDM-Mizellen. Durch die Aufrechterhaltung der hydrophoben Umgebung wird die Sekundärstruktur der Transmembranregionen stabilisiert. Die Quartärstruktur sowie die Tertiärstruktur (hier nicht sichtbar) entfalten hingegen. Auf diese Weise kann die Entfaltung eines Membranproteins in einer weitestgehend membranähnlichen Umgebung analysiert werden. Anders als hier dargestellt sind die Detergenzmoleküle tatsächlich nicht gleichmäßig um das Protein verteilt, sondern bilden „Klumpen“ um die hydrophoben Regionen des Proteins.

Durch den Einsatz eines Detergenz (SDS) als denaturierende Substanz bleibt die membranähnliche Umgebung in den gemischten Mizellen auch bei der Entfaltung des Membranproteins im Grunde erhalten. Somit wird eine Entfaltung induziert, die der natürlichen Entfaltung im membrangebundenen Protein im Hinblick auf die Umgebung der hydrophoben Transmembranregionen weitestgehend entspricht. Experimente an Membranproteinen haben gezeigt, dass SDS Membranproteine destabilisiert, ohne ihre Sekundärstruktur zu entfalten [55]: Neben der bereits erwähnten hohen Stabilität α -helikaler Strukturen in Membranen kommt der amphiphile Charakter von SDS hinzu, der die hydrophoben Bereiche des Membranproteins, ähnlich zu anderen Detergenzien, zusätzlich stabilisiert. Eine Denaturierung der Sekundärstruktur findet daher typischerweise nur in den löslichen Regionen statt, die sich nicht in der hydrophoben Umgebung befinden. Es wird vermutet, dass SDS-Moleküle zwischen den Helices eines α -helikalen Membranproteins binden und somit Helix-Helix-Wechselwirkungen spalten [128]. Auch wenn die genauen Mechanismen der Destabilisierung noch nicht im Detail geklärt sind, konnte die SDS-induzierte Entfaltung bis heute zur erfolgreichen Aufklärung vieler membranproteinspezifischer Fragestellungen beitragen [43,56,129].

1.4 Das Aquaglyceroporin GlpF als Modell zur Untersuchung der Entfaltung eines oligomeren α -helikalen Membranproteins

1.4.1 Die Aquaporin-Familie

Die Aquaporine sind eine Klasse selektiver Kanalproteine, die dem erleichterten bidirektionalen Durchfluss von Wasser über eine Membran dienen [130]. Die Unterfamilie der Aquaglyceroporine ermöglicht zusätzlich die Passage von kleinen polaren Substanzen, wie z.B. Glycerin [131]. Aquaporine und Aquaglyceroporine (in dieser Arbeit zusammen als Aqua(glycero)porine bezeichnet) kommen sowohl in Bakterien als auch in höheren Organismen vor und können entsprechend ihrer Funktion im jeweiligen Organismus nach Substratspezifität und Durchflusgeschwindigkeit variieren [132]. Die polytopen α -helikalen Transmembranproteine weisen ein Molekulargewicht von 26 bis 34 kDa auf und sind in ihrer Struktur hoch konserviert [133]. Die substratleitende Pore wird durch eine Anordnung aus sechs Helices und zwei Halbhelices gebildet, welche über fünf Schleifenregionen verbunden sind, die aus der Membran ragen (Abbildung 9). Auf diese Weise bilden sie ein rechtsgängiges α -Helixbündel, welches sich sanduhrenförmig zur Membranmitte verjüngt (Abbildung 10 A). Drei Helices sowie eine der Halbhelices stellen dabei eine Domäne dar, welche durch eine punktsymmetrische Anordnung der zweiten Domäne im Protein wiederholt wird, auch wenn C- und N-Terminus der Aqua(glycero)porine beide auf der intrazellulären Seite der Membran lokalisiert sind (Abbildung

9). Diese *inverted repeat*-Wiederholung ist häufig in Membranproteinen zu finden und geht vermutlich auf eine Genduplikation zurück, die im Laufe der Evolution stattgefunden hat [134]. Die beiden Halbhelices interagieren in der Membran über van-der-Waals-Wechselwirkungen der Prolin- und Alaninseitenketten hoch konservierter NPA-Motive (Asparagin, Prolin und Alanin), die an den N-Termini der einander zugewandten Halbhelices lokalisiert sind (Abbildung 9).

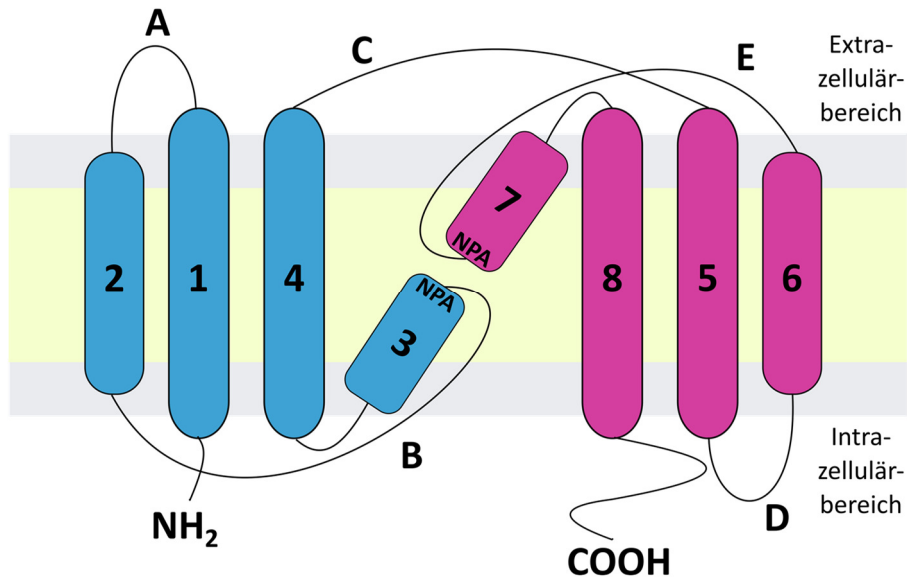


Abbildung 9: Topologiemodell des Aquaglyceroporins GlpF als Beispiel für die Topologie von Aqua(glycero)porinen.

Die repetitiven Domänen sind in Blau bzw. Pink dargestellt. Jede Domäne besteht aus drei Transmembranhelices (TM 1, 2, 4 bzw. TM 5, 6, 8) sowie einer Halbhelix (TM 3 und TM 7). Die NPA-Motive sind an den gegenüberliegenden Halbhelices lokalisiert. Die Helices sind über die Loop-Regionen A-E miteinander verbunden. N- und C-Terminus sind auf der gleichen Seite, der intrazellulären Seite, lokalisiert.

Alle Mitglieder der Aqua(glycero)porin-Familie liegen als Homotetramere vor (Abbildung 10 B) und bilden daher eine zusätzliche Pore im Zentrum des Tetramers, obwohl die funktionale Einheit des Proteins, die wasser- und substratleitende Pore, bereits durch das Monomer gebildet wird. Die Struktur der substratleitenden, amphipathischen Pore ist an die Substrate der entsprechenden Aqua(glycero)porine angepasst, besitzt aber einige grundlegende Charakteristika, die alle Aquaglyceroporinen gemein haben. Diese sollen hier exemplarisch für das Aquaglyceroporin GlpF aufgeführt werden, welches die Passage von Wasser sowie von Glycerin und anderen linearen Polyalkoholen durch die innere Membran von *E. coli* ermöglicht [135] (Abbildung 11). Der periplasmatische Kanaleingang ist von einer Vestibülregion umgeben, die sich durch lange Schleifenregionen auszeichnet und dem erleichterten Abfangen von Glycerinmolekülen sowie der Dehydratisierung des Substrates dient [136]. Diese ist im Vergleich zu den ausschließlich wasserleitenden Aquaporinen in Aquaglyceroporinen besonders ausgeprägt [137]. Aufgrund des geringen Durchmessers der Pore kann das Glycerin nur im dehydratisierten

Zustand den Kanal passieren, weshalb bereits im Vestibül die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Glycerin und seiner löslichen Umgebung durch Wasserstoffbrücken zwischen Glycerin und den polaren Seitenketten der Aminosäuren des Aquaglyceroporins ersetzt werden. Über den 15 Å breiten Kanaleingang kann das Glycerin in den verengten Bereich des Kanals gelangen, welcher einen Durchmesser von 2,8 Å hat und den Selektivitätsfilter des Aquaglyceroporins darstellt [138] (Abbildung 11). Dieser wird im Fall von GlpF von den vier Aminosäuren Trp 48, Gly 199, Phe 200 und Arg 206 gebildet. Die beiden aromatischen Aminosäuren Trp 48 und Phe 200 sind für die Ausbildung einer hydrophoben Tasche notwendig, in die das Kohlenstoffgerüst des Glycerins eingelagert werden kann. Die Seitenkette von Arg 206 sowie die Carbonylsauerstoffe an Phe 200 und Gly 199 bilden als Protonendonator bzw. -akzeptoren Wasserstoffbrücken mit den entsprechenden Hydroxylgruppen des Glycerins aus [135]. Durch diesen Selektivitätsfilter kann das Glycerin nur in einer definierten Orientierung und nur im dehydratisierten Zustand das Aquaglyceroporin passieren.

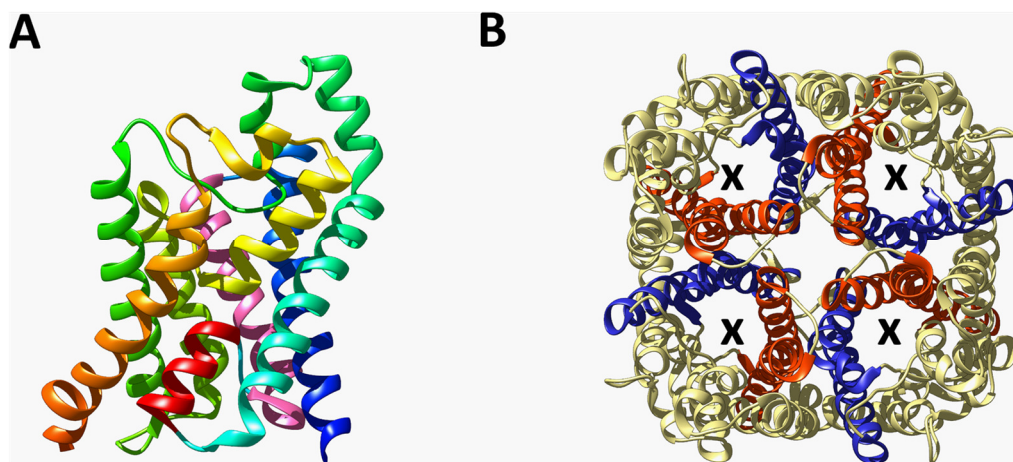


Abbildung 10: Das Aquaglyceroporin GlpF.

(A) Seitenansicht des GlpF-Monomers, bestehend aus sechs Helices und zwei Halbhelices (rot und gelb), an dessen gegenüberliegenden Enden die hochkonservierten NPA-Motive lokalisiert sind. Die Helices sind gegeneinander verdreht und geben dem Monomer dadurch eine sanduhrförmige Struktur. (B) Periplasmatische Aufsicht eines GlpF-Tetramers. Die Transmembranhelices 1 und 2 (rot) sind durch Interaktion mit den Helices 5 und 6 (blau) für die Tetramerisierung des Proteins verantwortlich. Obwohl durch die Tetramerisierung eine zentrale Pore ausgebildet wird, verläuft der Substratfluss über die Monomerporen (x). PDB-ID: 1FX8

Auf Höhe des NPA-Motivs befindet sich ebenfalls eine Engstelle, bei der die Ausbildung von Wasserstoffbrücken über Asn 203, Asn 68 und His 66 die Passage von Glycerin koordiniert. Die amphipathische Anordnung des Selektivitätsfilters setzt sich über ein hoch konserviertes Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen im Kanal fort, dessen eine Seite aus hydrophoben Aminosäuren besteht, die mit dem Kohlenstoffgerüst von Glycerin wechselwirkt, wohingegen die hydrophile Seite über polare Seitenketten und die Carbonylgruppen der Peptidbindungen mit den

Hydroxylgruppen von Glycerin interagiert. Auf diese Weise kann das Glycerin durch sukzessives Lösen und Ausbilden von Wasserstoffbrücken im dehydrierten Zustand den Kanal durchqueren. Diese strukturelle Anordnung ermöglicht die Passage von Glycerin und von Polyalkoholen, deren OH-Gruppen die gleiche stereochemische Anordnung besitzen (z.B. von Ribitol) [135]. Die Passage entsprechender nicht-stereoisomerer Polyalkohole (z.B. von D-Arabitol) ist hingegen stark eingeschränkt [135].

Im Gegensatz zu den Aquaporinen ist die Permeabilität von Wasser in Aquaglyceroporinen stark reduziert, da Wasser den Kanal nur in geordneter Reihenfolge passieren kann und Interaktionen durch Koordinierung mit anderen Wassermolekülen nur in Aquaporinen ausbilden kann [139]. Für den Erhalt des Protonengradienten in der Zelle ist darüber hinaus die Inhibition des Protonenflusses durch die Pore der Aqua(glycero)porine besonders relevant [140]: Die Dehydratisierung von Protonen würde einen zu hohen energetischen Aufwand bedeuten, welcher durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit dem Protein nicht kompensiert werden kann. Darüber hinaus werden die Wassermoleküle, die als Protonenakzeptoren für den Protonentransport notwendig wären, über die kontinuierliche Lösung und Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Aminosäureseitenketten des Proteins okkupiert, was die Ausbildung einer Protonentransportkette durch das Aqua(glycero)porin verhindert. Um den bidirektionalen Glycerinfluss in eine Richtung zu begünstigen, wird das Glycerin im Cytoplasma der *E. coli*-Zellen über die Glycerinkinase GlpK sofort enzymatisch zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert [141]. Auf diese Weise wird der Rückfluss des Glycerins verhindert.

Es wird vermutet, dass Aqua(glycero)porine in allen Organismen vorzufinden sind [142]. Bakterien besitzen jeweils mindestens ein klassisches Aquaporin (AqpZ in *E. coli*) und ein Aquaglyceroporin (GlpF in *E. coli*), pflanzliche Aquaglyceroporine sind in besonders großer Zahl vorhanden und der menschliche Organismus enthält 13 Mitglieder der Aquaglyceroporin-Familie (Aquaporine AQP0, 1, 2, 4, 5, 6, 8, Aquaglyceroporine AQP3, 7, 9, 10 und die unorthodoxen Aquaporine AQP11 und 12), die in unterschiedlichen Organen vorkommen [142]. Die meisten humanen Aqua(glycero)porine sind im menschlichen Organismus für die Regulation des Wasserhaushalts verantwortlich. In der Niere beispielsweise sind mehrere Aquaglyceroporine aktiv, die für die Konzentration des Urins und für die Resorption des Wassers von Bedeutung sind [143–146]. Aufgrund ihrer Relevanz im menschlichen Organismus stehen Mutationen von Aqua(glycero)porinen im Zusammenhang mit schwerwiegenden Krankheiten, wie z. B. Hirnödemen [147,148], Katarakt [149] oder nephrogenem *diabetes insipidus* [150,151]. Untersuchungen zur Struktur, Stabilität und Funktion von Aqua(glycero)porinen haben folglich

auch eine medizinisch-physiologische Relevanz und können zum besseren Verständnis der Ursachen und zur Behandlung Aqua(glycero)porin-spezifischer Krankheiten beitragen.

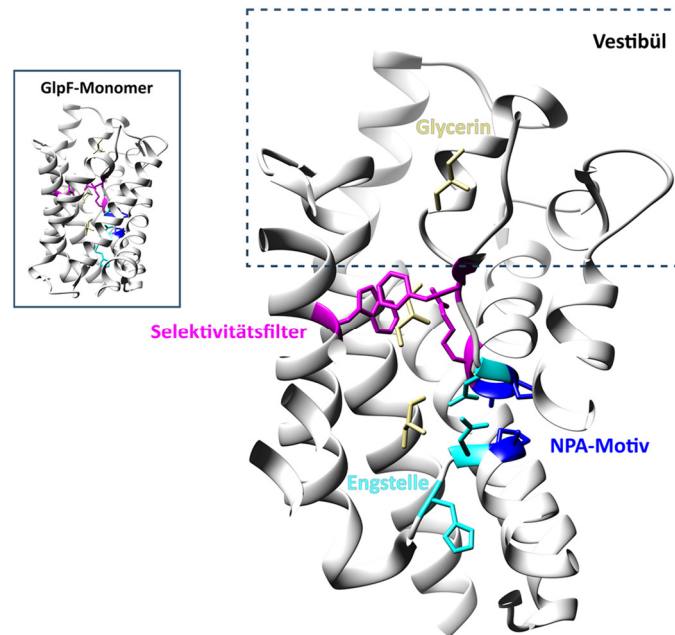


Abbildung 11: Funktionale Bestandteile von GlpF.

Das Glycerin wird über die Vestibülregion - ähnlich einem Trichter - in die Pore des GlpF-Monomers geleitet. Im Selektivitätsfilter (pink) kann das Glycerin nur in einer Orientierung die Engstelle passieren. Über eine weitere Engstelle (hellblau), die Teil des NPA-Motivs ist (blau), wird die Passage von GlpF koordiniert. Auf diese Weise wird die Passage von Glycerin und Polyalkoholen durch die Membran ermöglicht, dessen OH-Gruppen die gleiche stereochemische Anordnung besitzen. PDB-ID: 1FX8.

1.4.2 Die Tetramerisierung der Aquaglyceroporine

Aqua(glycero)porine liegen in biologischen Membranen als Homotetramere vor [152,153] (Abbildung 10 B). Die funktionale Einheit der Aquaporin-Familie wird aber durch das Monomer gebildet, weshalb Aqua(glycero)porine fakultative Oligomere darstellen [91]. Obwohl ein Zusammenhang zwischen dem oligomeren Zustand und der Aktivität in Aquaglyceroporinen nachgewiesen werden konnte, ist der genaue Grund für die Ausbildung von Tetrameren bei Aquaglyceroporinen ungeklärt [91,154]. Ebenfalls unbekannt ist die Funktion der zentralen Pore, die bei der Ausbildung des Tetramers entsteht: Es wird spekuliert, dass diese, ähnlich zu AQP5, mit Lipid gefüllt sein könnte [155]. Andere Theorien vermuten eine leitende Funktion gasförmiger Moleküle (CO₂, NO) [156,157], was allerdings kontrovers diskutiert wird [158]. Bei Versuchen am Aquaglyceroporin GlpF wurde für das Tetramer eine erhöhte *in vivo*-Stabilität sowie eine erhöhte Rigidität im Vergleich zum Monomer nachgewiesen [91,159]. Auch konnten Untersuchungen an fusionierten pflanzlichen NTAQP-Tetrameren eine Kooperativität der Aktivität der einzelnen Monomere belegen [160], der in ähnlicher Form für das Aquaporin AQP0 gefunden wurde [161–163].

Die Ausbildung des Tetramers findet in erster Linie über van-der-Waals-Wechselwirkungen an den Tetramer-Interaktionsflächen zwischen Helix 1 und 5 und zwischen Helix 2 und 6 statt (Abbildung 10 B). Diese Interaktionen funktionieren nach dem *knobs into holes*-Prinzip (siehe Kap. 1.2.3.4), sind aber nicht durch konservierte Interaktionsmotive charakterisiert. Lediglich das sogenannte *(small)xxx(smaller)*-Motiv (small = kleine Aminosäure Gly, Ala, Thr oder Ser; x = beliebige Aminosäure) findet sich oft in Aquaglyceroporinen wieder, sowie *leucin zipper*-ähnliche Motive, die besonders häufig in Membranproteinen vorkommen [65]. Diese Motive variieren allerdings zwischen den jeweiligen Aquaglyceroporin-Spezies, vermutlich um die Ausbildung von Heterotetrameren zu verhindern. Auch konnte eine Rolle polarer Wechselwirkungen durch geladene Aminosäuren als Faktor bei der Stabilisierung von des GlpF-Tetramers nachgewiesen werden [159].

1.4.3 Untersuchungen zur Entfaltung des Aquaglyceroporins GlpF

Der *glycerol uptake facilitator* GlpF ist ein Aquaglyceroporin mit einem Molekulargewicht von 29 kDa je Monomer. Im Jahr 2000 wurde die Struktur von GlpF mit einer Auflösung von 2,2 Å aufgeklärt [135]. Der in Kap. 1.4.1 beschriebene Translokationsmechanismus von GlpF wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls untersucht: GlpF weist eine hohe Permeabilität für Glycerin, aber auch für stereoisomere Polyalkohole wie, z.B. Ribitol auf. Neben dem Aquaporin AqpZ ist GlpF das einzige Mitglied der Aquaporin-Familie im Bakterium *E. coli* und formt, wie alle Aqua(glycero)porine, Tetramere, welche auch unter *in vitro*-Bedingungen stabil sind [152,164,165].

Aufgrund seiner bekannten Struktur sowie seines gut untersuchten Translokationsmechanismus wurde GlpF als Modellprotein für Untersuchungen zur Entfaltung α -helikaler Membranproteine verwendet. So wurde die thermische Entfaltung von GlpF in Detergenzmizellen (u.a DDM, 1-myristoyl-2-hydroxy-d27-sn-glycero-3-phosphocholin (LMPC)) untersucht [164,166]. Dabei verlief die Entfaltung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur von GlpF in DDM parallel. In LMPC hingegen erfolgte die Entfaltung der Sekundär- und Quartärstruktur erst nach der Tertiärstrukturentfaltung. Das Auflösen der Quartärstruktur von GlpF in Detergenz kann durch eine Abnahme des pH-Wertes induziert werden [164]. Gegenüber Harnstoff weist GlpF eine hohe Stabilität auf [164].

Unter Zugabe ansteigender Mengen SDS und der Ausbildung gemischter Mizellen (siehe Kap. 1.3.4) konnte die schrittweise Monomerisierung des GlpF-Tetramers unter Ausbildung eines dimeren Intermediats nachgewiesen werden [167] (Abbildung 12). Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität und dem Oligomerisierungszustand [159] sowie ein Einfluss definierter

Protein-Lipid-Wechselwirkungen [168] auf die Durchflussaktivität konnte ebenfalls beobachtet werden.

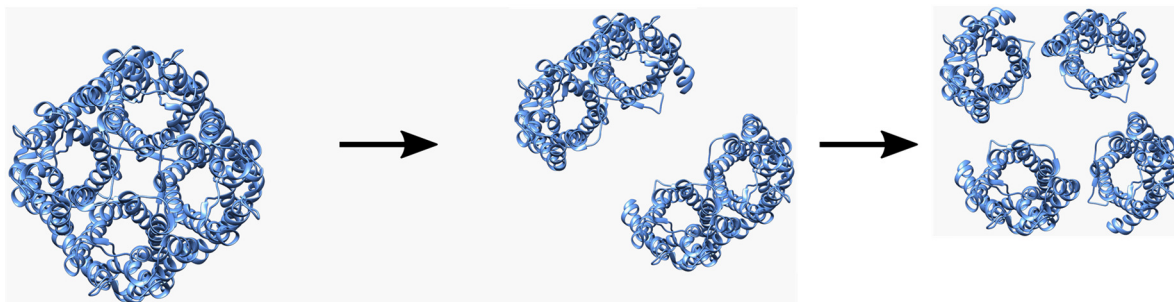


Abbildung 12: Die Monomerisierung des GlpF-Tetramers erfolgt über ein dimeres Intermediat. In [167] konnte in Anwesenheit von SDS die Ausbildung eines dimeren Zustandes von GlpF nachgewiesen werden, der als stabiles Intermediat bei der Entfaltung des GlpF-Tetramers entsteht (PDB-ID: 1FX8).

Darüber hinaus wurde in vorhergehenden Messungen ein mehrstufiger Entfaltungsprozess unter Zugabe von SDS für GlpF nachgewiesen [169], dessen strukturelle Grundlage bisher nicht weiter untersucht worden ist. Aufgrund der hoch konservierten Struktur von Aqua(glycero)porinen kann die Untersuchung der Entfaltung von GlpF wichtige Erkenntnisse über die Entfaltung und Stabilität anderer Aqua(glycero)porine liefern.

2 Ziele der Arbeit

Die stabilisierenden und relevanten Mechanismen zur Ent(faltung) α -helikaler Membranproteine sind bis heute nicht hinreichend erforscht. In dieser Arbeit sollte die Entfaltung und Stabilität des tetrameren Aquaglyceroporins GlpF aus *E. coli* in Detergenzumgebung (Dodecylmaltosid, DDM) untersucht werden. Dabei wurde der Fokus dieser Arbeit auf zwei große Themenbereiche gelegt.

1. Funktion der Tryptophane im GlpF-Tetramer

a) Die Rolle der Tryptophane bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers

Die Aminosäure Tryptophan (Trp) hat in Membranproteinen häufig eine wichtige Rolle bei der Verankerung des Proteins in der Membrenumgebung. Da auch diese Aminosäure die Ausbildung von Helix-Helix-Interaktionen in Membranproteinen fördern kann und im Allgemeinen in strukturbildenden Bereichen vorzufinden ist, sollte in dieser Arbeit die Rolle der Tryptophane bei der Stabilisierung der Quartärstruktur von GlpF untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Tryptophanvarianten von GlpF unter definierten Kriterien hinsichtlich ihrer Tetramerstabilität *in vitro* und ihrer *in vivo* Aktivität geprüft werden.

b) Untersuchung der Funktion von Trp 219 in GlpF

Die in a) gewonnenen Erkenntnisse zeigten die besondere Relevanz von Trp 219 in GlpF. Die nachfolgenden Experimente sollten Aufschluss über die besondere Rolle von Trp 219 in GlpF, aber auch in anderen Aqua(glycero)porinen geben und die Interaktionen von Trp 219 in GlpF untersuchen.

2. SDS-induzierte Entfaltung von GlpF

Die (Ent)faltung oligomerer α -helikaler Membranproteine ist bis heute zu wenig untersucht. In dieser Arbeit sollte die Entfaltung des tetrameren Modellproteins GlpF unter Zugabe des anionischen Detergenz SDS auf mehreren Strukturebenen verfolgt werden. Die Entfaltung sollte dabei unter Gleichgewichtsbedingungen sowie kinetisch erfasst werden. Durch Untersuchung der SDS-induzierten Entfaltung ausgewählter Varianten von GlpF sollten die zeitlichen Änderungen, als auch die Abfolge der Destabilisierung abschließend in Entfaltungsschemata zusammengefasst werden.



3 Material und Methoden

3.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte.

Laborgerät	Produktname	Hersteller
CD-Spektrometer	J-815 mit MPTC-490-515	Jasco, Oklahoma City, OK, USA
Chemolumineszenz-Detektionseinheit	STELLA	Raytest, Straubenhardt
Fluoreszenzspektrometer	Spectrofluorometer Fluoromax 4	Horiba, Kyoto, Japan
Gelelektrophoresekammern	Mini-Protean® 3 Cell Mini-Protean® Tetra Cell PerfectBlue Gelsystem S, M, L	Bio-Rad, München Bio-Rad, München Peqlab, Erlangen
Heizblock	Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	B28	Binder, Tuttlingen
Magnetrührer	MR Hei Standard	Heidolph, Schwalbach
Mikrowelle	MD 6459	Microstar
pH-Meter	pH211 Microprocessor	HANNA Instruments, Kehl
Photometer	Lambda 35 UV/Vis Spectrometer Novaspec Plus NanoDrop 2000c	PerkinElmer, Waltham, MA, USA Amersham Biosciences Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
Reagenzglasschüttler	Vortex	VWR, Ismaning
Schüttelinkubator	Multitron HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
<i>Semi-dry</i> Western Blot Apparatur	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad, München
<i>Stopped-Flow</i> -Apparatur	SX-18.MV	Applied Photophysics, Leaderhead, U.K.
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler	Primus	Avisco, Jena
Ultraschallbad	USC500T	VWR, Ismaning
Zellaufschlussgerät	LM20 Microfluidizer	Microfluidics International Corporation, MA, USA
Zentrifugen	Avanti® J-26 XP Optima™ L Series 5415R 5424	Beckmann Coulter, Krefeld Beckmann Coulter, Krefeld Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenrotoren	JA 25.50 JLA-8.100 70 TI 90 TI	Beckmann Coulter, Krefeld Beckmann Coulter, Krefeld Beckmann Coulter, Krefeld Beckmann Coulter, Krefeld

3.2 Materialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Objekt	Produktname	Hersteller
Filterpapier	Thick Blot Paper	Bio-Rad, München
Einwegspritzen	Omnifix®	Braun, Melsungen
Küvetten	UV-Küvette mikro Acrylküvetten Quarzglas Suprasil-Küvetten	Brandt, Wertheim Sarstedt, Nümbrecht Hellma
PD-10-Säulen	PD-10 Desalting Columns	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
PVDF (Polyvinylidenfluorid)- Membran	Roti®-PVDF; 0,45 µm	Roth, Karlsruhe
Säulen	Disposable Plastic Columns 5 mL	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA

3.3 Programme

Tabelle 3: Verwendete Computerprogramme.

Verwendung	Produktname
Proteinstrukturanalyse	UCSF Chimera 1.11.2
Proteinkonzentrationsbestimmung	Expasy ProtParam
Anpassungen/Fits	Origin 8.6 Pro Data SX 2.0.7
Gerätesoftware	Pro Data SX 2.0.7 XStella 1.0 FluorEssence 3.5.1.20 PerkinElmer UV Win Lab Jasco Spectra Manager ViewPixControl 1.5.9
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop 7.0 Inkscape 0.92.2
Diagrammdarstellung	Origin 8.6
Quantifizierung: Western Blots und SDS-PAGE- Gele	ImageJ
Sequenzvergleich	Clustal Omega
Chemische Strukturen	ChemDraw
Textverarbeitung	Microsoft Word 2016 Mendeley 1.17.13

3.4 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid 4K (40 %)	AppliChem, Darmstadt
Adonitol (Ribitol)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin-Natriumsalz	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München
Rinderserumalbumin (BSA, <i>bovine serum albumin</i>)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	VWR, Ismaning
Coomassie Brilliant Blau R250	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Finnzymes, Espoo, Finnland
DL-1,4-Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Roth, Karlsruhe
Desoxiribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	MBI, Fermentas
Essigsäure	Sigma-Aldrich, München
Ethanol, absolut reinst	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Ethanol, vergällt	Universität Mainz
Ethidiumbromid (1 %)	AppliChem, Darmstadt
Glycerin wasserfrei	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Applichem, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol, technisch	Applichem, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Venlo, Niederlande
Octyl- β -D-glucopyranosid (OG)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Roth, Karlsruhe
Polysorbat (Tween) 20	AppliChem, Darmstadt
2-Propanol	Sigma-Aldrich, München
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Trypton	Roth, Karlsruhe
Wasser (steril, nukleasefrei)	Sigma-Aldrich, München

3.5 Kulturmedien und Puffer

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Kulturmedien.

Puffer/Medium	Zusammensetzung
5x Probenpuffer (ohne SDS)	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerin 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
5x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8

Puffer/Medium	Zusammensetzung
	10 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerin 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 250 mM DTT (optional)
6x DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v) Xylencyanol
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/mL Ampicillin 50 % (v/v) Ethanol (rein)
Basispuffer	50 mM Phosphat, pH 8,0 (43 mM Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O und 7 mM Na ₂ H ₂ PO ₄ *H ₂ O) 300 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin
Blockinglösung	TBST 5 % Milchpulver
BSA-Lösung 1 für BSA-Standard	Detergenzpuffer I 2 mg/mL BSA
BSA-Lösung 2 für BSA-Standard	Phosphatpuffer 2 mg/mL BSA
Coomassie-Färbelösung	44,8 % (v/v) Ethanol 5,2 % (v/v) Essigsäure 0,125 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R250
Detergenzpuffer I	Basispuffer, pH 8,0 50 mM Octyl-β-D-glycopyranosid (OG)
Detergenzpuffer II	Basispuffer, pH 8,0 5 mM DDM
Elutionspuffer	Detergenzpuffer II, pH 8,0 400 mM Imidazol
Entfärbelösung	40 % Ethanol 10 % konzentrierte Essigsäure
Laufpuffer nach Laemmli	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Luria-Bertani (LB) - Agar	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agarose
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
Phosphatpuffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ *7 H ₂ O, pH 8,0 5 mM DDM
Resuspensionspuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 mM EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat 0,1 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail
Ribitolösung	LB-Medium 600 mM Ribitol
Sammelgelpuffer nach Laemmli	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % SDS
SDS-Stammlösung	10 mM Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O, pH 8,0 500 mM SDS

Puffer/Medium	Zusammensetzung
	5 mM DDM
<i>Semi-dry</i> Western Blot-Puffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,0 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris-Essigsäure, pH 8,0 1 mM EDTA
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i> , TBS)	20 mM Tris-HCl, pH 7,8 180 mM NaCl
TBS mit Tween 20 versetzt (<i>Tris-buffered saline + Tween 20</i> , TBST)	TBS 0,05 % (v/v) Tween 20
Trenngelpuffer nach Laemmli	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS
TSB-Medium	10 % (w/v) PEG 4000 5 % (v/v) DMSO 2 % (v/v) 1 M MgCl ₂ 1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl
Waschpuffer I	Detergenzpuffer II, pH 8,0 40 mM Imidazol
Waschpuffer II	Detergenzpuffer II, pH 8,0 80 mM Imidazol

3.6 Verwendete Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits.

Name	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
High-Speed Plasmid Mini Kit	Avegene, Taipei City, Taiwan
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL, USA

3.7 Marker und Größenstandards

Tabelle 7: Verwendete Marker und Größenstandards.

Name	Hersteller
Gene Ruler™ 1 kb Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Unstained Protein Ladder (10-200 kDa)	Fermentas, St. Leon-Rot
Pierce™ Unstained Protein MW Marker (14,4- 116,0 kDa)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA

3.8 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Epitop	Art	Hersteller
Anti-GlpF	1: 10.000	VVEEKETTPSEQKASL	Kaninchen, polyklonal	Gramsch, Schwabhausen
Anti-Kaninchen HRP (<i>horseradish peroxidase</i>)	1:10.000	Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich, München

3.9 Enzyme

Tabelle 9: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
DpnI, 20 U/μL	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Phusion®, 2 U/μL mit 5x Phusion® buffer	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

3.10 Plasmide

Tabelle 10: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Quelle
pRSET-His-GlpF	Ampicillin	Siehe [159]
pMAL-p2	Ampicillin	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
pMAL-p2X	Ampicillin	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

3.11 Primer

Tabelle 11: Verwendete Primer.

Die ersetzten Basen sind fett hervorgehoben.

Primer	Sequenz (5' → 3')
GlpF W42A for	gcg tct ttt ggt cag gcg gaa atc agt gtc att tgg
GlpF W42A rev	cc cca aat gac act gat ttc cgc ctg acc aaa aga c
GlpF W48A for	gaa atc agt gtc att gcg gga ctg ggg gtg gca
GlpF W48A rev	tgc cac ccc cag tcc cgc aat gac act gat ttc
GlpF W76A for	gtt acc att gca ttg gcg ctg ttt gcc tgt ttc
GlpF W76A rev	gaa aca ggc aaa cag cgc caa tgc aat ggt aac
GlpF W215A for	ccg aaa gtc ttt gcc gcg tcg gcg ggc tgg ggc
GlpF W215A rev	gcc cca gcc cgc cag cgc ggc aaa gac ttt cgg
GlpF W219A for	gcc tgg ctg gcg ggc gcg ggc aat gtc gcc ttt
GlpF W219A rev	aaa ggc gac att gcc cgc gcc cgc cag cca ggc
GlpF W48F for	gaa atc agt gtc att ttt gga ctg ggg gtg gca
GlpF W48F rev	tgc cac ccc cag tcc aaa aat gac act gat ttc

Primer	Sequenz (5' → 3')
GlpF W48Y for	gaa atc agt gtc att tat gga ctg ggg gtg gca
GlpF W48Y rev	tgc cac ccc cag tcc ata aat gac act gat ttc
GlpF W219F for	gcc tgg ctg gcg ggc ttt ggc aat gtc gcc ttt
GlpF W219F rev	aaa ggc gac att gcc aaa gcc cgc cag cca ggc
GlpF W219Y for	gcc tgg ctg gcg ggc tat ggc aat gtc gcc ttt
GlpF W219Y rev	aaa ggc gac att gcc ata gcc cgc cag cca ggc
GlpF Y105A for	tgt gct gcg gct tta gtt ggc ggg ctt tac tac
GlpF Y105A rev	gta gta aag ccc ggc aac taa agc cgc agc aca
GlpF F112A for	gtt tac ggg ctt tac tac aat tta gct ttc gac ttc gag cag
GlpF F112A rev	ctg ctc gaa gtc gaa agc taa att gta gta aag ccc gta aac
GlpF R123A for	cag act cat cac att gtt ggc ggc agc gtt gaa agt g
GlpF R123A rev	c act ttc aac gct gcc ggc aac aat gtg atg agt ctg
GlpF F135A for	gat ctg gct ggc act ggc tct act tac cct aat cc
GlpF F135A rev	gg att agg gta agt aga ggc agt gcc agc cag atc

3.12 Bakterienstämme

Tabelle 12: Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp
BL21(DE3)	<i>FompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm λ(DE3)</i>
SK46	MM294 (<i>F⁻endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁻) supE44 thi-1</i>) <i>glpF aqpZ</i> ; Km ^r Sm ^r
XL1-blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [<i>F['] proAB acI^qΔM15 Tn10(Tet^r)</i>] ^C

3.13 Molekularbiologische Methoden

Für die Klonierung von GlpF wurde ein von Noreen Klein erstelltes Plasmid mit GlpF-Insert als Grundlage für die Herstellung sämtlicher in dieser Arbeit erwähnten Plasmide verwendet [170]. Eine Plasmidkarte von pRSET-His-GlpF sowie pMAL-p2 GlpF ist im Anhang in Abbildung 53 bzw. Abbildung 54 gezeigt.

3.13.1 Klonierung

3.13.1.1 Ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Die ortsspezifische Mutagenese dient der gezielten Einführung sowohl einzelner als auch mehrfacher Mutationen in die betreffende Plasmid-DNA. Dies erfolgt durch Austausch oder Deletion einzelner Basen der Ziel-DNA. Zur Erstellung eines modifizierten DNA-Plasmids wurden speziell hergestellte Primer verwendet, die die gewünschte veränderte Basenabfolge enthielten (Tabelle 11). Mit dem Matrix-Vektor als Vorlage und durch Zugabe der Primer wurden die modifizierten Plasmide per Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

amplifiziert. Mittels analytischer Agarosegelelektrophorese wurde der Erfolg der Amplifikation geprüft.

Im Anschluss wurde dem 50 µL PCR-Ansatz 1 µL der Endonuclease DpnI zugegeben und das Matrix-Plasmid somit restringiert (1 h, 37 °C). 5 µL des Ansatzes wurden in chemisch kompetente *E. coli* XL1blue-Zellen transformiert (siehe Kap. 3.14.2). Die auf diese Weise modifizierte Plasmid-DNA wurde (mittels sog. DNA-Minipräparation, Kap. 3.13.1.4) aus den Zellen isoliert und im Anschluss durch Sequenzieren des relevanten DNA-Abschnittes geprüft.

3.13.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die PCR ist ein Verfahren zur schnellen *in vitro*-DNA-Amplifikation: Für die Amplifikation der gewünschten Plasmid-DNA wurde die Matrix-DNA zunächst hitzedenaturiert, was eine Hybridisierung mit den zugefügten komplementären Primern ermöglichte. Die Phusion®-DNA-Polymerase, welche sich an die Primer anlagert, wurde im Anschluss hinzugefügt. Der jeweils komplementäre Strang wurde in 5' → 3'-Richtung synthetisiert. Der Vorgang der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wurde mehrfach wiederholt. Die eingesetzten Volumina und das verwendete PCR-Programm sind jeweils in Tabelle 13 und Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 13: Zusammensetzung eines 50 µL PCR-Reaktionsansatzes.
Das Volumen einiger Komponenten (siehe mehrere Volumenangaben) wurde nach Bedarf variiert.

Komponente	V, µL
Matrix-DNA	1
Primer, <i>forward</i>	1
Primer, <i>reverse</i>	1
dNTP-Mix	1
Phusion®-Polymerase	0,5
5x Phusion®-Puffer	10
MgCl ₂	0; 1; 1,5
DMSO	0; 1; 1,5
H ₂ O	Ad 50 µL

Tabelle 14: Verwendetes PCR-Programm.

Vorgang	Dauer	T, °C
Einleitende Denaturierung	1 min	98
Denaturierung	30 s	98
Hybridisierung der Primer	1 min	55
Elongation	8 min	72
Letzte Elongation	7 min	72
Abkühlen/Lagerung	∞	4

} 16 Zyklen

3.13.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zur Auftrennung einzelner DNA- oder RNA-Stränge, sowohl für analytische, als auch für präparative Zwecke verwendet. In dieser Arbeit diente die Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der durchgeführten Klonierungsexperimente. Die DNA enthaltenden Proben wurden dabei zunächst mit Probenpuffer versetzt und im Anschluss mit einem 1%-igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Durch Inkubation des Gels in Ethidiumbromid-Lösung, welches mit der DNA interkaliert, ließen sich die aufgetrennten DNA-Banden mittels Anregung von UV-Licht detektieren.

3.13.1.4 DNA-Minipräparation

Für die Isolierung der DNA aus den zuvor kultivierten *E. coli* XI1blue-Zellen wurde das Presto® Plasmid Mini Kit der Firma DNA Cloning Service verwendet. Es wurde dabei nach den Angaben des Herstellerprotokolls verfahren. Zur Elution der Plasmid-DNA wurde, abweichend von den Herstellerangaben, 50 µL nukleasefreies Wasser verwendet, welches zuvor auf 70 °C erhitzt wurde.

3.13.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Eine Extinktion von 1 entspricht hierbei einer Konzentration von 50 µg/mL [171].

3.13.1.6 DNA-Sequenzierung

Zur Prüfung der erfolgten Mutagenese und DNA-Minipräparation erfolgte eine Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA, die von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt wurde.

3.14 Mikrobiologische Methoden

3.14.1 Herstellung kompetenter Zellen

Um die Aufnahmefähigkeit, die sog. Kompetenz, von *E. coli*-Zellen für die gewünschten Plasmide während der Transformation zu erhöhen, wurden *E. coli*-Zellen nach der Methode von Chung und Miller [172] chemisch vorbehandelt. 4 mL LB-Medium wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes inokuliert und im Schüttler inkubiert (12 h, 37 °C, 200 rpm). Es folgte eine Inokulation von 50 mL LB-Medium mit der Vorkultur in einem Verhältnis von 1:100. Die Zellkultur wurde bei 37 °C (200 rpm) im Schüttler inkubiert, bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 bei 600 nm gemessen werden konnte. Die Zellkultur wurde im Anschluss zentrifugiert (3.220 g, 10 min, 4 °C), das Zellpellet in 5 mL gekühltem *Tryptic Soy Broth* (TSB)-Medium resuspendiert und die Zellsuspension für 30 min auf Eis gekühlt. Je 100 µL Zellsuspension wurden aliquotiert. Die Aliquots wurden kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.14.2 Transformation

Als Transformation wird die Aufnahme von DNA aus dem extrazellulären Umfeld bezeichnet. Wenn die Information der DNA einen Selektionsvorteil (z.B. eine Antibiotikaresistenz) bietet, wird diese vom aufnehmenden Bakterium innerhalb seiner Population vervielfältigt und verteilt.

100 µL der chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µL des gewünschten DNA-Plasmids versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde die Membran der *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock für die Plasmid-DNA permeabel gemacht (43 °C, 45 s) und die Plasmid-DNA in die Zellen eingeführt. Die transformierten Zellen wurden für 2 min auf Eis gekühlt und mit 400 µL LB-Medium versetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Schüttelinkubator (37 °C, 40 min, 200 rpm). Im Anschluss wurde die Zellsuspension zentrifugiert (20.800 g, 1 min, 4 °C) und 350 µL des Überstandes wurden abgenommen. Das Zellpellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide ein Ampicillin-Resistenzgen tragen, enthielt die Agarplatte 100 µg/mL Ampicillin zur Selektion.

3.14.3 Kultivierung und Zellernte von *E. coli*

Für die Überexpression von GlpF zur anschließenden Proteinreinigung wurden 50 mL LB_{Amp}-Medium (100 µg/mL Ampicillin) mit einer Kolonie transformierter *E. coli*-Zellen inokuliert. Nach Inkubation der Vorkultur (37 °C, ÜN, 200 rpm) folgte die Überführung in 2 L LB_{Amp}-Medium. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 150 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 1,2 gemessen werden

konnte. Im Anschluss fand eine Induktion der Proteinexpression mittels Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, 0,5 mM, finale Konzentration) statt. IPTG bewirkt dabei die Aktivierung des Systems zur Überexpression des *glpF*-Gens [173]. Drei Stunden nach Induktion wurde die *E. coli*-Kultur zentrifugiert (1.700 *g*, 10 min, 4 °C) und das Pellet aus 2 L Kultur in 30 mL Basispuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei -20 °C gelagert.

Zur Anzucht der Zellen für die Aktivitätsmessungen wurden 50 mL LB_{Amp}-Medium (100 μ g/mL Ampicillin) mit einer 1:40-Verdünnung der Vorkultur (37 °C, ÜN, 200 rpm) inokuliert. Der Zusatz von 0,5 mM IPTG erfolgte zeitgleich zur Inokulation. Sobald die Zellzahl einer OD₆₀₀ von 0,6 entsprach, wurden die Zellen für die Aktivitätsmessung (siehe Kap. 3.16.3.1) verwendet.

3.15 Biochemische Methoden

3.15.1 Isolierung von GlpF

Im Folgenden ist die Isolierung von GlpF aus einer Expressionskultur von 2 L beschrieben.

3.15.1.1 Zellaufschluss und schrittweise Isolierung der Membranfraktion von *E. coli*

Für die Isolierung von GlpF wurden die in Kap. 3.14.3 kultivierten und geernteten Zellen verwendet. Ein Aliquot (30 mL) der Zellsuspension (entspricht 2 L Expressionskultur) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators von Klumpen befreit. Der Aufschluss des eisgekühlten Homogenisats erfolgte über das Microfluidizer-Zellaufschlusssystem in drei Durchgängen bei 1241 bar (18.000 PSI). Das Lysat wurde mittels Zentrifugation (12.000 *g*, 10 min, 4 °C) von Zelltrümmern (Pellet) getrennt und der Überstand weiterverwendet. Die Trennung der Membranfraktion von den löslichen Bestandteilen von *E. coli* geschah bei der anschließenden Ultrazentrifugation (117.000 *g*, 1 h, 4 °C). Die Membranfraktion war nach Zentrifugation im Pellet enthalten.

3.15.1.2 Solubilisierung in Detergenz

Um Messungen an Membranproteinen durchzuführen, müssen diese in ausreichenden Mengen und hoher Reinheit produziert werden. Die Membranfraktionen enthalten jedoch Lipid- und Proteinreste unterschiedlicher Zusammensetzung, die die Isolierung, als auch die Untersuchung von Membranproteinen beeinträchtigen würden. Um das Membranprotein aus diesen Lipiden zu lösen und es in eine homogene, amphiphile Umgebung zu bringen, werden Membranproteine in sog. Detergenzien solubilisiert (siehe Einleitung). Diese bilden amphiphile Mizellen um die Membranproteine und verdrängen dadurch die umgebenden Lipide.

Die in Kap. 3.15.1.1 erstellten Membranfraktionen wurden in 50 mL Detergenzpuffer I (enthält 50 mM Octyl- β -D-glycopyranosid (OG)) aufgenommen und für 1 h unter Rühren solubilisiert. Zur

Trennung der solubilisierten Proteine von den restlichen Bestandteilen der Membranfraktion wurde die Proteinlösung zentrifugiert (117.000 g, 20 min, 4 °C). Der Überstand enthielt die in OG solubilisierten Proteine.

3.15.1.3 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC)

Die verwendete Methode beruht auf der Bindung des gewünschten Proteins durch Ausbildung eines Chelatkomplexes [174]. Die Imidazolgruppen des Polyhistidinschwanzes (*His-tag*) des Proteins komplexieren dabei mit einem multivalenten Metall-Ion (hier: Ni²⁺). Dieses ist wiederum an der immobilisierten Phase, einer metallchelierenden Gruppe (hier: Nitrilotriessigsäure (NTA)), gebunden. Über einen Spacer ist diese wiederum mit dem Säulenpolymer verbunden. Über Zugabe ansteigender Konzentrationen an Imidazol wird das komplexierte Histidin verdrängt und das gewünschte Protein eluiert.

Zur Anwendung der IMAC mittels Ni-NTA, wurde das pRSET-Plasmid mit der Sequenz für einen Polyhexahistidin-Tag (*His6x-tag*) versehen, welches sich nach Expression von GlpF am N-terminalen Ende des Proteins befindet.

1 mL Ni-NTA-Agarose-Lösung (50 % in EtOH (v/v)) wurde mit dem 10-fachen Säulenvolumen Detergenzpuffer I äquilibriert. Die Proteinlösung aus solubilisierten Membranproteinen wurde mit der äquilibrierten Ni-NTA-Lösung versetzt und in einem geschlossenen Gefäß durch Invertieren (1 h, RT) inkubiert. Die Zugabe von 5 mM Imidazol sollte dabei unspezifische Bindungen an die Ni-NTA-Agarose verhindern. Die Suspension, bestehend aus der Ni-NTA-Agarose-Matrix und dem daran gebundenen Protein, wurde auf eine Säule (5 mL) gegeben und mit jeweils 10 mL Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 behandelt. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 1 mL Elutionspuffer und einer 5-minütigen Inkubationszeit, ehe die Eluate gesammelt wurden. Der Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt, wobei im letzten Elutionsschritt 0,5 mL Elutionspuffer verwendet wurden und keine Inkubation stattfand. Die Reinheit und die Konzentration des Proteins wurden jeweils über Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt.

3.15.2 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)-Analyse

In der diskontinuierlichen SDS-PAGE-Analyse nach Laemmli werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld getrennt [175].

Für die SDS-PAGE-Analyse von GlpF wurden Polyacrylamidgele mit einem 10%-igem Acrylamidanteil im Trenngel und einem 6%-igem Anteil im Sammelgel angefertigt. Die Gele wurden mit 10 bzw. 15 Taschen versehen. Die Zusammensetzung der angefertigten Gele ist in Tabelle 15 zusammengefasst. Für die Proben wurde, je nach Bedarf, 5x SDS-Probenpuffer oder SDS-freier 5x Probenpuffer (seminalive SDS-PAGE) verwendet. Vom entsprechenden

Größenstandard wurden 5 μL in die linke Tasche des Gels, die mit Probenpuffer versetzten Proben (sofern nicht anders angegeben) zu je 10 μL je Tasche aufgetragen. Das Gel wurde in die mit Laufpuffer gefüllte Laufkammer eingesetzt und auf eine Gleichspannung von zunächst 100 V, bei Erreichen des Trenngels auf eine Spannung von 200 V eingestellt. Die Elektrophorese wurde beendet nachdem die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Tabelle 15: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele nach Laemmli.

Substanz	Sammelgel (6 %)	Trenngel (10 %)
40 % Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid (37,5/1)	1,5 mL	2,5 mL
Sammelgelpuffer	2,5 mL	
Trenngelpuffer		2,5 mL
H₂O	6 mL	5 mL
APS	50 μL	50 μL
TEMED	20 μL	20 μL

3.15.3 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung beruht auf der Anlagerung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau an die basischen Aminosäureseitenketten des Proteins, was zur Visualisierung der Proteinbande im Polyacrylamidgel führt.

Das Polyacrylamidgel wurde für 30-60 min in der Färbelösung auf einem Taumelschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung des überschüssigen Farbstoffes mit Hilfe der Entfärbelösung. In dieser wurde das Polyacrylamidgel eine halbe Stunde inkubiert, bis die gefärbten Banden deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden waren.

3.15.4 Membranpräparation

Zur Erfassung der *in vivo*-Aktivität von GlpF in *E. coli* SK 46-Zellen, muss die Konzentration ermittelt werden, in der GlpF bzw. seine untersuchten Varianten in der *E. coli*-Membran vorliegen. Hierfür wurde parallel zur Aktivitätsmessung (Kap. 3.16.3.1) eine Membranpräparation der untersuchten Zellprobe zur Bestimmung des relativen Expressionsniveaus von GlpF durchgeführt.

Die Kultivierung der *E. coli* SK 46-Zellen zur Aktivitätsmessung erfolgte wie in Kap. 3.14.3 beschrieben. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,6 wurde ein Volumen der Zellsuspension entnommen, welches einer OD_{600} von 2 in 15 mL entsprach. Hierfür wurde das entsprechende Volumen abgenommen, die Zellsuspension zentrifugiert (10 min, 3.220 g, 4 °C) und das Zellpellet in 15 mL Resuspensionspuffer aufgelöst. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallgerät (13 mm Makrospitze, *Duty Cycle* 50 %, *Output Control* 5,5) mit einer Beschallungsdauer von

anderthalb Minuten. Die Zellsuspension wurde dabei stets eisgekühlt aufbewahrt. Das Lysat wurde zentrifugiert (10 min, 12.000 g, 4 °C) und die Membranfraktion der *E. coli*-Zellen durch eine weitere Zentrifugation des Überstandes (1 h, 165.000 g, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µL Basispuffer resuspendiert und die Proteinkonzentration der Membranfraktion mit Hilfe eines BCA-Tests bestimmt.

3.15.5 Semi-Dry Western Blot-Analyse mit immunochemischem Nachweis

Die SDS-PAGE wurde nach den Angaben in Kapitel 3.15.2 durchgeführt. Der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fa. Fermentas St. Leon-Rot) wurde hierbei als Größenstandard verwendet. Das Polyacrylamidgel wurde anschließend aus der Apparatur genommen und die Glasplatten entfernt. Zwei Filterpapiere wurden auf Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Zur Aktivierung der PVDF-Membran wurde diese kurz in Methanol getaucht und die für den Blot notwendigen Komponenten wurden in der Blotapparatur übereinandergelegt. Zunächst wurde ein getränktes Filterpapier in die Kassette eingesetzt. Auf dieses wurde die PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel, und zuoberst das zweite getränkte Filterpapier gelegt. Der Proteintransfer erfolgte für 30 min bei einer Gleichspannung von 25 V. Die Membran wurde anschließend 1 h im Blockingpuffer und nach dreimaligem Waschen (3 x 5 min) mit TBST-Puffer mit dem Primärantikörper inkubiert (ÜN, 4 °C). Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) mit TBST-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1 h, RT). Die Membran wurde im Anschluss wieder gewaschen (3 x 5 min mit TBST-Puffer) und mit dem *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate Kit* (Fa. Thermo Fisher Scientific) behandelt. Das Signal der chemoluminiszierenden Banden auf der Membran wurde über das Aufnahmesystem STELLA detektiert. Die quantitative Auswertung der Bandenintensität erfolgte über das Programm ImageJ [176].

3.15.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.15.6.1 Absorption bei 280 nm

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von gereinigtem GlpF wurde die Extinktion der Probe bei 280 nm gemessen. Die Konzentration ergibt sich nach Umstellen folgender Formel:

$$E_{280 \text{ nm}} = \varepsilon * c * d \quad (\text{VIII})$$

Wobei gilt: d: Schichtdicke, cm; c: Proteinkonzentration, mol/L; ε: Extinktionskoeffizient, (mol/L)⁻¹*cm⁻¹.

Die Extinktionskoeffizienten für den GlpF-Wildtyp (wt) sowie die erstellten Varianten wurden mit dem Programm ExPasy ProtParam berechnet [177] und sind in Tabelle 16 aufgezeigt.

Tabelle 16: Eingesetzte Extinktionskoeffizienten für die erstellten GlpF-Varianten.

Ausgetauschte Aminosäure	Extinktionskoeffizient ϵ , (mol/L) ⁻¹ *cm ⁻¹
GlpF wt	37930
W → A	32430
W → F	32430
W → Y	33920
Y → A	36440
R → A	37930
F → A	37930

3.15.6.2 BCA-Test

Der Bicinchoninsäure (BCA)-Test [178] wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Membranfraktionen nach der Membranpräparation (Kap. 3.15.4) verwendet. Es wurde nach Angaben des *BCA Protein Assay Kits* (Fa. Thermo Fisher Scientific) verfahren. Eine Verdünnungsreihe mit BSA (*bovine serum albumin*) diente als Standard. Die Ansätze wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte erstellt und die Intensität des entstandenen Farbstoffes bei 562 nm mithilfe eines Plattenlesegeräts photometrisch bestimmt. Durch Erstellen einer Eichgerade des BSA-Standards konnte die Proteinkonzentration der Membranfraktion bestimmt werden.

3.15.7 SDS-Titration

Die SDS-Titration diente der Untersuchung der Entfaltung und Stabilität des GlpF-Tetramers nach Zugabe von SDS. Die dieser Methode zugrundeliegende Ausbildung von gemischten Detergenzmizellen ist in Kap. 1.3.4 beschrieben.

Um pufferbedingte Einflüsse zu vermeiden, wurde das isolierte GlpF (siehe Kap. 3.15.1) über eine PD-10-Säule nach den Angaben des Herstellers in Phosphatpuffer überführt. Die Titrationsansätze wurden durch schrittweise Verdünnung einer SDS-Stammlösung (500 mM SDS in Phosphatpuffer) hergestellt. Zu jedem Ansatz wurde 8 μ M GlpF hinzugefügt, sodass in den Ansätzen eine finale Konzentration von 6,5 μ M GlpF vorlag. Die Titrationsansätze wurden invertiert, kurz zentrifugiert und je nach Versuch für 1-12 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze zur Untersuchung der Entfaltung von GlpF mittels Fluoreszenzspektroskopie betrachtet (Kap.3.16.1). Zudem wurde die Proteinstabilität von GlpF mittels seminativer SDS-PAGE-Analyse (Kap. 3.15.2) an ausgewählten Titrationsansätzen untersucht. Die in dem Laufpuffer enthaltene SDS-Konzentration wurde in der Datenauswertung zu der SDS-Konzentration der jeweiligen

Titrationansätze addiert. Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte dabei über das Programm ImageJ [176].

Aufgrund der Bildung gemischter SDS/DDM-Mizellen, wurde bevorzugt der SDS-Stoffmengenanteil (χ_{SDS}) eines Ansatzes anstelle der SDS-Konzentration angegeben (Formel (IX))

$$\chi_{SDS} = \frac{c_{SDS}}{c_{(SDS+DDM)}} \quad (IX)$$

Wobei gilt: c_{SDS} : Konzentration des eingesetzten SDS; $c_{(SDS+DDM)}$: Konzentration des im Ansatz enthaltenen Gesamtdetergenz.

Die für die Titrationsansätze eingesetzten SDS-Konzentrationen sowie ihr entsprechender Stoffmengenanteil χ_{SDS} sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 22 und Tabelle 23). Für die Rückfaltungsexperimente wurden die Titrationsansätze mit 16 μM GlpF versetzt, sodass eine finale Proteinkonzentration von 13 μM pro Ansatz vorlag. Die Ansätze wurden nach obigem Verfahren ebenfalls je nach Versuch für 1-12 h bei RT inkubiert. Das halbe Volumen jedes Ansatzes (100 μL) wurde im Anschluss abgenommen und durch 100 μL Phosphatpuffer ersetzt. Auf diese Weise wurde die GlpF- und SDS-Konzentration des jeweiligen Ansatzes auf die Hälfte verdünnt. Jeder Titrationsansatz enthielt demnach 6,5 μM GlpF und die halbe SDS-Konzentration des ursprünglichen Ansatzes. Der dadurch veränderte SDS-Stoffmengenanteil der jeweiligen Ansätze ist in Tabelle 24 (Anhang) gelistet. Diese Ansätze wurden nach Zugabe des entsprechenden Puffers ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert und im Anschluss per SDS-PAGE oder fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die Resultate der Rückfaltungsmessung konnten mit den Ergebnissen der Entfaltungsmessungen von GlpF verglichen werden. Voraussetzung hierfür war die Unabhängigkeit der GlpF-Entfaltung von der Proteinkonzentration, da kein Unterschied zwischen der Entfaltung der Ansätze mit 6,5 μM GlpF und der Ansätze mit 13 μM GlpF bestehen durfte, welche im Anschluss für die Rückfaltungsmessungen auf 6,5 μM verdünnt worden sind (siehe Abbildung 62, Anhang).

3.16 Biophysikalische Methoden

3.16.1 Fluoreszenzspektroskopie

Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin können aufgrund der spektroskopischen Eigenschaften ihrer aromatischen Seitenketten unter Anregung von UV-Licht fluoreszieren und sind daher als intrinsische Fluorophore für die Fluoreszenz von Proteinen verantwortlich. Proteingebundenes Tryptophan erreicht dabei die höchste Quantenausbeute und trägt damit zum

Großteil zur Fluoreszenzemission eines Proteins bei. Im Gegensatz zu Tyrosin und Phenylalanin zeichnet sich Tryptophan durch eine hohe Sensitivität gegenüber seiner lokalen Umgebung aus und wird daher oft für die Untersuchung struktureller Änderungen bei der (Ent)faltung von Proteinen verwendet [127,179].

Die Sensitivität des Tryptophans ist abhängig von der Polarität seiner lokalen Umgebung, die mit dem Indolring des Tryptophans interagiert [180]. Dies äußert sich sowohl in einer Änderung der Fluoreszenzintensität als auch in einer Verschiebung der Wellenlänge des Emissionssignals bei Änderung der lokalen Umgebung von Tryptophan. Die Emissionsspektren von freiem Tryptophan in Lösungsmitteln verschiedener Polaritäten sind in Abbildung 13 exemplarisch dargestellt: In H_2O gelöst weist Tryptophan ein breites Emissionsspektrum mit einem Maximum bei ca. 350 nm auf. Im hydrophoberen Methanol ist dieses Spektrum blauverschoben und besitzt eine stark erhöhte Fluoreszenzintensität.

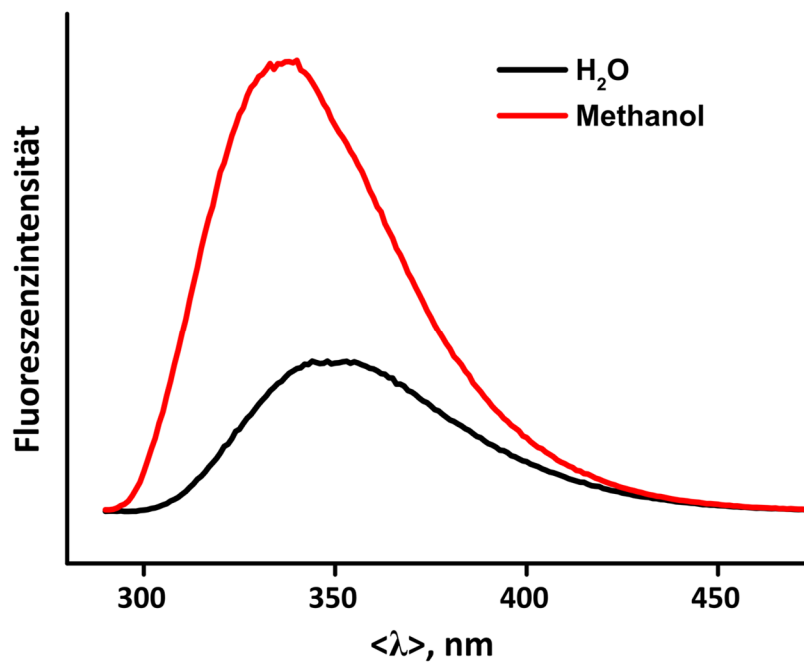


Abbildung 13: Emissionsspektren von freiem Tryptophan in Wasser und Methanol.

8 μM Tryptophan wurde mit einer Wellenlänge von 280 nm angeregt. Die Fluoreszenzintensität von Tryptophan nimmt mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels tendenziell ab. Das Maximum des Fluoreszenzspektrums verschiebt sich mit zunehmender Polarität zu höheren Wellenlängen.

Änderungen des Emissionsspektrums erlauben es folglich, direkte Aussagen über Änderungen der lokalen Umgebung des Tryptophans zu machen. Dies gilt sowohl für freies als auch für proteingebundenes Tryptophan. Da Tryptophane durchschnittlich nur 1 Mol-% der Aminosäuren in einem Protein ausmachen [180], werden diese vereinzelt vorkommenden Aminosäuren oft als „Sensoren“ verwendet, um die (Ent)faltung von Proteinen zu untersuchen [181].

Für die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Entfaltung von GlpF wurden die Ansätze nach Kap. 3.15.7 hergestellt und im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Zur Verhinderung von Streueffekten wurde eine Anregungswellenlänge von 280 nm (anstatt üblicherweise 295 nm) bei einer Spaltbreite von 2 nm gewählt. Das Fluoreszenzspektrum wurde in einem Bereich zwischen 290 nm und 390 nm (Spaltbreite 2 nm) aufgenommen. Die mittlere Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ (*average emission wavelength, spectral center of mass*) jedes Spektrums wurde nach Gleichung (X) berechnet [182]. Die Bestimmung von $\langle \lambda \rangle$ stellt eine besonders sensitive Methode zur Erfassung von spektralen Verschiebungen dar [183].

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum_i \lambda_i I_i}{\sum_i I_i} \quad (X)$$

Wobei gilt: λ : Wellenlänge, nm; I: Fluoreszenzintensität.

In dieser Arbeit wurde auf die Verwendung der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ zurückgegriffen, da dieser Parameter durch Erfassen des kompletten aufgenommenen Spektrums gebildet wird. Sowohl Änderungen der Form, als auch Änderungen der Position des Spektrums sind in diesen Wert einbezogen [184]. Besonders bei der Untersuchung der Entfaltung von Membranproteinen findet dieser Parameter Anwendung [185–187].

3.16.2 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Linear polarisiertes Licht kann über einen Modulator in seine zwei zirkular polarisierten Komponenten (links und rechts) aufgespalten werden. Diese zwei Komponenten werden von optisch aktiven Chromophoren zu unterschiedlichen Anteilen absorbiert. Daraus resultiert ein elliptisch polarisiertes Signal, welches oftmals charakteristisch für die optisch aktive Substanz ist [188]. Auch α -helikale Proteine sind optisch aktiv und weisen ein charakteristisches Absorptionsspektrum auf, welches sich von dem Spektrum des β -Faltblatts und des Zufallsknäuels unterscheidet. Das Spektrum α -helikaler Proteine weist zwei Minima bei 208 nm (in dieser Arbeit bei 209 nm) und 222 nm auf. Eine Änderung der Intensität dieser Minima erlaubt Rückschlüsse über Veränderungen der α -helikalen Struktur eines Proteins. Über einen Temperaturgradienten lässt sich die Denaturierung der α -helikalen Struktur durch die Abnahme der charakteristischen Minima verfolgen.

Die Messproben wurden nach Kap. 3.15.7 für ein Gesamtvolumen von 200 μ L je Probe vorbereitet. Das Absorptionsspektrum von GlpF wurde auf dem Gerät J-815 von Jasco aufgenommen. Die Messung erfolgte in Suprasil Quarzglasküvetten mit einer Pfadlänge von 1 mm. Geräteeinstellungen und Messparameter sind im Folgenden aufgelistet:

Tabelle 17: Verwendete Parameter für die CD-Spektroskopie.

Parameter	Wert
Spektrum	190-260 nm
Messinkremente	1 nm
Scangeschwindigkeit	50 nm/min
Anzahl der Wiederholungen	3
Bandbreite	5 nm
Integrationszeit	0,5 s
Temperaturgradient	15-85 °C
Temperaturinkremente	2 °C

Das gemessene Rohsignal m° (in mdeg (millidegree)) des Puffers wurde von dem Signal jeder Probe subtrahiert. Aus diesem bearbeiteten Signal wurde die mittlere molare Elliptizität $[\theta]$ mithilfe folgender Formel berechnet:

$$[\theta] = \frac{m^\circ}{c * l} \quad (XI)$$

Wobei gilt: m° : Rohsignal (mdeg); c: Konzentration, mM; l: Pfadlänge, cm.

Die Änderung der α -helikalen Struktur wurde über die Messung der mittleren molaren Elliptizität des Minimums bei 209 nm erfasst.

3.16.3 Stopped-Flow-basierte spektroskopische Methoden

Stopped-Flow-Messungen dienen der Erfassung schnell verlaufender Prozesse, die sich nach dem Mischvorgang zweier Komponenten abspielen [189,190]. Der Aufbau einer *Stopped-Flow*-Apparatur ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

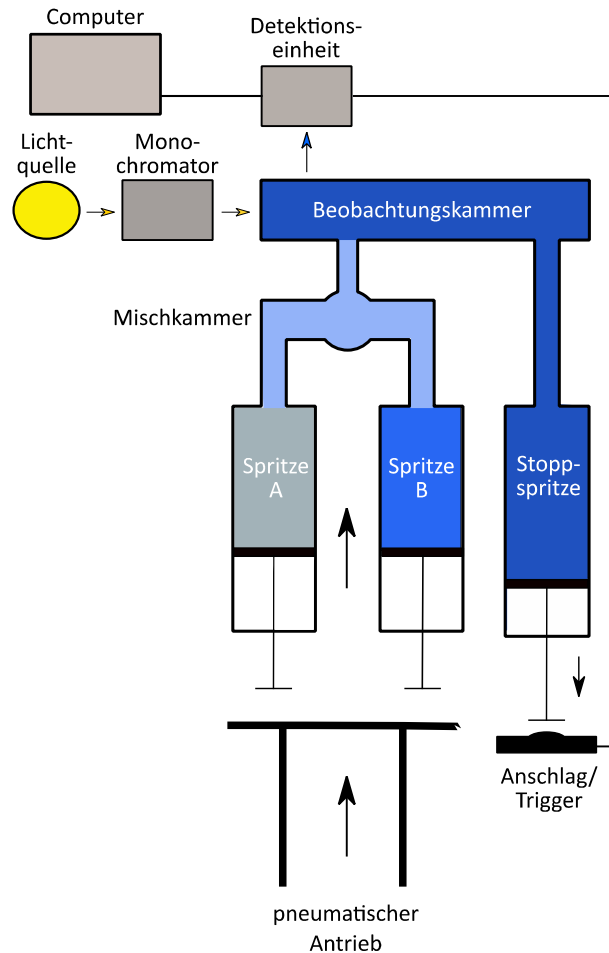


Abbildung 14: Schematischer Aufbau einer *Stopped-Flow*-Apparatur mit UV/Vis-Spektrometer. Gezeigt ist die Anordnung zur Messung der Fluoreszenz oder der Lichtstreuung. Die Lösungen aus Spritze A und B werden in der Mischkammer vollständig vermischt und in der Beobachtungskammer angestrahlt. Die Lichtquelle besteht aus einer Xenon-Gasentladungslampe, deren Licht über einen Monochromator auf die Beobachtungskammer (Durchflussküvette) trifft. Sobald die Stoppspritze den Trigger am Anschlag auslöst, wird die Detektionseinheit geschaltet. Sowohl bei der Messung der Fluoreszenz, als auch der Lichtstreuung, wird das Signal der Probe im 90°-Winkel zum eingestrahlten Licht detektiert. Die Mischspritzen sowie die Misch- und Beobachtungskammer sind von einer temperaturregulierten Wasserkammer umschlossen (nicht gezeigt).

Über zwei pneumatisch betriebene Spritzen werden die Lösungen A und B in eine Mischkammer gedrückt, in der sie vollständig vermischt werden. Die vermischte Lösung befüllt nach der Mischkammer auch die Beobachtungskammer, die durch eine Lichtquelle über einen einstellbaren Monochromator angestrahlt wird. Das zunehmende Mischvolumen setzt eine entgegengesetzte

Stopspritze in Bewegung, die bei Berühren des Anschlags die Detektionseinheit einschaltet. Das Auslösen der Detektionseinheit bzw. die Zeit zum Erreichen des Anschlags kann eingestellt werden und entspricht der Zeit, die zur vollständigen Vermischung von Substanz A und B benötigt wird. Diese Zeit wird als Totzeit bezeichnet und liegt in den vorliegenden Experimenten bei 1 ms. Nach Aktivierung der Detektionseinheit kann der Reaktionsverlauf beider Substanzen spektroskopisch verfolgt werden.

3.16.3.1 *In vivo*-Aktivitätsmessung von GlpF mittels statischer Lichtstreuung

Die Durchflussaktivität von GlpF wird durch die Aufnahme eines linearen Polyalkohols und das daraus resultierende Anschwellen der *E. coli*-Zellen bestimmt. Für diese Messungen wurden *E. coli* SK46-Zellen verwendet, in denen das Gen für GlpF sowie das Gen für das *E. coli*-Aquaporin AqpZ deletiert worden ist. Diese Zellen wurden mit dem pMal-GlpF-Plasmid transformiert, welches für GlpF bzw. eine seiner Varianten codiert. Als Negativkontrolle wurden außerdem *E. coli* SK46-Zellen mit einem pMal-GlpF-Leerplasmid transformiert. Nach erfolgreicher Transformation (siehe Kap. 3.14.2) wurde eine Kolonie von der Agarplatte aufgenommen und in 3 mL LB_{Amp}-Medium (Vorkultur mit 100 µg/mL Ampicillin) inokuliert. Die Vorkulturen wurden unter Schütteln inkubiert (37 °C, ÜN, 200 rpm) und anschließend entsprechend einer 1:40-Verdünnung (v/v) in 10 mL LB_{Amp}-Medium (100 µg/mL Ampicillin) mit 0,5 mM IPTG überführt. Die Hauptkultur wurde inkubiert (37 °C, 200 rpm), bis die Zellzahl einer OD₆₀₀ von 0,6 entsprach. Es wurde ein Volumen der Hauptkultur abgenommen, welches einer OD₆₀₀ von 1,0 in 3 mL entsprach und dieses bei 3.220 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3 mL LB_{Amp}-Medium resuspendiert. Da das Glycerin durch die *E. coli*-Membran permeieren kann, ist es als Substrat für die Messung der Durchflussaktivität von GlpF weniger gut geeignet [135]. Stattdessen wurde Ribitol verwendet, welches bei ähnlicher Durchflussrate eine geringere Permeabilität durch die Membran im Vergleich zum Glycerin aufweist [135]. Die Ribitollösung (400 mM in LB_{Amp}-Medium) wurde in der *Stopped-Flow*-Apparatur mit den GlpF-enthaltenden *E. coli* SK46-Zellen vermischt.

Tabelle 18: Parameter der *Stopped-Flow*-Apparatur für die Aktivitätsmessung von GlpF.

Parameter	Wert
Anregungswellenlänge	600 nm
Wiederholungen	10
Messzeit je Messung	10 s
Punkte je Messung	2.000
Temperatur	25 °C

Durch das Mischen der *E. coli*-Zellen mit dem Ribitol kommt es zum Ausstrom von Flüssigkeit aus der Zelle und zum Anstieg der Lichtstreuintensität. Diese Intensität verhält sich umgekehrt proportional zur *E. coli*-Oberfläche [191] und steigt an, sobald die *E. coli*-Zellen aufgrund von Osmose schrumpfen. Der Abfall der Intensität geht auf das Anschwellen der Zellen durch den Einstrom von Ribitol und Wasser zurück: Er ist das Maß für die Durchflussaktivität von GlpF.

Je Probe wurden zehn Messungen aufgenommen und eine Messkurve aus diesen gemittelt. Der Verlauf der Kurve wurde mit Hilfe einer doppelt exponentiellen Zerfallsfunktion angepasst und die Geschwindigkeitskonstante k_2 der abfallenden Kurve bestimmt. Die Anpassungsfunktion ist in Formel (XII) angegeben:

$$f(x) = A_1 * e^{-k_1*x} + A_2 * e^{-k_2*x} + y_0 \quad (XII)$$

Wobei gilt: A_1, A_2 : Amplitude; k_1, k_2 : Geschwindigkeitskonstante, 1/s; y_0 : Wert bei x_0 .

Parallel zur Messung der Flussrate k wurde eine Membranpräparation (Kap. 3.15.4) der untersuchten Zellprobe mit anschließender Western Blot-Analyse zur Bestimmung des Expressionsniveaus von GlpF durchgeführt (Kap. 3.15.5). Dabei wurde die Bandenintensität mittels ImageJ quantifiziert. Diese wurde anschließend auf die Intensität des GlpF-Wildtyps normiert. Das auf diese Weise bestimmte Expressionsniveau wurde in die gemessene Flussrate k einbezogen (gewichtete (g) Flussrate k_g).

3.16.3.2 Kinetische Messung der Entfaltung von GlpF mittels Fluoreszenzspektroskopie

Schnelle Entfaltungsprozesse in Proteinen und mögliche Intermediate, die während der Entfaltung entstehen, können mit Hilfe *Stopped-Flow*-basierter spektroskopischer Methoden detektiert werden [186,192]. Zur kinetischen Entfaltungsanalyse wurde GlpF in mehreren Messungen mit SDS ansteigender Konzentration vermischt. Die Intensitätsänderung der Tryptophanfluoreszenz wurde anschließend über einen festgelegten Zeitraum aufgenommen. Wie in Kap. 3.16.1 beschrieben, können diese Änderungen auf Änderungen der lokalen Tryptophanumgebung während der Entfaltung zurückgeführt werden.

Der für die Lösungen und Messungen verwendete Phosphatpuffer wurde vor Verwendung stets für eine halbe Stunde im Ultraschallbad entgast. Aus einer SDS-Stammlösung (500 mM SDS in Phosphatpuffer) wurden Verdünnungen entsprechend

Tabelle 25 in Phosphatpuffer erstellt und diese wurden erneut im Ultraschallbad entgast (30 min). Das isolierte GlpF (Kap. 3.15.1) wurde über eine PD-10 Säule in Phosphatpuffer umgepuffert und

auf eine Konzentration von 13 μM verdünnt. Ein Fluoreszenzfilter mit einer Ausschlusswellenlänge von 320 nm wurde in die *Stopped-Flow*-Apparatur eingebaut, womit die ausschließliche Erfassung der Tryptophanemission (Maximum bei 325 nm) sichergestellt wurde. Die eingestellten Parameter sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Parameter der *Stopped-Flow*-Apparatur für die Entfaltungsmessung von GlpF.

Parameter	Wert
Anregungswellenlänge	280 nm
Anzahl der Wiederholungen	5
Messzeit	2 s (nach Bedarf länger; Maximum: 1.000 s)
Punkte je Messung	2.000
Temperatur	25 °C

Die GlpF-Lösung wurde mit den SDS-Lösungen ansteigender Konzentrationen vermischt, sodass eine 1:1 – Verdünnung beider Substanzen stattfand (entspricht χ_{SDS} in

Tabelle 25). Die Änderung der Fluoreszenzintensität wurde aufgenommen und die Geschwindigkeitskonstante über eine doppelt exponentielle Anpassung des Verlaufs der Intensitätsänderung (Formel(XII)) bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Rolle der Tryptophane bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers

GlpF besitzt fünf Tryptophane (Trp) im Monomer, die über das gesamte Protein verteilt sind (Abbildung 15). Der Großteil dieser Tryptophane ist, im Einklang mit seiner Präferenz in der biologischen Hydrophobizitätsskala [53], im *interface* zwischen dem hydrophoben Bereich und der wässrigen Umgebung angelagert.

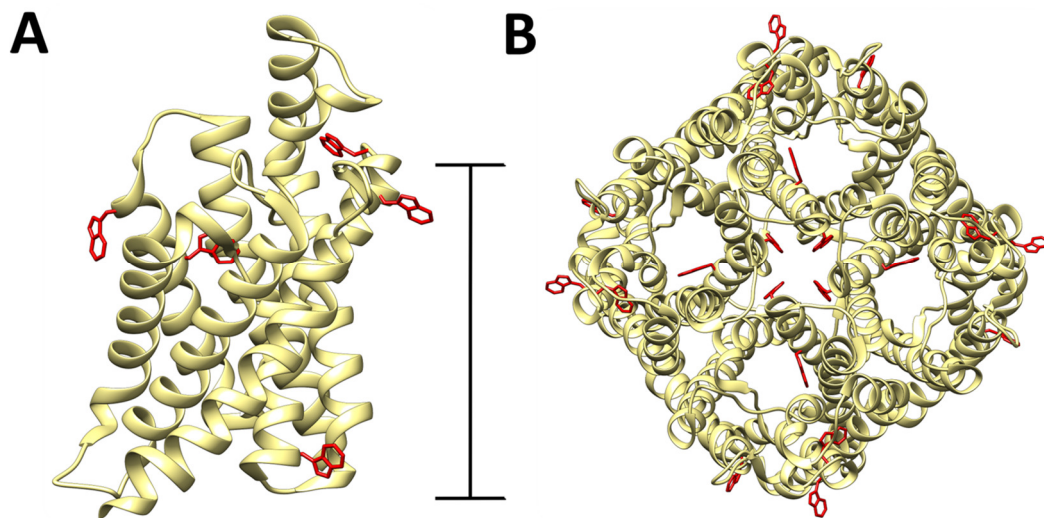


Abbildung 15: Anordnung der Tryptophane im Mono- und Tetramer von GlpF.

(A) Seitenansicht des GlpF-Monomers mit Struktur seiner Tryptophanseitenketten. Die Position und Dicke der Membran sind über den eingefügten Maßstab markiert (entsprechend der mittels MemprotMD [193] simulierten und zur Verfügung gestellten Struktur von GlpF in DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) (<http://memprotmd.bioch.ox.ac.uk>, Stand: 10/2018)). Die Tryptophane sind hauptsächlich an der periplasmatischen Grenzfläche (*interface*) des hydrophoben Membranbereichs und der wässrigen Umgebung positioniert. (B) Periplasmatische Aufsicht des GlpF-Tetramers. Die Tryptophane verteilen sich über das gesamte Protein und sind in Rot dargestellt (PDB-ID: 1FX8).

Neben ihrer allgemein bekannten Rolle als Lipidanker wurde für Tryptophan in Membranproteinen eine weitere Funktion vermutet, die mit der Ausbildung von Helix-Helix-Interaktionen zusammenhängt (siehe Kapitel 1.2.3.3). Diese Funktion könnte auch bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers von Bedeutung sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden verschiedene Tryptophanvarianten von GlpF erstellt. Jeweils ein Tryptophan wurde gegen Alanin, bei Bedarf auch gegen Phenylalanin oder Tyrosin ausgetauscht und die jeweilige GlpF-Variante hinsichtlich ihrer Tetramerstabilität *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die Stabilität des Tetramers dieser Varianten wurde unter drei Gesichtspunkten betrachtet:

1. Die Präsenz des GlpF-Tetramers unter *in vitro*-Bedingungen, welche mittels seminativer SDS-PAGE (Kap. 3.15.2) nachgewiesen wird. Die Existenz eines Tetramers der jeweiligen GlpF-Variante wird durch die Präsenz einer Bande bei ~ 100 kDa bestätigt (Abbildung 16 A, erste Spur). Das detergentenbedingte anomale Migrationsverhalten von Membranproteinen weicht dabei im Polyacrylamidgel vom Laufverhalten des Größenstandards (lösliche Proteine) ab [194]. Auch die Existenz zusätzlicher Banden, die einem monomeren, dimeren oder sogar trimeren Zustand entsprechen, wird mit dem Verlauf der Banden des GlpF-Wildtyps verglichen. GlpF-Tryptophanvarianten (d.h. Varianten, deren wildtypisches Tryptophan gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht worden ist), die ein stabiles Tetramer aufweisen, liegen im Acrylamidgel überwiegend als Bande bei 100 kDa vor. Dabei wird das isolierte und in Detergenz solubilisierete GlpF nur einer minimalen, zur SDS-PAGE-Analyse notwendigen SDS-Konzentration ($c_{\text{SDS}} = 3,5$ mM, $\chi_{\text{SDS}} = 0,41$) ausgesetzt, um den denaturierenden Einfluss von SDS auf das Protein möglichst gering zu halten. Das im Acrylamidgel und im Laufpuffer enthaltene SDS kann einen destabilisierenden Einfluss auf die GlpF-Varianten haben, was bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden muss.
2. Die SDS-induzierte Dissoziation des GlpF-Tetramers über die sog. SDS-Titration (vgl. Kapitel 3.15.7). Durch Zugabe ansteigender χ_{SDS} kann die Dissoziation des GlpF-Tetramers mittels seminativer SDS-PAGE beobachtet werden (Abbildung 16 A). Diese wird mit der Abnahme der Bandenintensität des wildtypischen GlpF-Tetramers verglichen. Die Bandenintensität des entsprechenden Tetramers der untersuchten Tryptophanvarianten von GlpF wird dabei quantifiziert (Abbildung 16 B). Die Tetramerstabilität einer GlpF-Variante wird als wildtypisch bezeichnet, wenn die Abnahme der Tetramerbandenintensität mit dem Verlauf des GlpF-Wildtyps innerhalb seiner Standardabweichung übereinstimmt. Abweichungen vom wildtypischen Verlauf lassen auf eine stabilisierende Wirkung des fehlenden Tryptophans auf das GlpF-Tetramer schließen.
3. Die *in vivo*-Durchflussaktivität von GlpF. Dabei wird nach Kapitel 3.16.3.1 verfahren. Die Aufnahme des Substrates in *E. coli*-Zellen über GlpF führt zu einem Anschwellen der *E. coli*-Zellen, was sich in einem Abfall der Lichtstreuung bei 600 nm über einen Zeitraum von ca. 10 Sekunden zeigt (Abbildung 16 C). Die Abnahme der Streulichtintensität steht in direktem Verhältnis zur Flussrate k des Substrates Ribitol durch GlpF und kann mittels einer Fitfunktion (Formel (XII)) bestimmt werden. Die *in vivo*-Durchflussaktivität von GlpF

ist nur ein indirektes Indiz für die Stabilität des GlpF-Tetramers. Die funktionale Einheit von GlpF, die glycerin- und wasserleitende Pore, wird bereits durch das Monomer gebildet, welches folglich ebenfalls aktiv sein könnte. Änderungen der *in vivo*-Aktivität erlauben aber Aussagen über die Art des Einflusses des entsprechenden Tryptophans auf die Tetramerstabilität. Die Aktivität wurde bei der Untersuchung der Tetramerstabilität verschiedener Tryptophanvarianten berücksichtigt, stellte aber keine notwendige Bedingung für die Stabilität des GlpF-Tetramers dar.

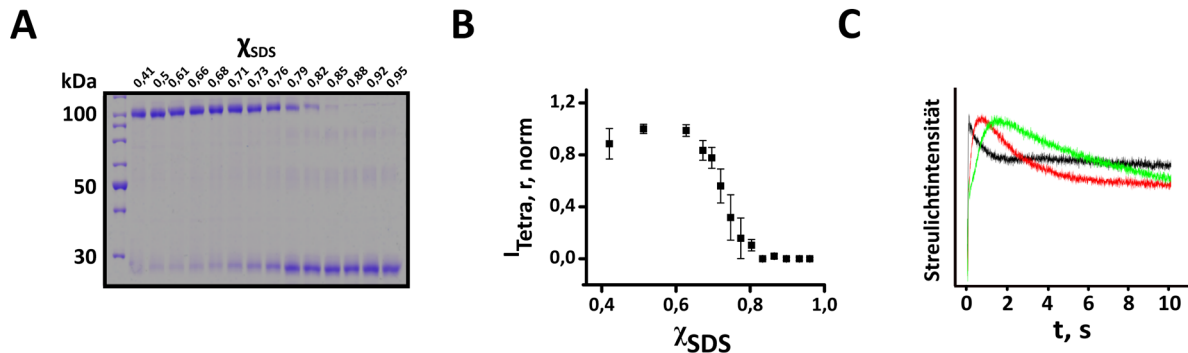


Abbildung 16: Methoden zur Bestimmung der Tetramerstabilität einzelner Tryptophanvarianten von GlpF.

(A) Exemplarisches Polyacrylamidgel von wildtypischem GlpF nach Inkubation mit ansteigenden χ_{SDS} . Die Quartärstruktur von GlpF wurde mithilfe der seminativen SDS-PAGE bestimmt. Das Tetramer ist als Bande bei 100 kDa zu erkennen. Bei Zugabe von SDS nimmt die Intensität der Bande bei 100 kDa ab, während die Bandenintensität bei 30 kDa (Monomer) zunimmt. Darüber hinaus ist eine sehr schwach ausgeprägte Bande auf der Höhe von 50 kDa zu erkennen, die dem GlpF-Dimer entspricht. (B) Quantifizierung der Bandenintensität des GlpF-Tetramers (I_{Tetra}) aus (A). Aufgetragen ist die auf das Maximum normierte (norm) Bandenintensität des GlpF-Tetramers bei 100 kDa im Verhältnis zur detektierten Bandenintensität des Gesamtproteins (relativ, r) in der entsprechenden Spur. Die Bandenintensität des Tetramers nimmt mit zunehmenden χ_{SDS} ab ($n = 3 \pm SD$). (C) Änderung der Streulichtintensität durch die Aufnahme von Ribitol in *E. coli*-Zellen über den GlpF wt (schwarz) sowie GlpF W219A (rot). GlpF W219A weist einen verlangsamten Abfall der Streulichtintensität und somit eine verringerte Durchflussaktivität im Vergleich zum GlpF wt auf. Die Durchflussrate kann durch Anpassung des Abfalls über eine doppelt exponentielle Fitfunktion (XII) bestimmt werden. Der grüne Graph zeigt den Abfall der Streulichtintensität von *E. coli*-Zellen, welche mit einem Leerplasmid transformiert wurden (Negativkontrolle).

4.1.1 Mutationen der lipidzugewandten Tryptophane zeigen keine Änderung der GlpF-Tetramerstabilität

Das GlpF-Tetramer ist als integrales Membranprotein von einer Lipiddoppelschicht umgeben. Zwei der fünf im GlpF-Monomer enthaltenen Tryptophane, ragen in die Lipidschicht des *interface* (Abbildung 17). Trp 215 ist auf der periplasmatischen Seite, Trp 76 hingegen auf der cytoplasmatischen Seite der Membran angeordnet. Beide Tryptophane nehmen die gleiche Position im jeweils entsprechenden Abschnitt der sich wiederholenden Domäne ein (siehe Abbildung 9). Die Relevanz der beiden unter physiologischen Bedingungen lipidzugewandten

Tryptophane wurde in GlpF in Detergenzumgebung untersucht. Auch wenn in dieser Arbeit keine Stabilitätsmessungen in Lipidumgebung durchgeführt wurden, wird der Begriff „lipidzugewandt“ für die ursprüngliche Position der Tryptophane im membrangebundenen GlpF im Weiteren verwendet.

Zur Bestimmung des Einflusses beider Tryptophane auf die Stabilität und Aktivität des GlpF-Tetramers wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese zwei Varianten von GlpF erstellt. Diese besitzen anstatt eines Tryptophans jeweils ein Alanin an Position 76 bzw. an Position 215. Alanin wurde als stellvertretende Aminosäure verwendet, da es keine statistische Präferenz hinsichtlich seiner Position in der Membran besitzt [52] und eine durchschnittliche Hydrophobizität im Vergleich zu den übrigen Aminosäuren aufweist [195]. Dadurch hebt Alanin als „Platzhalter“ das Fehlen der charakteristischen Eigenschaften von Tryptophan hervor, ohne massiv in die Struktur des Proteins einzugreifen.

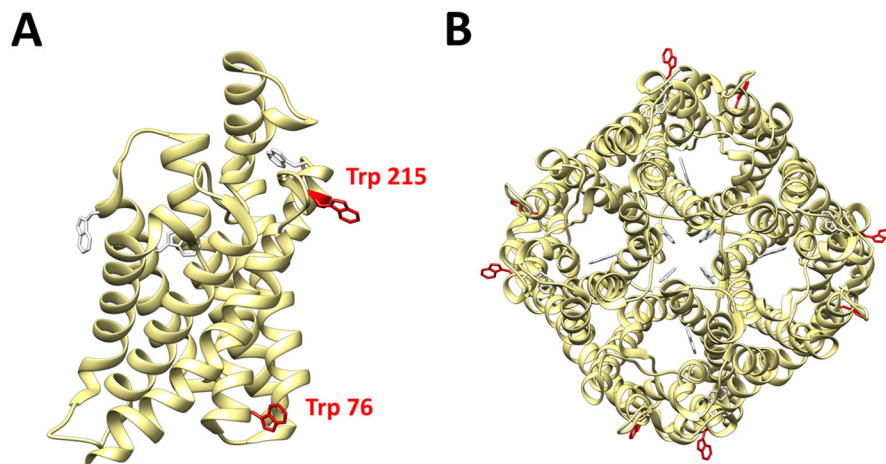


Abbildung 17: Position der lipidzugewandten Tryptophane 76 und 215 in GlpF.

(A) Seitenansicht Monomer. (B) Periplasmatische Aufsicht. Die lipidzugewandten Tryptophane sind in Rot dargestellt.

Das Acrylamidgel der seminativen SDS-PAGE zeigt sowohl für die Variante GlpF W76A als auch für GlpF W215A ausgeprägte Banden im Bereich von 100 kDa, die mit der Bandenhöhe des GlpF-Wildtyps übereinstimmen und dem Tetramer entsprechen (Abbildung 18 A). Auch der Verlauf der Abnahme der Bandenintensität unter Zugabe von SDS stimmt mit dem des Wildtyps überein (Abbildung 18 B). Folglich hat ein Austausch von Tryptophan zu Alanin an Position 76 oder 215 keine nachweisbare Auswirkung auf die Stabilität des GlpF-Tetramers.

Abbildung 18 C zeigt die Flussrate des wildtypischen GlpF sowie die der Mutanten GlpF W76A und GlpF W215A unter Berücksichtigung des Expressionsniveaus (siehe Kapitel 3.16.3.1). Die GlpF-Varianten der beiden untersuchten Zelltypen (*E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* SK 46, siehe Kapitel 3.12) weisen eine vergleichbare Tetramerstabilität auf (vgl. Abbildung 55, Anhang). Die

Durchflussraten beider Mutanten weichen nur minimal von der Flussrate des GlpF-Wildtyps ab. Demnach beeinflusst ein Austausch von Trp 76 bzw. Trp 215 zu Alanin kaum die Durchflussaktivität von GlpF.

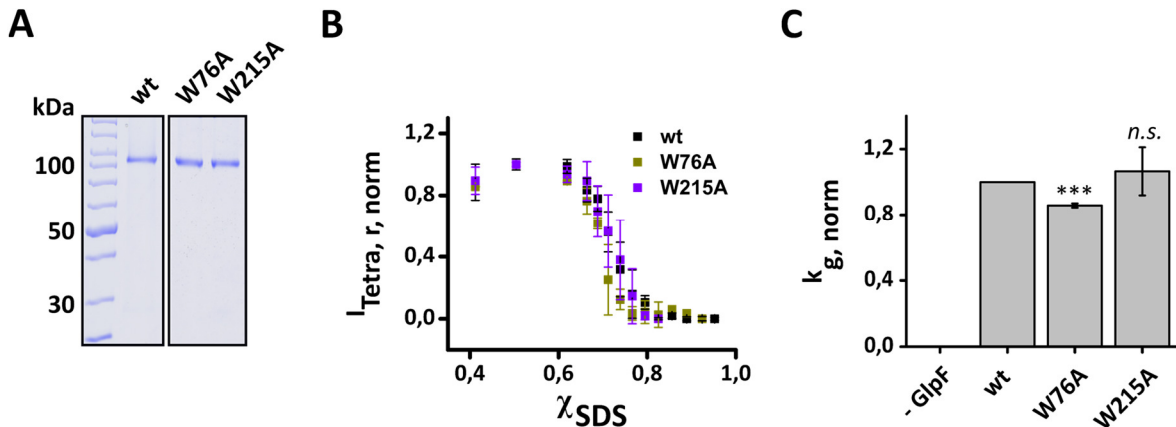


Abbildung 18: Tetramerstabilität der GlpF-Varianten, deren lipidzugewandte Tryptophane 76 und 215 jeweils durch Alanin ersetzt sind.

(A) Acrylamidgel der seminativen SDS-PAGE. Beide Bildabschnitte entstammen demselben Acrylamidgel. Die Proben des GlpF-Wildtyps sowie von GlpF W76A und W215A zeigen Banden auf Höhe des Tetramers (100 kDa). (B) Die normierte relative Tetramerbandenintensität der Tryptophanvarianten nimmt unter Zugabe von SDS identisch zum Wildtyp ab ($n = 3 \pm \text{SD}$). (C) Die Flussraten des GlpF-Wildtyps sowie der entsprechenden Varianten wurden über eine Fitfunktion für den Abfall der Lichtstreuintensität ermittelt. Das Expressionsniveau von GlpF wurde mittels Western Blot-Analyse der Membranfraktionen bestimmt und auf das Expressionsniveau des Wildtyps normiert. Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante k wurde mit dem normierten Expressionsniveau verrechnet (gewichtete Flussrate, g) und auf die Flussrate des GlpF-Wildtyps normiert (norm). Zellen, die mit einem Leerplasmid (enthält kein GlpF-Insert) transformiert wurden, dienten als Negativkontrolle (- GlpF). GlpF W76A und W215A weisen eine wildtypische Aktivität auf ($n = 3 \pm \text{SD}$). ***: $\sigma < 0,001$, *n.s.*: nicht signifikant.

Die durchgeführten *in vitro* und *in vivo*-Experimente zeigen, dass die lipidzugewandten Tryptophane innerhalb der untersuchten Kriterien keinen Einfluss auf die Aktivität und Stabilität des GlpF-Tetramers haben.

4.1.2 Untersuchungen des Tryptophan 42 in der Tetramerpore von GlpF

Trp 42 nimmt eine gesonderte Stellung in der Einteilung der Tryptophane von GlpF ein. Der Indolsubstituent des Trp 42 befindet sich, ebenso wie bei Trp 76 und Trp 215, auf Höhe des *interface* der Membran (Abbildung 19 A), ragt aber in die Pore des GlpF-Tetramers hinein (Abbildung 19 B). Da nicht bekannt ist, ob die GlpF-Tetramerpore unter physiologischen Bedingungen mit Lipid gefüllt ist, wird Trp 42 hier gesondert von den lipidzugewandten Tryptophanen (Kap. 4.1.1) betrachtet.

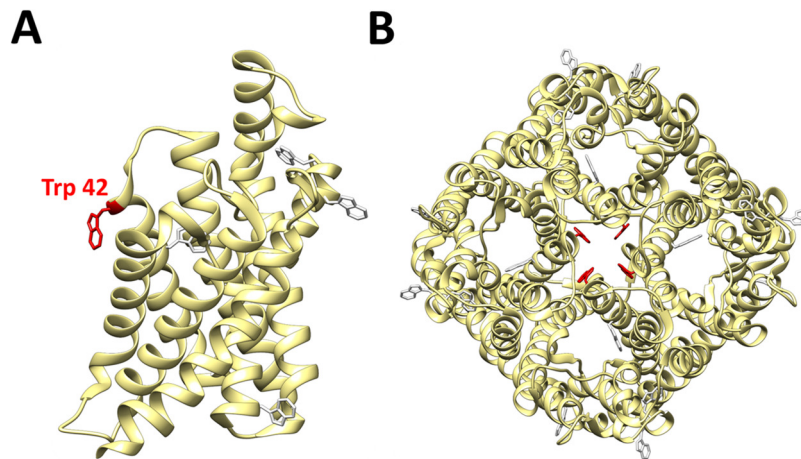


Abbildung 19: Position des Tryptophan 42 in GlpF.

(A) Seitenansicht Monomer. (B) Periplasmatische Aufsicht. Tryptophan 42 ist in Rot dargestellt.

Das Acrylamidgel von GlpF W42A zeigt eine Bande auf Höhe des Tetramers des GlpF-Wildtyps (Abbildung 20 A). Zusätzlich ist eine schwach ausgeprägte Bande unterhalb von 30 kDa sichtbar. Diese kann dem GlpF-Monomer zugeordnet werden. Die Abnahme der Tetramerbandenintensität des GlpF-Wildtyps sowie von GlpF W42A stimmen weitestgehend überein, dennoch ist GlpF W42A im Vergleich zum Wildtyp leicht destabilisiert (Abbildung 20 B). Für GlpF W42A kann folglich eine Destabilisierung des GlpF-Tetramers nachgewiesen werden.

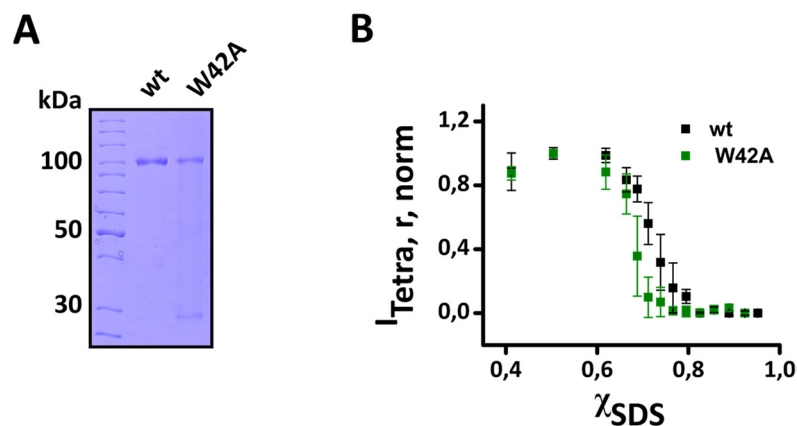


Abbildung 20: Tetramerstabilität von GlpF W42A.

(A) Das Polyacrylamidgel der seminativen SDS-PAGE von GlpF W42A zeigt eine Bande bei 100 kDa sowie eine schwach ausgeprägte Bande bei 30 kDa, die dem Monomer entspricht. (B) Die Abnahme der Tetramerbandenintensität von GlpF W42A weicht geringfügig vom wildtypischen Verlauf ab. Das Tetramer von GlpF W42A ist im Vergleich zum GlpF-Wildtyp leicht destabilisiert ($n = 3 \pm \text{SD}$). GlpF W42A weist keine Aktivität auf (Änderung der Streulichtintensität vergleichbar mit Negativkontrolle, Abbildung 16).

Die GlpF W42A-Mutante wies im *in vivo*-Aktivitätsassay keine Durchflussaktivität auf. Die Änderung des Signals war mit der der Negativkontrolle vergleichbar (vgl. Abbildung 16). Trotz der Präsenz eines Monomers liegt GlpF hauptsächlich als Tetramer vor, welches aber im Vergleich

zum Tetramer des GlpF-Wildtyps eine leicht verringerte Stabilität aufweist. Der Unterschied im Verlauf der Destabilisierung ist allerdings gering.

Folglich hat Trp 42 einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von GlpF, ohne jedoch die Stabilität des GlpF-Tetramers maßgeblich zu beeinträchtigen.

4.1.3 Die proteinzugewandten Tryptophane in GlpF sind relevant für die Aktivität und Stabilität des GlpF-Tetramers

4.1.3.1 Das zentral gelegene Tryptophan 48 hat Einfluss auf die Stabilität und Aktivität von GlpF

Trp 48 ist im Inneren des GlpF-Monomers in der Mitte der substratleitenden Pore lokalisiert (Abbildung 21) und nimmt als Teil des Selektivitätsfilters eine bekannte und wichtige Funktion in GlpF ein (vgl. Kapitel 1.4.1). Um den Einfluss einer Trp 48 zu Alanin-Mutation auf die Stabilität und Aktivität des GlpF Tetramers zu prüfen, wurde dieses gegen Alanin ausgetauscht (GlpF W48A). Diese Variante weist im Acrylamidgel keine Bande auf, welche der Tetramerbande des GlpF-Wildtyps entspricht (Abbildung 22 A); vielmehr ist für GlpF W48A eine Verteilung der Banden bei 70 kDa, 50 kDa und < 30 kDa zu erkennen, wobei letztere die prominenteste Bande darstellt und dem GlpF-Monomer entspricht. Diese Verteilung ändert sich auch unter Zugabe ansteigender χ_{SDS} nicht (Abbildung 57, Anhang). Die Durchflussrate von GlpF W48A ist im Vergleich zum Wildtyp um $\sim 30\%$ reduziert (Abbildung 22 C). Trp 48 ist laut dieser Resultate nicht nur, wie bereits bekannt, für die Durchflussaktivität, sondern auch für die GlpF-Tetramerstabilität von Bedeutung. Besonders das vollständige Fehlen der Tetramerbande von GlpF W48A im Acrylamidgel (Abbildung 22 A) deutet auf die Relevanz von Trp 48 bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers hin.

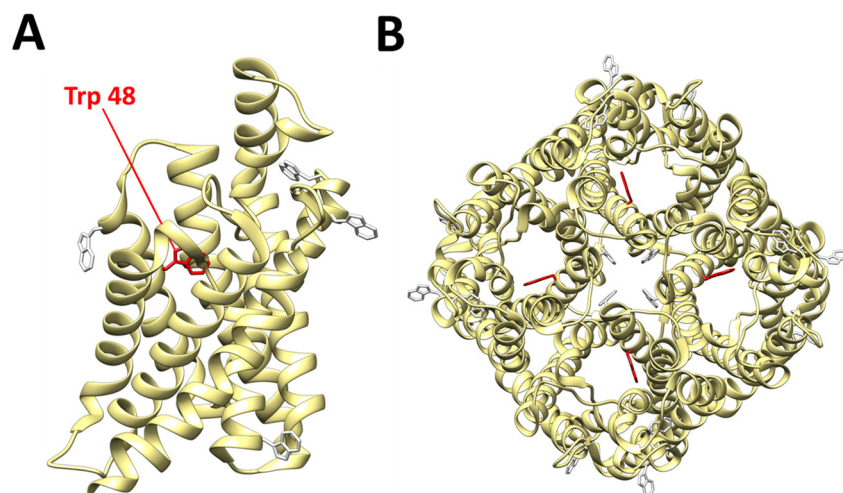


Abbildung 21: Position des Tryptophan 48 in GlpF. (A) Seitenansicht GlpF-Monomer. (B) Periplasmatische Aufsicht. Tryptophan 48 ist in Rot dargestellt.

Um den Einfluss von Trp 48 auf die Stabilität und Funktion des GlpF-Tetramers genauer zu untersuchen, wurde Trp 48 in zwei weiteren GlpF-Varianten durch Phenylalanin und Tyrosin ersetzt. Diese Aminosäuren können bedingt die Eigenschaften von Tryptophan imitieren. Phenylalanin hat im Hinblick auf seine Hydrophobizität und Aromatizität große Ähnlichkeit mit Tryptophan. Allerdings fehlt dem Phenylalanin die NH-Gruppe des Indolrings von Tryptophan, die die Ausbildung spezifischer Wasserstoffbrücken ermöglicht. Im Gegensatz dazu besitzt Tyrosin eine Hydroxygruppe, die zur Ausbildung potenzieller Wasserstoffbrücken imstande ist. Auch wenn beide Aminosäuren nicht alle Eigenschaften von Tryptophan aufweisen, so ist die Untersuchung dieser zusätzlichen Varianten wichtig für das Verständnis der Wechselwirkungen, die für die Stabilisierung des GlpF-Tetramers notwendig sind.

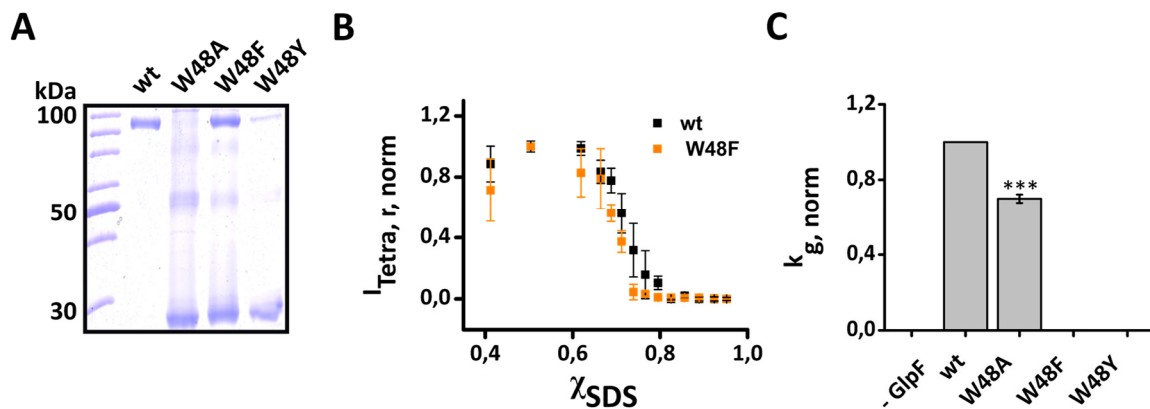


Abbildung 22: Tetramerstabilität der GlpF-Varianten W48A, W48F und W48Y im Vergleich zum GlpF Wildtyp.

(A) Polyacrylamidgel der seminativen SDS-PAGE des GlpF-Wildtyps und der erstellten Varianten mit ausgetauschtem Tryptophan 48. Nur die Spuren des GlpF-Wildtyps und der Variante GlpF W48F weisen jeweils eine Bande bei 100 kDa auf, die dem GlpF-Tetramer entspricht. Im Vergleich zum GlpF wt liegt GlpF W48F sowohl als Mono-, als auch als Tetramer vor. Die schwach erkennbare Bande auf Höhe des GlpF-Tetramers bei GlpF W48Y konnte nicht GlpF zugeordnet werden. (B) Die SDS-induzierte Abnahme der Tetramerbandenintensität von GlpF W48F entspricht der des wildtypischen GlpF ($n = 3 \pm SD$). (C) Durchflussaktivität der erstellten Varianten GlpF W48A, W48F und W48Y. Angegeben ist die Flussrate k , welche unter Berücksichtigung des Expressionsniveaus bestimmt (gewichtete Flussrate, g) und im Verhältnis zur Flussrate des GlpF-Wildtyps angegeben wird (normiert, $norm$). Zellen, die mit einem Leerplasmid (enthält kein GlpF-Insert) transformiert wurden, dienten als Negativkontrolle (- GlpF). GlpF W48A besitzt eine um 30 % reduzierte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. GlpF W48F und W48Y weisen keine Aktivität auf ($n = 3 \pm SD$). ***: $\sigma < 0,001$.

Im Polyacrylamidgel zeigt GlpF W48F eine ausgeprägte Bande bei 100 kDa (Abbildung 22 A). Des Weiteren ist eine Verteilung von Banden zu sehen, die dem Dimer (50 kDa) und dem Monomer (< 30 kDa) entspricht. GlpF W48F liegt demnach sowohl als Tetramer, als auch als Monomer vor. Beide Zustände werden in äquivalenten Mengen populiert. Diese Verteilung ist allerdings nicht in den Acrylamidgelen zur Analyse der GlpF-Tetramerstabilität unter ansteigenden χ_{SDS} sichtbar (siehe Abbildung 22 B (Gesamtprotein liegt bei $\chi_{SDS} = 0,5$ als Tetramer vor) und Abbildung 56,

Anhang). Dies kann möglicherweise mit dem Einsatz hoher Konzentrationen an GlpF W48F zusammenhängen, die für einen Vergleich von GlpF W48F mit dem GlpF wt im Acrylamidgel (Abbildung 22 A) verwendet werden mussten. Die Aufteilung von GlpF W48F im Acrylamidgel in zwei Populationen lässt sich demnach nur ab einer hohen GlpF W48F-Konzentration beobachten. Der Verlauf der Abnahme des Tetramers von GlpF W48F unter Zugabe von SDS weicht aber nur gering von dem des GlpF-Wildtyps ab und bewegt sich größtenteils innerhalb des Fehlerbereichs der Messwerte des GlpF-Wildtyps (Abbildung 22 B): Der tetramere Anteil von GlpF W48F besitzt daher eine Stabilität, die mit dem GlpF-Wildtyp identisch ist. GlpF W48Y weist ausschließlich eine Bande auf Höhe des GlpF-Monomers auf (Abbildung 22 A). Im Gegensatz zum Phenylalanin ist eine Stabilisierung des Tetramers durch ein Tyrosin an Position 48 also auch nicht gewährleistet. Der Substratfluss ist bei der GlpF W48F-, sowie der GlpF W48Y-Mutante inhibiert (Abbildung 22 C). Beide Aminosäuren können Trp 48 als Teil des Selektivitätsfilters nicht ersetzen. Die Durchflussaktivität der Variante GlpF W48A ist möglicherweise durch einen weniger selektiven Substratfluss zu erklären, der durch den Einsatz der strukturell kleineren Aminosäure Alanin an Position 48 ermöglicht wird.

Trp 48 hat als Teil des Selektivitätsfilters folglich neben seiner Funktion für den Substratfluss auch einen stabilisierenden Effekt auf das GlpF-Tetramer. Die Existenz zweier Populationen Die Stabilität des GlpF-Tetramers kann durch das strukturell ähnliche Phenylalanin für die tetramere Population erhalten werden. Der vollständige, wildtypische Substratfluss von GlpF wird hingegen nur durch ein Tryptophan an Position 48 gewährleistet.

4.1.3.2 Der Austausch von Tryptophan 219 beeinflusst maßgeblich die Aktivität und Stabilität des GlpF-Tetramers

Das GlpF-Monomer besitzt drei periplasmatische Loop-Regionen (Loop A, C und E, vgl. Abbildung 9). Trp 219 ist am austretenden Loop E lokalisiert und befindet sich an der Außenseite des GlpF-Tetramers (Abbildung 23). An dieser Position ist Trp 219 sowohl von der substratleitenden Pore, als auch von den angrenzenden Helices, die an der Oligomerisierung beteiligt sind, räumlich getrennt. Der Indolsubstituent ist dabei den umgebenden Loopregionen zugewandt.

Die erstellte GlpF-Variante W219A weist im Gegensatz zum GlpF-Wildtyp nur eine ausgeprägte Bande im Acrylamidgel auf, die dem Monomer (~ 30 kDa) entspricht (Abbildung 24 A). Darüber hinaus sind noch schwächer ausgeprägte Banden vorhanden, die auf Höhe des Dimers (~ 50 kDa) und eines Trimers (~ 70 kDa) liegen. Eine Bande, die dem Tetramer (~ 100 kDa) entspricht, ist nicht sichtbar. Die Aktivität von GlpF W219A ist im Vergleich zum Wildtyp um die Hälfte reduziert (Abbildung 24 C). Darüber hinaus ist das Expressionsniveau von GlpF W219A im Vergleich zu allen übrigen Tryptophanvarianten von GlpF besonders gering (vgl. Abbildung 55, Anhang). Die

Resultate zeigen die besondere Relevanz von Trp 219 für das GlpF-Tetramer, da sowohl die Tetramerstabilität als auch die Aktivität und das Expressionsniveau bei einem Austausch von Trp 219 zu Alanin eingeschränkt werden.

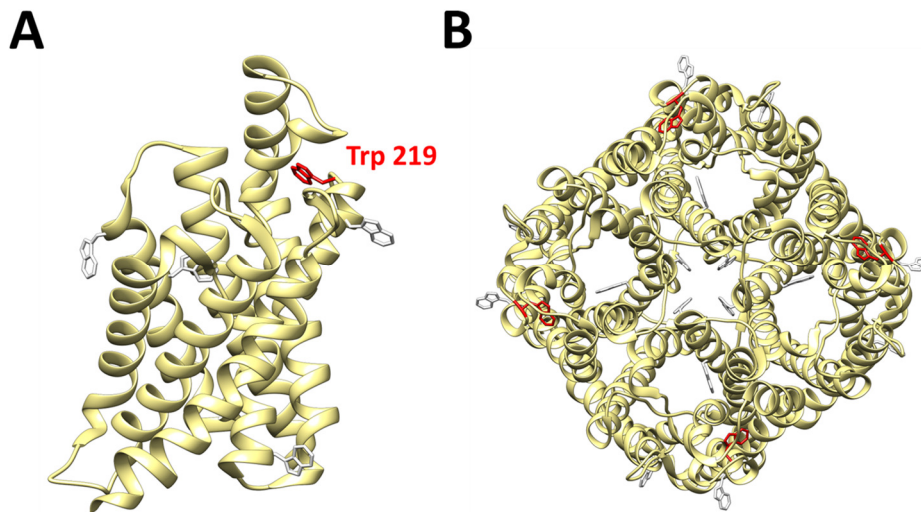


Abbildung 23: Position des Tryptophan 219 in GlpF.

(A) Seitenansicht Monomer. Trp 219 ist auf dem periplasmatischen Loop E lokalisiert und ist mit dem Indolsubstituent dem Inneren des Proteins zugewandt. (B) Periplasmatische Aufsicht. Tryptophan 219 ist in Rot dargestellt.

Die Notwendigkeit eines Tryptophans an Position 219 im GlpF-Wildtyp sowie die Art der Wechselwirkungen, die an dieser Position eine Rolle spielen, wurden im Weiteren analysiert. Zu diesem Zweck wurden Varianten von GlpF über die ortsspezifische Mutagenese erstellt, die anstatt des Tryptophans ein Phenylalanin bzw. ein Tyrosin an Position 219 besitzen. Im Acrylamidgel zeigt GlpF W219F bei ~ 100 kDa eine dem Tetramer entsprechende Bande. Eine Bande in der Größenordnung des Monomers (~ 30 kDa) ist ebenfalls sichtbar. Im Gegensatz zur Monomerbande von GlpF W219A ist diese allerdings schwach ausgeprägt und der Großteil von GlpF W219F liegt als Tetramer vor. Die Auswertung der SDS-Titration von GlpF W219F zeigt eine Abnahme der Tetramerbandenintensität bereits bei niedrigeren χ_{SDS} (Abbildung 24 B), sodass das Tetramer bereits bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,6$ nicht mehr detektiert werden kann. Im Gegensatz dazu ist das Tetramer des GlpF-Wildtyps bis zu $\chi_{\text{SDS}} = 0,82$ zu erkennen. GlpF W219F liegt als Tetramer vor, das unter Zugabe von SDS im Vergleich zum GlpF wt stark destabilisiert ist. Die weitere erstellte Variante GlpF W219Y zeigt im Polyacrylamidgel eine prominente Bande bei ~ 30 kDa (Monomer) und eine schwache Bande, die sich auf Höhe des GlpF-Tetramers befindet. Die SDS-Titration weist keine Änderung der Bandenverteilung unter Zugabe von SDS auf (Abbildung 57, Anhang). GlpF W219Y stellt demnach unter den gegebenen Bedingungen ($\chi_{\text{SDS}} \leq 0,4$) eine monomere Variante von GlpF dar. Die *in vivo*-Messung der Durchflussaktivität des GlpF wt sowie der erstellten Mutanten zeigt bei GlpF W219F eine wildtypische Aktivität. Ein Austausch von Tryptophan gegen Phenylalanin hat laut diesen Ergebnissen keinen Einfluss auf die Aktivität von

GlpF. Im Gegensatz dazu zeigt GlpF W219Y im Vergleich zum GlpF wt eine reduzierte Aktivität, dieser Unterschied ist aber nicht signifikant (Abbildung 24 C).

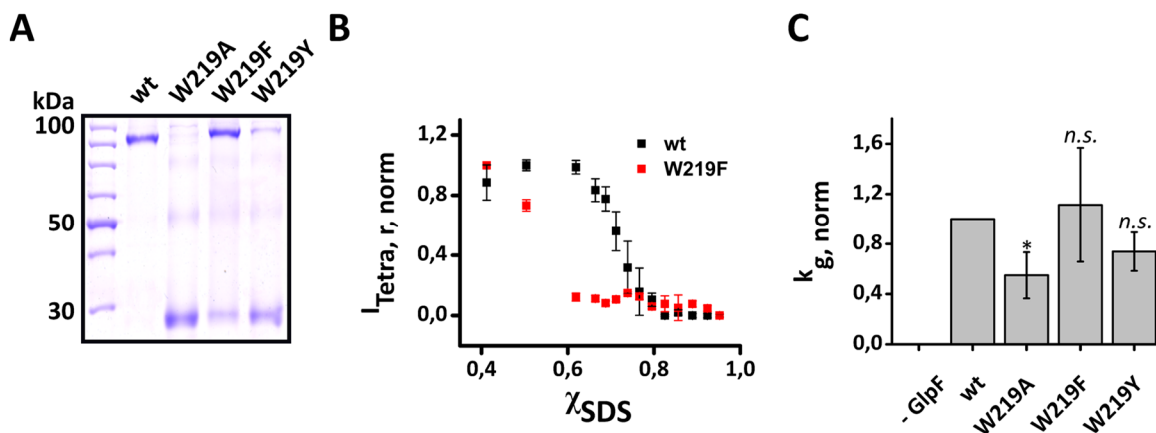


Abbildung 24: Vergleich der Tetramerstabilität der GlpF-Varianten W219A, W219F und W219Y mit der Stabilität des GlpF-Wildtyps.

(A) Polyacrylamidgel der seminativen SDS-PAGE-Analyse des GlpF-Wildtyps sowie der erstellten Varianten. Neben dem GlpF wt zeigt ausschließlich GlpF W219F eine Bande, die dem Tetramer entspricht (die Bande bei GlpF W219Y (100 kDa) konnte nicht GlpF zugeordnet werden). (B) Die Abnahme der entsprechenden Bandenintensität des GlpF W219F-Tetramers beginnt im Vergleich zum GlpF wt bereits bei geringeren χ_{SDS} . Bei $\chi_{SDS} = 0,6$ lässt sich die Tetramerbande für GlpF W219F nur noch schwach detektieren. Das Tetramer der Variante GlpF W219F ist im Vergleich zum Wildtyp destabilisiert ($n = 3 \pm SD$). (C) Durchflussaktivität der erstellten Varianten GlpF W219A, W219F und W219Y im Verhältnis zum GlpF-Wildtyp. Angegeben ist die Flussrate k , welche unter Berücksichtigung des Expressionsniveaus bestimmt (gewichtete Flussrate, g) und im Verhältnis zur Flussrate des GlpF-Wildtyps angegeben wurde (normiert, $norm$). Zellen, die mit einem Leerplasmid (enthält kein GlpF-Insert) transformiert wurden, dienten als Negativkontrolle (- GlpF). GlpF W219A und W219Y zeigen beide eine reduzierte Aktivität im Verhältnis zum GlpF wt. Die Flussrate k von GlpF W219F entspricht weitestgehend der des wildtypischen GlpF ($n = 3 \pm SD$), *: $\sigma < 0,05$, *n.s.*: nicht signifikant.

Die besondere Relevanz von Trp 219 für die Tetramerstabilität des GlpF-Wildtyps wurde in den durchgeführten Experimenten belegt. Auch der Austausch von Tryptophan gegen Phenylalanin bzw. Tyrosin an Position 219 zeigte einen erheblichen Einfluss auf die Tetramerstabilität, jedoch nicht auf die Aktivität von GlpF. Dies liefert wichtige Hinweise auf die Eigenschaften der funktionellen Gruppen und die Art der Wechselwirkungen, die für die Stabilisierung des GlpF-Tetramers notwendig sind. Bezüglich seiner Position im GlpF-Monomer und Tetramer ist diese Relevanz von Trp 219 (im Gegensatz zu Trp 48) allerdings nicht unmittelbar ersichtlich. Aus diesem Grund wurde Trp 219 in einem größeren Zusammenhang untersucht und auch die Umgebung von Trp 219 einbezogen. Diese Resultate sind in Kapitel 4.2 zusammengefasst.

4.2 Tryptophan 219: Relevanz für die Oligomerisierung und Funktion von GlpF

Im vorigen Kapitel wurde wichtige Rolle von Trp 219 bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers gezeigt. Die Position von Trp 219 in GlpF schließt jedoch sowohl Wechselwirkungen mit den benachbarten GlpF-Monomeren, als auch eine zentrale, stabilisierende Lage in GlpF aus. Trp 219 befindet sich in der Peripherie des GlpF-Tetramers in einem Loop, welcher in das Periplasma ragt (siehe Abbildung 23). Die Rolle des Trp 219 im GlpF-Tetramer wurde daher genauer untersucht.

4.2.1 Tryptophan 219 ist in Aquaglyceroporinen hoch konserviert

GlpF ist hinsichtlich seiner Orientierung in der Membran asymmetrisch aufgebaut: Im Gegensatz zur cytoplasmatischen Seite umfasst die periplasmatische Seite von GlpF mehrere Loops und Bereiche, die in die wässrige Umgebung ragen und als sog. periplasmatisches „Vestibül“ von GlpF zusammengefasst werden [136]. Auf Grundlage von Strukturvergleichen und MD-Simulationen fanden Wang *et al.* [137] vier markante Bereiche innerhalb dieser Vestibülregion (Abbildung 25, blau). Diese Bereiche kommen zwar in GlpF, jedoch nicht in dem strukturell homologen *E. coli*-Aquaporin AqpZ vor. AqpZ ist im Gegensatz zu GlpF als Aquaporin ein ausschließlich wasserleitender Kanal und besitzt neben einer engeren, hydrophileren Pore ein weniger ausgeprägtes periplasmatisches Vestibül als das Aquaglyceroporin GlpF.

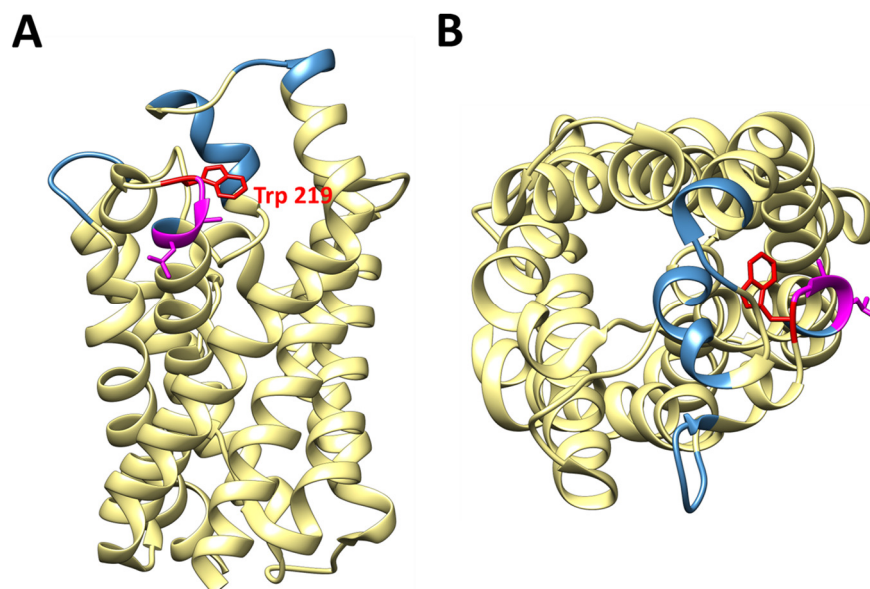


Abbildung 25: Charakteristische Loopregionen des Vestibüls von GlpF.

(A) Seitenansicht und (B) Periplasmatische Aufsicht des GlpF-Monomers mit vier Loopregionen des GlpF-Vestibüls (blau), welche nach dem Strukturvergleich in [137] im Aquaglyceroporin GlpF, aber nicht im *E. coli* Aquaporin AqpZ vorkommen. Eine dieser Loopregionen enthält einen Abschnitt (LAGW, pink), der in Aquaglyceroporinen häufig vorkommt. Trp 219 (rot) befindet sich in diesem Abschnitt. (PDB-ID: 1FX8).

Die vier GlpF-spezifischen Bereiche (Abbildung 25, blau) erweitern vor allem die Loop-Regionen des Vestibüls von GlpF, und zwar um 4-6 Aminosäuren im Vergleich zum Aquaporin AqpZ. Dies vergrößert das gesamte Vestibül von GlpF, welches dadurch deutlich weiter in das Periplasma der Zelle ragt als der periplasmatische Bereich von AqpZ. Auch Trp 219 befindet sich in einem dieser vier markanten Bereiche. Dieser besteht aus einer Sequenz von fünf Aminosäuren (WLAGW, Abbildung 25).

Um die allgemeine Relevanz von Trp 219 in Aquaglyceroporinen genauer zu ermitteln, wurde ein Vergleich der Aminosäuresequenz von GlpF mit den entsprechenden Sequenzen von humanen Aquaporinen und Aquaglyceroporinen sowie mit Sequenzen von Aquaglyceroporinen anderer Lebewesen durchgeführt und der Bereich WLAGW näher betrachtet (Abbildung 26 und Abbildung 63, Anhang). Laut diesem Vergleich befindet sich der bereits erwähnte WLAGW-Bereich in einem Sequenzabschnitt, der in den klassischen Aquaporinen vollständig fehlt (Abbildung 26). In Aquaglyceroporinen höherer Organismen hingegen, ist der WLAGW-Bereich vorhanden. Ein Teil des WLAGW-Bereiches, LAGW, ist in den meisten Vertebraten sogar konserviert (Abbildung 26 und Abbildung 63, Anhang). Vor allem Trp 219 ist in Aquaglyceroporinen hoch konserviert und ist lediglich in wenigen, phylogenetisch entfernteren Organismen (*Plasmodium*, *Caenorhabditis*) durch Tyrosin ersetzt (Abbildung 26).

Die durchgeführte Sequenzanalyse und der Strukturvergleich von Wang *et al.* [137], sprechen für eine Rolle von Trp 219, die eindeutig mit der Struktur und Funktion von Aquaglyceroporinen verbunden ist. Die Rolle von Trp 219 in GlpF kann mit einer strukturellen Eigenschaft verbunden sein, die Aquaglyceroporine explizit von Aquaporinen unterscheidet.

Aquaglyceroporine

<i>Escherichia coli</i> (GlpF)	KVFAW LAGW GNVAFTG-GRDIPYFL	234
<i>Plasmodium falciparum</i>	RFLSLIA- Y GKDTFTK-DNF--YFW	221
<i>Leishmania major</i>	RILSAML- W GSEPFTL-HSY--YFW	288
<i>Leishmania tarentolae</i>	RVLSAML- W GSEPFTL-HDH--YFW	255
<i>Caenorhabditis elegans</i>	RLFSYFI- Y GPGVFHSPYPN--YWL	253
<i>Rattus norvegicus</i> (AQP7)	RFFTFIAG W GKKVFSA-GNN--WWW	239
<i>Mus musculus</i> (AQP7)	RLFTFIAG W GKQVFRA-GNN--WWW	240
<i>Rattus norvegicus</i> (AQP9)	RLFTALAG W GFEVFTV-GNN--FWW	245
<i>Mus musculus</i> (AQP9)	RLFTALAG W GFEVFTF-GNN--FWW	245
<i>Rattus norvegicus</i> (AQP3)	RLFTALAG W GSEVFTT-GQN--WWW	244
<i>Bos taurus</i> (AQP3)	RLFTAIAG W GSEVFTT-GRH--WWW	244
<i>Sus scrofa</i> (AQP3)	RLFTAIAG W GSEVFTT-GRH--WWW	244
<i>Macaca fascicularis</i> (AQP7)	RVFTFIAG W GKEVFSE-GEN--WWW	255
<i>Homo sapiens</i> (AQP3)	RLFTALAG W GSAVFTT-GQH--WWW	244
<i>Homo sapiens</i> (AQP7)	RIFTFIAG W GKQVFSN-GEN--WWW	255
<i>Homo sapiens</i> (AQP9)	RLFTALAG W GFEVFRA-GNN--FWW	245
<i>Homo sapiens</i> (AQP10)	RLFTYVAG W GPEVFSA-GNG--WWW	243

Aquaporine

<i>Homo sapiens</i> (AQP0)	AILT-----GNFT-NHW	202
<i>Homo sapiens</i> (AQP1)	AVIT-----HNFS-NHW	210
<i>Homo sapiens</i> (AQP2)	AVVT-----GKFD-DHW	202
<i>Homo sapiens</i> (AQP4)	AVIM-----GNWE-NHW	231
<i>Homo sapiens</i> (AQP5)	AVVM-----NRFSPAHW	204
<i>Homo sapiens</i> (AQP6)	AIII-----GKFT-VHW	214
<i>Homo sapiens</i> (AQP8)	AVVA-----NHWN-FHW	228

Abbildung 26: Vergleich der Aminosäuresequenz der GlpF-Loopregion WLAGW mit der aus Aquaglyceroporinen und Aquaporinen unterschiedlicher Organismen.

Trp 219 aus GlpF und die ihm entsprechenden Aminosäuren anderer Organismen sind fett hervorgehoben. Die Sequenz LAGW (gelb) kommt besonders häufig in Aquaglyceroporinen vor. Trp 219 (GlpF) ist in Aquaglyceroporinen hoch konserviert und wird nur in wenigen Fällen durch Tyrosin ersetzt. Die Loopregion um LAGW fehlt vollständig in Aquaporinen (hier repräsentiert durch die humanen Aquaporine). Die Sequenzen wurden der Datenbank UniprotKB/TrEMBL entnommen und mit dem Programm Clustal Omega erstellt.

4.2.2 Die Tryptophan 219-Umgebung ist für die Tetramerstabilität von GlpF essenziell

Die in diesem Kapitel vorgestellten Daten wurden teilweise im Rahmen einer Bachelorarbeit zusammen mit Frau Miriam Vogt gewonnen.

Um zu verstehen, weshalb Trp 219 einen starken Einfluss auf die Stabilität des GlpF-Tetramers hat und warum diese Aminosäure explizit in Aquaglyceroporinen hoch konserviert ist, wurde die Umgebung von Trp 219 genauer untersucht. Der Indolsubstituent von Trp 219 ragt in das Innere des Proteins und ist von mehreren Aminosäuren umgeben, die als potenzielle Interaktionspartner in Betracht kommen (Abbildung 27 A). Aufgrund seiner funktionellen Gruppe sind für Tryptophan mehrere Arten der Wechselwirkung mit den umgebenden Aminosäuren möglich [196]. Neben der Ausbildung von Wasserstoffbrücken gehören hierzu auch aromatische Wechselwirkungen, u.a. π - π -Wechselwirkungen und Kation- π -Wechselwirkungen. Diese haben eine maximale Reichweite von 7 Å [197,198]. Für die Untersuchung potenzieller Interaktionspartner von Trp 219 wurden deshalb Aminosäuren in einem Radius von 3-7 Å um Trp 219 gewählt. Die Zahl der möglichen Interaktionspartner reduzierte sich dadurch auf vier Aminosäuren, die um Trp 219 angeordnet sind (Abbildung 27 A). Drei dieser Aminosäuren sind aromatisch (Tyr 105, Phe 112, Phe 135) und könnten über π - π -Wechselwirkungen mit Trp 219 interagieren. Arg 123 ist aufgrund von Kation- π -Wechselwirkungen ebenfalls ein potenzieller Interaktionspartner von Trp 219.

Der Austausch der entsprechenden Aminosäuren gegen Alanin wurde erneut mittels ortsspezifischer Mutagenese durchgeführt. Die Überprüfung des oligomeren Zustandes erfolgte mittels seminativer SDS-PAGE-Analyse. Zusätzlich fand eine Bestimmung der Stabilität des Proteins unter Einfluss von SDS mit Hilfe einer SDS-Titration statt. Die Acrylamidgele des GlpF-Wildtyps sowie der in Kapitel 4.1 vorgestellten GlpF-Variante W219A sind zusammen mit den neu erstellten Varianten in Abbildung 27 B gezeigt. Das wildtypische GlpF weist die charakteristische Tetramerbande bei 100 kDa auf. Die Spur mit der Probe von GlpF F135A besitzt keine Banden, da diese Variante in *E. coli* BL21(DE3) nicht exprimiert werden konnte. Die weiteren Varianten von GlpF (F112A, R123A, Y105A) verteilen sich jeweils auf zwei Banden, die dem Monomer und dem Dimer von GlpF entsprechen. Diese Verteilung ändert sich auch unter Zugabe von SDS nicht (Abbildung 57, Anhang). Die Bande, die dem Monomer entspricht, ist bei allen Varianten am stärksten ausgeprägt. Die Bandenverteilung und -intensität ist bei allen untersuchten Varianten (Ausnahme: GlpF F135A, nicht exprimiert) ähnlich und zur bereits untersuchten Variante GlpF W219A identisch (Abbildung 27). Eine dem Tetramer entsprechende Bande ist bei keiner dieser GlpF-Varianten vorhanden. Alle untersuchten Aminosäuren sind folglich an der Stabilisierung des GlpF-Tetramers beteiligt.

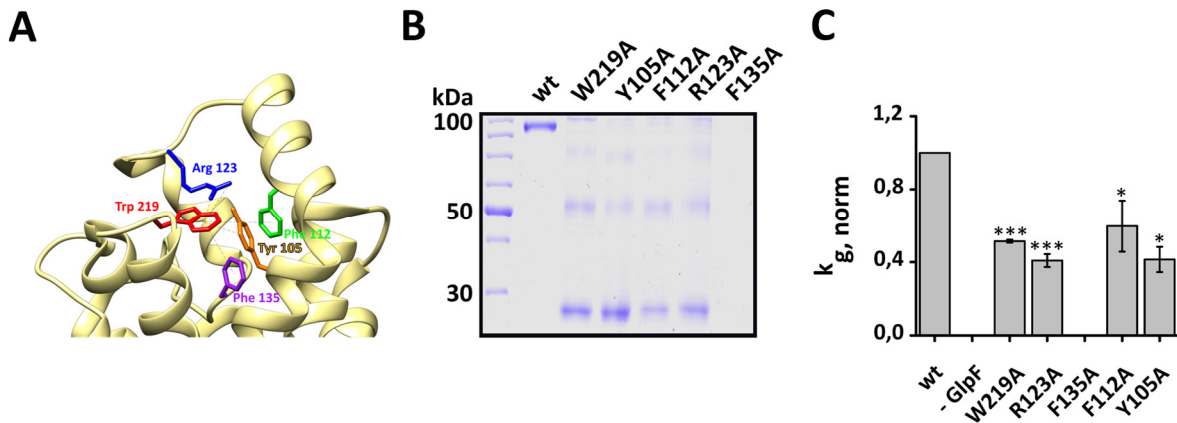


Abbildung 27: Untersuchung der Umgebung von Trp 219.

(A) Ausschnitt der Umgebung des GlpF-Monomers mit Trp 219 und seinen potenziellen Interaktionspartnern im Radius von 7 Å. (B) Polyacrylamidgel der seminativen SDS-PAGE des GlpF-Wildtyps, GlpF W219A und der GlpF-Varianten, in denen die potenziellen Interaktionspartner von Trp 219 gegen Alanin ausgetauscht worden sind. Keine der untersuchten Varianten liegt in Form eines Tetramers vor. Die Bandenverteilung dieser Varianten ist mit der von GlpF W219A identisch. GlpF F135A konnte nicht in BL21(DE3)-Zellen exprimiert werden. (C) Durchflussaktivität der untersuchten Varianten GlpF R123A, F112A und Y105A. Angegeben ist die Flussrate k , welche unter Berücksichtigung des Expressionsniveaus bestimmt (gewichtete Flussrate, g) und im Verhältnis zur Flussrate des GlpF-Wildtyps angegeben wird (normiert, norm). Zellen, die mit einem Leerplasmid (enthält kein GlpF-Insert) transformiert wurden, wurden als Negativkontrolle verwendet (- GlpF). Alle Mutanten zeigen eine um ~ 50-60 % reduzierte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp ($n = 3 \pm \text{SD}$). GlpF F135A konnten in SK46-Zellen nicht exprimiert werden. *: $\sigma = 0,05$; ***: $\sigma = 0,001$.

Im Einklang mit den Ergebnissen der durchgeführten Aktivitätsmessungen an GlpF W219A (Kap. 4.1.3.2), zeigten die erstellten GlpF-Varianten eine eingeschränkte Durchflussaktivität (Abbildung 27 C). Diese ist bei GlpF W219A im Vergleich zum Wildtyp um 50 % reduziert. Bei den Varianten der Trp 219-umgebenden Aminosäuren ist die Durchflussaktivität um 50-60 % reduziert. GlpF F135A konnte nicht in *E. coli* SK46-Zellen exprimiert werden.

Da alle Varianten der Trp 219 umgebenden Aminosäuren ähnlich destabilisiert sind, lässt sich eine Wechselwirkung mit Trp 219 bei keiner der Aminosäuren ausschließen. Potenziell können alle untersuchten Aminosäuren in Wechselwirkung zu Trp 219 stehen. Die Aminosäuren, die Trp 219 umgeben, sind laut dieser Resultate ebenfalls für die Tetramerstabilität und Aktivität von GlpF relevant.

Die Versuche aus Kap. 4.1 und 4.2 geben Hinweise auf die Rolle der Tryptophane für die Stabilität und Aktivität im GlpF-Tetramer. Zusätzlich stellen die generierten GlpF-Varianten aber auch die Grundlage für die im Folgenden beschriebenen Experimente dar und werden zur näheren Untersuchung des Entfaltungsweges von GlpF verwendet. Die Stabilitäten der untersuchten Varianten beruhen auf den Resultaten, die in Kap. 4.1 und Kap. 4.2 beschrieben wurden.

4.3 Untersuchung der SDS-induzierten Entfaltung von GlpF unter Gleichgewichtsbedingungen

Sowohl die Faltung als auch die Mechanismen der Stabilisierung und Destabilisierung oligomerer α -helikaler Membranproteine sind bis heute nicht hinreichend erforscht. Um Rückschlüsse über (de-)stabilisierende Faktoren, Interaktionen und Faltungsschritte hauptsächlich der Quartär- und Tertiärstruktur, aber auch der Sekundärstruktur zu erhalten, wurde das tetramere Aquaglyceroporin GlpF als Modellprotein verwendet und seine schrittweise Entfaltung im Hinblick auf Änderungen seiner Struktur *in vitro* untersucht.

Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ist die Verwendung des anionischen Detergenz SDS, durch dessen Einfluss sich die Entfaltung von GlpF unter *in vitro*-Bedingungen untersuchen lässt. Die Entfaltungsmessungen basieren auf der Zugabe ansteigender Konzentrationen an SDS zu Ansätzen des in DDM solubilisierten GlpF, einem Verfahren, das in der Literatur als SDS-Titration bezeichnet wird [127,199]. Der Begriff der Titration ist in diesem Zusammenhang nicht definitionsgemäß [200], da in diesem Fall der Titrant (hier: SDS) nicht zu einer Ausgangslösung gegeben, sondern in ansteigenden Konzentrationen auf mehrere Aliquots der Probelösung verteilt wird. Die Ausbildung gemischter SDS-Mizellen mit dem ungeladenen Detergenz DDM sowie der entsprechende Wirkmechanismus wurden bereits in Kap. 1.3.4 beschrieben.

Die über die SDS-Titration induzierte Dissoziation der Quartärstruktur des tetrameren GlpF kann mittels seminativer SDS-PAGE verfolgt werden (siehe Kap. 3.15.2). Ein Polyacrylamidgel der SDS-Titration von GlpF ist (in anderem Zusammenhang) exemplarisch in Abbildung 16 A gezeigt. Mit ansteigenden χ_{SDS} nimmt die Intensität der GlpF-Bande bei 100 kDa (Tetramer) ab (Abbildung 16 B), bis sie nicht mehr sichtbar ist. Die dem GlpF-Monomer entsprechende Bande (30 kDa) wird hingegen unter Zugabe von SDS immer ausgeprägter. Des Weiteren ist eine schwache Bande zu erkennen, die dem Dimer entspricht (~ 50 kDa). Das GlpF-Tetramer monomerisiert nach Zugabe von SDS und bildet dabei ein dimeres Intermediat aus. Diese Beobachtung wurde bereits in [167] postuliert und ist der Ausgangspunkt der folgenden Entfaltungsmessungen. Um auch detaillierte Aussagen über die Entfaltung der Tertiärstruktur von GlpF zu erhalten, wurde das mittels SDS-Titration behandelte GlpF mit verschiedenen spektroskopischen Methoden untersucht.

4.3.1 Die GlpF-Tryptophane werden bei Entfaltung in eine hydrophilere Umgebung exponiert

Das GlpF-Tetramer besitzt fünf Tryptophane je Monomer, die bei entsprechender Anregung zu unterschiedlichen Anteilen an der Gesamtfluoreszenz des Proteins beteiligt sind (siehe Abbildung 64, Anhang). Die Fluoreszenz eines Tryptophans ändert sich durch Änderung der Polarität seiner lokalen Umgebung, hervorgerufen durch die Entfaltung des Proteins (siehe Kap. 3.16.1). Dies äußert sich in einer Ab- oder Zunahme der Intensität im hydrophoberen bzw. hydrophileren Milieu und einer Verschiebung des Emissionsmaximums. Im Fall von GlpF wird unter Einfluss ansteigender SDS-Konzentrationen die Fluoreszenzintensität von GlpF verringert (Abbildung 28 A): Diese nimmt mit zunehmendem SDS-Stoffmengenanteil (χ_{SDS}) im gemessenen Bereich scheinbar linear ab (Abbildung 28 B). Durch die induzierte Entfaltung werden die Tryptophane von GlpF der wässrigen Umgebung exponiert. In der Regel lässt sich bei einer Polaritätsänderung auch eine Verschiebung des Emissionsmaximums beobachten. Eine tendenzielle Rotverschiebung des Emissionsmaximums von GlpF wird zwar ebenfalls unter Einfluss von SDS detektiert (Abbildung 28 A), die Sensitivität dieses Parameters reicht für die detaillierte Wiedergabe der Entfaltung von GlpF aber nicht aus.

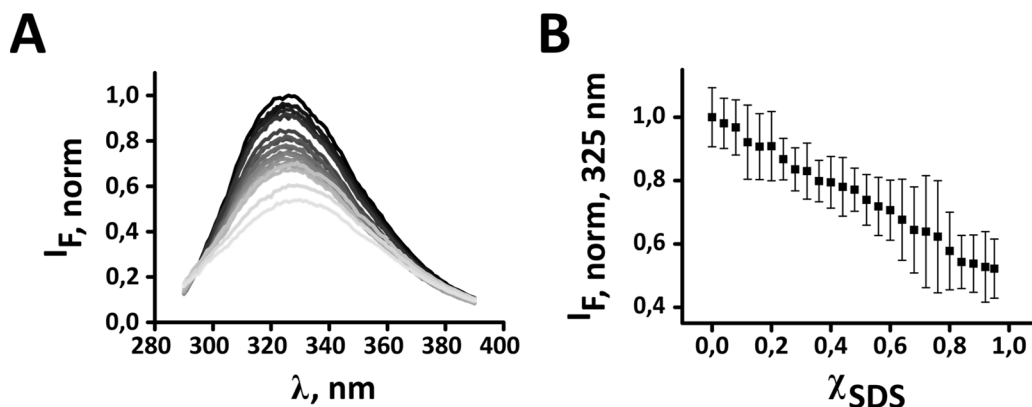


Abbildung 28: Änderung der Tryptophanfluoreszenz von GlpF nach Zugabe ansteigender χ_{SDS} . (A) Emissionsspektren von GlpF nach Zugabe ansteigender χ_{SDS} und Anregung bei 280 nm. Die Emission zeigt ein Maximum bei 325 nm, dessen Intensität unter Einfluss ansteigender χ_{SDS} stetig abnimmt (Verlauf zu helleren Grautönen). Die normierte (norm) Fluoreszenzintensität des Maximums ist beim maximal eingesetztem SDS ($\chi_{\text{SDS}} = 0,95$, hellgrau) im Vergleich zum Maximum bei $\chi_{\text{SDS}} = 0$ (schwarz) um die Hälfte reduziert. Das Emissionsmaximum erfährt eine bathochrome Verschiebung. (B) Verlauf der normierten Fluoreszenzintensität des Maximums bei 325 nm unter ansteigenden χ_{SDS} . Der Abfall der Fluoreszenzintensität unter ansteigenden χ_{SDS} verläuft scheinbar linear ($n = 3 \pm \text{SD}$).

Im Fall von GlpF ist ein scheinbar linearer Verlauf des Intensitätsabfalls zu beobachten (Abbildung 28 B). Dieses Verhalten ist der Wechselwirkung der Tryptophanseitenketten mit der Mizellenumgebung geschuldet und ist vor allem bei der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Membranproteinen hinderlich [43,127]. Änderungen der Fluoreszenzintensität,

welche durch die Entfaltung des Proteins und der damit verbundenen Konformationsänderungen entstehen, werden durch die Änderung der Fluoreszenzintensität der sich ändernden Mizellenumgebung (hervorgerufen durch die Zunahme an χ_{SDS}) überlagert. Daher spiegelt die Änderung des Emissionsmaximums nicht die Änderung der Tertiärstruktur unter Zugabe von SDS wider.

4.3.2 Die Entfaltung der Tertiärstruktur von GlpF lässt sich über die Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ verfolgen

Aus den oben genannten Gründen wurde eine weitere Eigenschaft des Spektrums zur Beobachtung der Strukturänderung von GlpF erfasst, die konformationsbezogene Änderungen des Fluoreszenzsignals sensitiver repräsentiert: Die mittlere Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ (*average emission wavelength* oder *spectral center of mass*) (siehe Kap. 3.16.1). Die Änderung dieser charakteristischen Wellenlänge eines Spektrums gibt, im Gegensatz zum Maximum des Emissionsspektrums (Abbildung 28 B), die Änderung der Symmetrie des Spektrums und die gleichmäßige Verteilung der Emissionsenergie auf die jeweiligen Wellenlängen wieder (Formel (X), siehe Kap. 3.16.1). $\langle\lambda\rangle$ bezeichnet dabei die Wellenlänge, die die Fläche unterhalb des gemessenen Spektrums in zwei gleiche Bereiche unterteilt. In Abbildung 29 A ist die mittlere Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ zweier Emissionsspektren von GlpF (ohne SDS und mit $\chi_{\text{SDS}} = 0,95$) gezeigt. Die Zugabe von SDS führt zu einer bathochromen Verschiebung von $\langle\lambda\rangle$ um 2 nm (von 333 nm bei $\chi_{\text{SDS}} = 0$ zu 335 nm bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,95$). Diese Änderung ist nicht groß, aber dennoch ausreichend, um Veränderungen der Tertiärstruktur und Quartärstruktur von GlpF zu beobachten.

Um die Entfaltung von GlpF unter Gleichgewichtsbedingungen zu untersuchen, wurde zunächst über die zeitaufgelöste Änderung von $\langle\lambda\rangle$ der Zeitpunkt bestimmt, an welchem sich nach Zugabe von SDS ein Gleichgewicht einstellt. Das Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen (Ent)faltungszuständen wird zu dem Zeitpunkt angenommen, an dem keine weitere Signaländerung über den nachfolgenden Zeitraum beobachtet werden kann. Dieser Zeitpunkt ist für den GlpF wt nach direkter Zugabe von SDS ($\chi_{\text{SDS}} = 0,6$) nach ca. 7 h erreicht (Abbildung 29 B). Im Gegensatz zum GlpF wt stellt sich bei einigen Varianten von GlpF das Gleichgewicht nach Zugabe von SDS bereits zu einem früheren bzw. späteren Zeitpunkt ein (in Abbildung 29 B exemplarisch für GlpF W48A und W48F gezeigt). Aus diesem Grund wurden Proben der Titrationsansätze von GlpF mit SDS stets über Nacht, mindestens aber 12 h inkubiert.

Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen GlpF-Varianten untereinander wurden zusätzlich zu den Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen (d.h. nach einer Inkubationszeit von mindestens 12 h) auch Messungen der mittleren Wellenlänge nach einer einstündigen Inkubation

mit SDS durchgeführt. Aus diesem Grund fanden die Messungen der Kapitel 4.3.5, 4.3.6 und 4.3.7 bereits nach einstündiger Inkubation mit SDS statt. Die Verläufe von $\langle \lambda \rangle$ innerhalb der unterschiedlichen Varianten sind zu diesem Zeitpunkt besser voneinander zu unterscheiden. An diesem Zeitpunkt können unterschiedliche Verläufe von $\langle \lambda \rangle$ innerhalb der verschiedenen GlpF-Varianten erfasst werden.

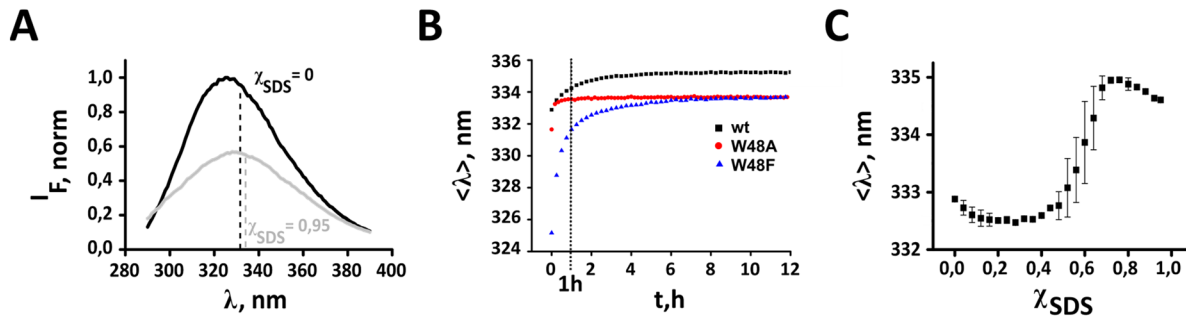


Abbildung 29: Untersuchung der Entfaltung von GlpF über Änderungen der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$.

(A) Emissionsspektren von GlpF nach Anregung bei 280 nm ohne Zugabe von SDS (schwarz) und nach Inkubation mit $\chi_{\text{SDS}} = 0,95$ (grau). Die mittlere Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ des entsprechenden Spektrums ist anhand der gestrichelten Linie angezeigt. Es findet eine bathochrome Verschiebung von $\langle \lambda \rangle_{\chi_{\text{SDS}}=0} = 333 \text{ nm}$ nach $\langle \lambda \rangle_{\chi_{\text{SDS}}=0,95} = 335 \text{ nm}$ statt. (B) Repräsentativer Verlauf der zeitlichen Änderung von $\langle \lambda \rangle$ nach Interaktion mit SDS (0,6 χ_{SDS}) mit dem GlpF wt sowie mit den GlpF Varianten W48A und W48F. Die Höhe und der Zeitpunkt des Erreichens des Plateaus unterscheiden sich zwischen den Graphen der GlpF-Varianten und dem Graphen des GlpF wt. Das Signal des GlpF wt erreicht nach ca. 7 h ein Plateau, wohingegen das Signal der beiden GlpF-Varianten dieses früher (W48A) bzw. später (W48F) erreicht. Die gestrichelte Linie zeigt die Position von $\langle \lambda \rangle$ der entsprechenden Varianten nach einstündiger Inkubation mit SDS an. Dieser Zeitpunkt wurde als Vergleichswert bei der Untersuchung unterschiedlicher GlpF-Varianten verwendet. (C) Verlauf der mittleren Wellenlänge des GlpF-Wildtyps nach einstündiger Inkubation mit ansteigenden χ_{SDS} . Der Graph zeigt einen sigmoidalen Verlauf mit einem ermittelten c_m bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,55$ (ermittelt aus Fitfunktion (XIV), siehe Anhang) ($n = 3 \pm \text{SD}$).

In Abbildung 29 C ist $\langle \lambda \rangle$ gegen den ansteigenden SDS-Molenbruch χ_{SDS} aufgetragen. Dieser Graph zeigt einen sigmoidalen Verlauf und eine Verschiebung von $\langle \lambda \rangle$ zu längeren Wellenlängen. Bis $\chi_{\text{SDS}} = 0,4$ verändert sich $\langle \lambda \rangle$ nur minimal und zeigt einen leichten Abfall bei $\chi_{\text{SDS}} = 0 - 0,28$. Der ansteigende Verlauf ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,44$ besitzt einen Wendepunkt c_m bei $0,55 \chi_{\text{SDS}}$. Dieser Punkt bezeichnet nach dem Zweizustandsmodell den SDS-Molenbruch, an dem GlpF zu gleichen Teilen im nativen und entfalteten Zustand vorliegen kann (siehe Kap. 1.3.1). Da GlpF ein relativ großes, oligomeres Protein ist, muss diese Eigenschaft für GlpF nicht unbedingt gelten. Dennoch stellt der c_m -Wert einen charakteristischen Parameter der Entfaltungskurve dar, der zum Vergleich der Entfaltung anderer GlpF-Varianten herangezogen werden kann. Die markante Verschiebung von $\langle \lambda \rangle$ zu höheren Wellenlängen spricht für die Entfaltung der Tertiärstruktur von GlpF in eine hydrophilere Umgebung. Ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,7$ findet ein linearer Abfall der mittleren Wellenlänge mit geringer Steigung statt. Sowohl der Abfall im Bereich $0-0,28 \chi_{\text{SDS}}$, als auch der Abfall ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,7$

konnten stets bei allen Messungen des GlpF-Wildtyps, als auch bei den erstellten Varianten beobachtet werden. Diese beiden Verläufe wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht eingehender untersucht.

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen sprechen für eine Entfaltung des Proteins und die damit verbundene Exposition seiner Tryptophane in ein hydrophileres Milieu. Die folgenden Experimente dienen der Aufklärung der strukturellen Ursache dieses Verlaufs.

4.3.3 Bereits geringe χ_{SDS} haben einen destabilisierenden Effekt auf den Faltungszustand des GlpF -Tetramers

Die Änderung der Tertiärstruktur von GlpF nach Zugabe von SDS wurde im vorigen Kapitel über die Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ verfolgt. In diesem Kapitel wurden die Änderungen der Sekundärstruktur von GlpF nach Zugabe von SDS mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die Messung von GlpF im Fern-UV-Bereich mittels CD-Spektroskopie ergibt ein Spektrum, welches zwei für α -helikale Proteine charakteristische Minima bei 209 nm und 222 nm aufweist (siehe Kap. 3.16.2). Zur Beobachtung dieser Ereignisse wurde die molare Elliptizität des Signals bei 209 nm gegen χ_{SDS} aufgetragen (Abbildung 30 A). Ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,48$ steigt die molare Elliptizität der untersuchten Probe an, d.h. die Intensität des Minimums bei 209 nm verringert sich und der Anteil an α -helikalen Strukturen im Protein nimmt ab. Der Unterschied des Signals zwischen $\chi_{\text{SDS}} = 0,48$ und $\chi_{\text{SDS}} = 0,95$ (maximaler χ_{SDS}) ist zwar signifikant ($\sigma > 0,05$), aber gering, was allgemein auf die hohe Stabilität der α -helikalen Struktur in membran(ähnlicher) Umgebung, aber auch auf die stabilisierende Eigenschaft von SDS als Detergenz gegenüber Membranproteinen zurückzuführen ist. Dieser Anstieg geht mit dem Anstieg von $\langle\lambda\rangle$ und somit mit der Entfaltung der Tertiärstruktur von GlpF einher (siehe Abbildung 29 C). Allerdings erreicht der Anstieg der molaren Elliptizität im Gegensatz zu $\langle\lambda\rangle$ kein Plateau. Bei $\chi_{\text{SDS}} < 0,44$ lassen sich keine markanten Signaländerungen beobachten (Abbildung 30 A).

In Abbildung 29 C lässt sich ab einem χ_{SDS} von 0,44 (bei einigen Varianten bereits von $\chi_{\text{SDS}} = 0,35$) eine Änderung der Tertiärstruktur von GlpF fluoreszenzspektroskopisch verfolgen. Ob auch geringere χ_{SDS} bereits einen Einfluss auf die Struktur von GlpF haben, lässt sich mit o.g. Methoden allerdings nicht feststellen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Änderung der Sekundärstruktur von GlpF unter destabilisierenden Bedingungen mittels CD-Spektroskopie untersucht. Eine Denaturierung der α -helikalen Struktur lässt sich durch eine Abnahme des Signals des Minimums bei 209 nm verfolgen. Mit SDS versetztes GlpF ($\chi_{\text{SDS}} < 0,48$) wurde einer zusätzlichen Destabilisierung mittels thermischer Denaturierung ausgesetzt. Unter dem Einfluss ansteigender Temperaturen werden nicht-kovalente Bindungen auch innerhalb der geordneten

Sekundärstruktur des Proteins aufgebrochen und das Protein wird denaturiert [200]. Dies resultiert in einer Abnahme des Minimums bei 209 nm, wobei der Verlauf dieser Abnahme einer sigmoidalen Kurve entspricht (Abbildung 30 B). Es wurde überprüft, ob die Zugabe geringer χ_{SDS} einen Einfluss auf die thermische Stabilität des Proteins hat. In Abbildung 30 C ist die Abnahme des CD-Signals bei 209 nm nach Erhöhung der Temperatur für verschiedene $\chi_{\text{SDS}} < 0,5$ dargestellt. Bei zunehmenden χ_{SDS} verschiebt sich die Kurve der thermischen Denaturierung in Richtung geringerer Temperaturen (Abbildung 30 C). Demnach findet die thermische Denaturierung von GlpF durch den Einfluss von SDS bereits bei geringeren Temperaturen statt. Das GlpF-Tetramer wird bereits nach Zugabe kleinerer χ_{SDS} destabilisiert. Diese Destabilisierung nimmt mit ansteigenden χ_{SDS} zu.

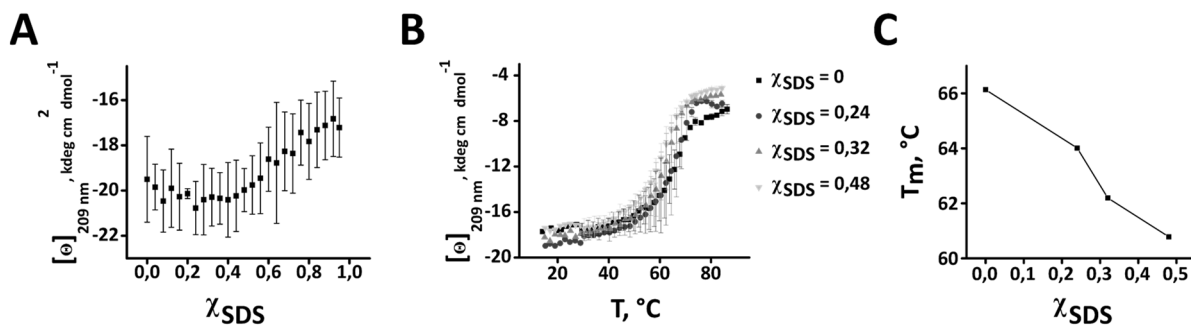


Abbildung 30: Einfluss von SDS auf die Sekundärstruktur von GlpF.

(A) Molare Elliptizität von GlpF bei 209 nm unter zunehmenden χ_{SDS} . Ab $\chi_{\text{SDS}} > 0,4$ findet ein leichter Anstieg des Signals statt ($n = 3 \pm \text{SD}$). (B) Änderung der molaren Elliptizität (209 nm) bei thermischer Denaturierung von GlpF versetzt mit unterschiedlichen $\chi_{\text{SDS}} < 0,5$. Bei ansteigenden χ_{SDS} verschiebt sich die sigmoidale Denaturierungskurve zu niedrigeren Temperaturen ($n = 3 \pm \text{SD}$). (C) Temperatur (T_m) des Wendepunktes der Denaturierungskurven aus (B). Schon im Bereich von geringen χ_{SDS} nimmt die Temperatur des Wendepunktes mit Zunahme der χ_{SDS} linear ab. Die Temperatur des Wendepunktes wurde über einen Boltzmann-Fit ((XV), Anhang) ermittelt.

Bereits geringe χ_{SDS} haben folglich einen destabilisierenden Effekt auf die Sekundärstruktur des GlpF-Tetramers, der bei zusätzlicher thermischer Denaturierung beobachtet werden kann.

4.3.4 Tertiär- und Quartärstruktur von GlpF entfalten bei unterschiedlichen χ_{SDS}

Die Entfaltung der Tertiärstruktur von GlpF wurde über die Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz bestimmt und soll in diesem Kapitel mit dem Verlauf der Dissoziation des GlpF-Tetramers nach Zugabe von SDS verglichen werden. Die Dissoziation des Tetramers von GlpF wurde bereits in Kap. 4.1 mit Hilfe der seminativen SDS-PAGE untersucht. Die Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ und die Änderung der Tetramerbandenintensität werden sowohl unter Gleichgewichtsbedingungen (Abbildung 31 A), als auch nach einstündiger Inkubation (Abbildung 31 B) der Proben mit ansteigenden χ_{SDS} verglichen.

In Abbildung 31 A ist zu erkennen, dass sich die mittlere Wellenlänge ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,36$ verschiebt und bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,6$ ihren Maximalwert erreicht. Die Abnahme der Bandenintensität hingegen findet erst bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,5$ statt. Ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,69$ ist die Bande, die dem Tetramer entspricht, im SDS-Gel nicht mehr nachweisbar. Der Anstieg von $\langle\lambda\rangle$ findet bei niedrigeren χ_{SDS} statt als die Dissoziation des GlpF-Tetramers; eine Änderung der lokalen Tryptophanumgebung geschieht daher bereits im GlpF-Tetramer. Schon nach einstündiger Inkubation der Proben mit SDS lässt sich ein ähnliches Verhältnis zwischen der Änderung der Tertiärstruktur und der Monomerisierung des GlpF-Tetramers beobachten (Abbildung 31 B). Da die Entfaltung zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen ist, sind die Graphen der Messung nach einer Stunde im Vergleich zu dem unter Gleichgewichtsbedingungen erstellten Graphen zu höheren χ_{SDS} verschoben. Die Graphen beider Diagramme (Abbildung 31 A und Abbildung 31 B) besitzen einen Schnittpunkt, der im Bereich der maximalen mittleren Wellenlänge liegt und den anfänglichen Abfall der Tetramerbandenintensität kennzeichnet. Dieser Schnittpunkt kennzeichnet den SDS-Molenbruch (χ_{SDS}) an dem ein tetrameres GlpF-Intermediat akkumuliert, welches eine voraussichtlich partiell entfaltete Tertiärstruktur besitzt.

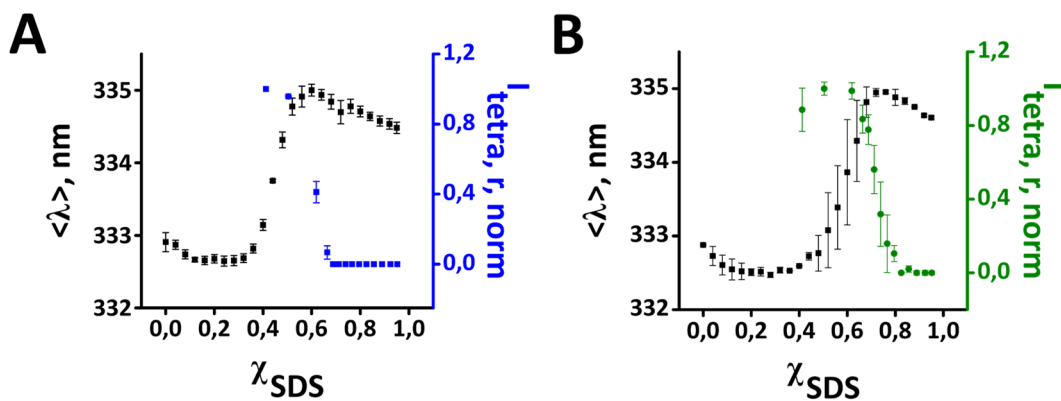


Abbildung 31: Messung der Änderung der Tertiär- und Quartärstruktur von GlpF wt zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

(A) Verlauf der Änderung von $\langle\lambda\rangle$ (schwarz) und der relativen, normierten Bandenintensität des GlpF-Tetramers (blau) nach Zugabe ansteigender χ_{SDS} und zwölfstündiger Inkubation (Gleichgewichtsbedingungen). Der Anstieg von $\langle\lambda\rangle$ (Tertiärstruktur) erfolgt bei niedrigeren χ_{SDS} als die Abnahme der Bandenintensität des GlpF-Tetramers (Quartärstruktur). Der Schnittpunkt beider Graphen liegt bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,51$ ($n = 3 \pm \text{SD}$). (B) Verlauf der Änderung von $\langle\lambda\rangle$ (schwarz) und der relativen, normierten Bandenintensität des GlpF-Tetramers (grün) nach Zugabe ansteigender χ_{SDS} und einstündiger Inkubation. Das Verhältnis beider Graphen zueinander ist dem in (A) ähnlich: Der Anstieg von $\langle\lambda\rangle$ verläuft bei niedrigeren χ_{SDS} als die Abnahme der Bandenintensität des GlpF-Tetramers. Der Verlauf und somit der Schnittpunkt ($\chi_{\text{SDS}} = 0,67$) beider Graphen ist aufgrund der verkürzten Inkubationszeit im Vergleich zu (A) zu höheren χ_{SDS} verschoben ($n = 3 \pm \text{SD}$).

Bereits im Tetramer findet nach Zugabe von SDS eine Entfaltung von GlpF statt. Dies führt zu einer strukturellen Änderung von GlpF, aufgrund derer die lokale Tryptophanumgebung polarer wird und auf eine partielle Entfaltung der Tertiärstruktur im GlpF-Tetramer hindeutet.

4.3.5 Die Veränderung von $\langle\lambda\rangle$ setzt nicht die Existenz eines GlpF-Tetramers voraus

Die Verschiebung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ geschieht aufgrund der Entfaltung eines oder mehrerer Tryptophane von GlpF in eine hydrophile Umgebung. Diese Entfaltung findet im GlpF-Tetramer statt, welches erst unter Einfluss höherer SDS-Konzentrationen dissoziiert (siehe Kap. 4.3.8.1). Der im Folgenden beschriebene Versuch sollte klären, ob die Änderung von $\langle\lambda\rangle$ an das GlpF-Tetramer geknüpft ist oder ob dieser Vorgang gesondert im GlpF-Monomer stattfindet. Sollte die Entfaltung von GlpF ein Tetramer voraussetzen, so könnte die Änderung von $\langle\lambda\rangle$ auf potenzielle Wechselwirkungen mit den benachbarten Monomeren zurückgeführt werden.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden zwei bereits vorgestellte Varianten von GlpF analysiert: GlpF W48A und GlpF W48F (siehe Kap. 4.1.3.1). GlpF W48A liegt im Acrylamidgel als Monomer vor, wohingegen bei GlpF W48F die Banden des Tetramers sowie des Monomers dominieren (Abbildung 22 A). Wie bereits in Kap. 4.1.3.1 gezeigt, weist GlpF W48F in der SDS-PAGE-Analyse der SDS-Titration eine dem GlpF-Wildtyp ähnliche Tetramerstabilität auf (Abbildung 22 B). W48A hingegen zeigt keine Änderung in der Bandenverteilung unter Einfluss steigender χ_{SDS} (Abbildung 57, Anhang). GlpF W48A liegt im Acrylamidgel als Monomer vor. Die Titrationsansätze beider Varianten wurden fluoreszenzspektroskopisch untersucht und der Verlauf von $\langle\lambda\rangle$ beider Varianten betrachtet (Abbildung 32).

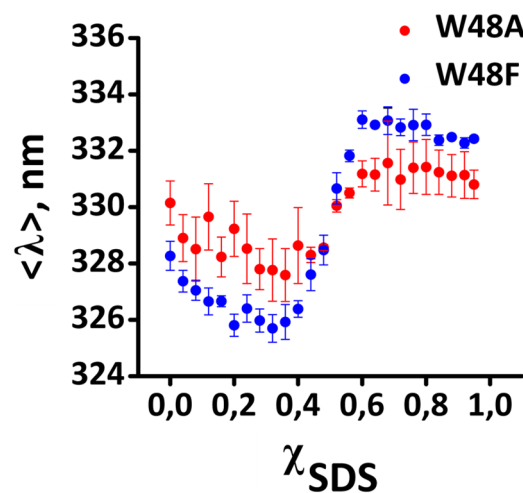


Abbildung 32: Verlauf von $\langle\lambda\rangle$ der Variante GlpF W48A und GlpF W48F bei ansteigenden χ_{SDS} . Die GlpF-Proben wurden für eine Stunde mit ansteigenden χ_{SDS} inkubiert. Sowohl die monomere Variante GlpF W48A als auch die Variante GlpF W48F zeigen eine Verschiebung von $\langle\lambda\rangle$ zu höheren Wellenlängen. Die Variante GlpF W48F erscheint im seminativen Acrylamidgel als Tetra- und Monomer. Auch bei GlpF W48A findet eine zum tetrameren GlpF W48F ähnliche Entfaltung in Form der Verschiebung von $\langle\lambda\rangle$ statt. Die strukturelle Veränderung, die eine Verschiebung von $\langle\lambda\rangle$ bewirkt, bedarf nicht der Existenz des GlpF-Tetramers ($n = 3 \pm \text{SD}$).

Sowohl das tetramere GlpF W48F, als auch das primär monomere GlpF W48A zeigen eine Verschiebung von $\langle\lambda\rangle$ unter Zugabe von SDS. Darüber hinaus ist der c_m -Wert, welcher als Vergleichswert für die Stabilität der GlpF-Varianten verwendet werden kann, für beide Varianten nahezu identisch ($c_{mW48F} = 0,49 \chi_{SDS}$; $c_{mW48A} = 0,51 \chi_{SDS}$). Dieses Resultat bestätigt die separate Entfaltung in eine hydrophilere Umgebung unabhängig von der Existenz des Tetramers. Die Entfaltung, die zu der bathochromen Verschiebung von $\langle\lambda\rangle$ führt, findet im GlpF-Monomer statt. Die Existenz eines GlpF-Tetramers ist demnach keine Voraussetzung für die Entfaltung in ein hydrophileres Milieu.

4.3.6 Die Änderung von $\langle\lambda\rangle$ beruht auf einer Änderung der Trp 219-Umgebung

4.3.6.1 GlpF W219A zeigt bei ansteigenden χ_{SDS} keine Änderung von $\langle\lambda\rangle$ auf

Aufgrund der verschiedenen Positionen der fünf Tryptophane im GlpF-Monomer tragen sie zu unterschiedlichen Anteilen zur Gesamtfluoreszenz von GlpF (Abbildung 64, Anhang) und zum Verlauf des Emissionsspektrums bei. Des Weiteren werden die Tryptophane unter Einfluss des in ansteigenden Mengen zugefügten SDS je nach Position unterschiedlichen Umgebungsänderungen ausgesetzt. So können Tryptophane durch die Änderung ihrer Fluoreszenz als „Sensoren“ zur Lokalisierung struktureller Änderungen im Protein dienen (siehe Kap. 3.16.1). Welche Tryptophane für die Änderung der mittleren Wellenlänge des GlpF-Wildtyps verantwortlich sind und welcher Bereich von GlpF unter ansteigenden χ_{SDS} entfaltet wird, wurde im Folgenden untersucht.

In Abbildung 33 sind die mittleren Wellenlängen aller Tryptophanvarianten (W \rightarrow A) von GlpF gegen χ_{SDS} aufgetragen (Abbildung mit Fehlerbalken siehe Abbildung 58, Anhang). Diese Varianten weisen unterschiedliche Ausgangs- und Endwerte für χ_{SDS} und dementsprechend verschiedene Wellenlängendifferenzen $\Delta\langle\lambda\rangle$ auf, die auf die unterschiedlichen Positionen der Tryptophane im Protein zurückzuführen sind. Da die Unabhängigkeit des Anstiegs vom tetrameren Zustand des Proteins gezeigt wurde (Kap. 4.3.5), ist die Tetramerstabilität dieser Varianten nicht von primärer Relevanz. Vier der fünf Varianten (W42A, W48A, W76A, W215A) weisen in unterschiedlicher Ausprägung eine bathochrome Verschiebung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ auf. Die einzige Ausnahme stellt GlpF W219A dar: Diese Variante zeigt einen linearen Abfall der mittleren Wellenlänge bei zunehmenden χ_{SDS} (Abbildung 33, rot).

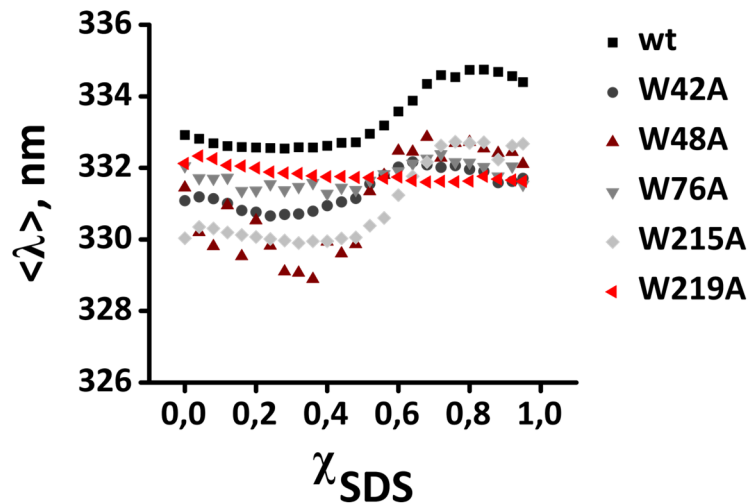


Abbildung 33: Änderung der mittleren Wellenlänge unter Einfluss ansteigender χ_{SDS} aller GlpF-Varianten, deren Tryptophan zu Alanin mutiert wurde.

Die GlpF-Proben wurden nach einstündiger Inkubation mit SDS gemessen. Die Fehlerbalken sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. In jeder GlpF-Variante wurde jeweils eines der fünf Tryptophane von GlpF gegen Alanin mutiert. Vier der fünf untersuchten Varianten sowie der GlpF wt weisen eine Rotverschiebung der mittleren Wellenlänge bei ansteigenden χ_{SDS} auf. Ausschließlich GlpF W219A fehlt die typische Rotverschiebung. $\langle \lambda \rangle_{\text{W219A}}$ zeigt unter ansteigenden χ_{SDS} einen linearen, abfallenden Verlauf ($n = 3 \pm \text{SD}$).

GlpF W219A stellt eine instabile Variante von GlpF dar, was sich in einer stark verringerten Aktivität und einem geringen Expressionsniveau, aber auch in der fehlenden Stabilität des GlpF-Tetramers äußert (siehe Kap. 4.1.3.2). Aus diesem Grund kann die fehlende Rotverschiebung der mittleren Wellenlänge von GlpF W219A auf den destabilisierten Zustand dieser Variante zurückgeführt werden. Diese Hypothese wurde im nächsten Kapitel untersucht.

4.3.6.2 Die Änderung von $\langle \lambda \rangle$ beruht auf Änderungen der Fluoreszenz von Trp 219

Zur Überprüfung der Annahme, dass der fehlende Anstieg der mittleren Wellenlänge bei Titration von GlpF W219A auf dessen destabilisierte Struktur zurückzuführen ist, wurde GlpF W219F als „stabiler“ Alternative zu W219A für die nachfolgenden Versuche verwendet. GlpF W219F weist im Vergleich zu GlpF W219A eine höhere (Tetramer)stabilität sowie eine wildtypische Aktivität und ein zum Wildtyp identisches Expressionsniveau auf (siehe Kap. 4.1.3.2 und Abbildung 55, Anhang). Die Änderung der mittleren Wellenlänge von GlpF W219F wurde nach einstündiger Inkubation mit ansteigenden χ_{SDS} aufgenommen (Abbildung 34 B). Der Verlauf von $\langle \lambda \rangle$ weicht für GlpF W219F von dem linearen Abfall, der bei W219A beobachtet werden kann, ab. Bis $\chi_{\text{SDS}} = 0,5$ ist der Verlauf von GlpF W219F mit dem des Wildtyps identisch. Der Anstieg von $\langle \lambda \rangle$ ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,48$ bleibt im Fall von GlpF W219F jedoch aus. GlpF W219F weist, ebenso wie GlpF W219A, keine markante Verschiebung der mittleren Wellenlänge bei ansteigenden χ_{SDS} auf. Daher ist das Fehlen der Verschiebung von $\langle \lambda \rangle$ auf das Fehlen von Trp 219 in beiden GlpF-Varianten (W219A und

W219F), und nicht auf einen destabilisierten Zustand des Proteins, zurückzuführen. Trp 219 ist in einem Loop (Loop E) auf der periplasmatischen Seite von GlpF lokalisiert (Abbildung 34 A).

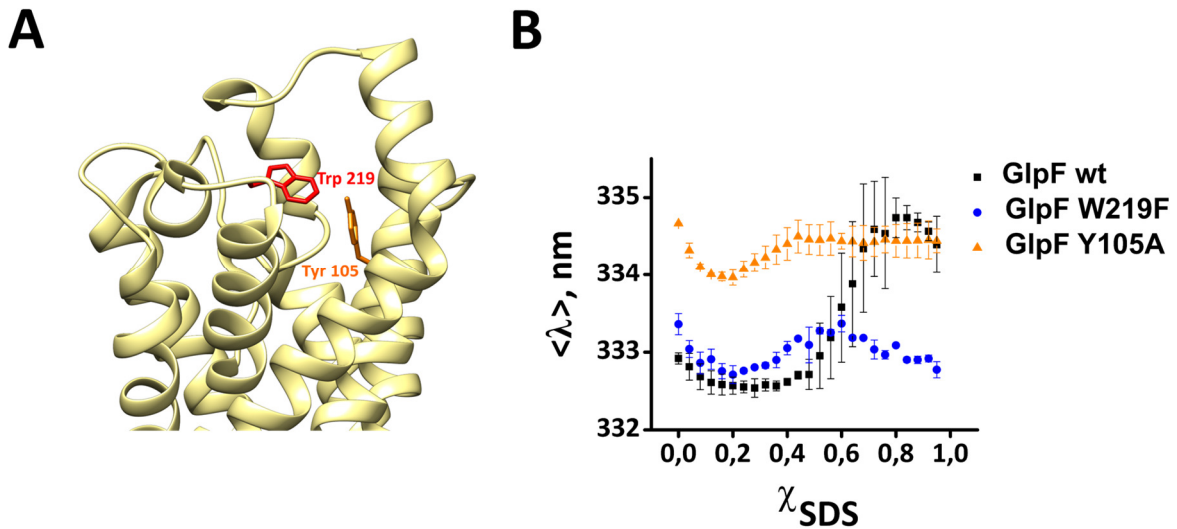


Abbildung 34: Untersuchung der Entfaltung um Trp 219.

(A) Ausschnitt der Struktur der Trp 219-Umgebung im GlpF-Monomer (PDB-ID: 1FX8). Trp 219 (rot) ist Teil einer periplasmatischen Loopregion (Loop E) und ragt mit seinem Indolsubstituenten in das Innere des Proteins. Tyr 105 (orange), ein potenzieller Interaktionspartner, liegt in räumlicher Nähe zu Trp 219. (B) Mittlere Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ vom GlpF wt, W219F und Y105A aufgetragen gegen χ_{SDS} . Sowohl GlpF W219F als auch Y105A fehlt die charakteristische Rotverschiebung von $\langle \lambda \rangle$. Die Änderung der mittleren Wellenlänge der destabilisierten Variante GlpF Y105A verläuft auf demselben Niveau des partiell entfaltenen GlpF-Wildtyps. Der Graph der Messung von GlpF W219F, dem das Trp 219 als „Sensor“ fehlt, verläuft auf dem Niveau des Signals des GlpF-Wildtyps bei niedrigen χ_{SDS} ($n = 3 \pm SD$).

Eine Änderung der Fluoreszenz von Trp 219 ist für den charakteristischen Anstieg von $\langle \lambda \rangle$ verantwortlich, der bei der Messung des GlpF-Wildtyps und der übrigen GlpF-Tryptophanvarianten (siehe Abbildung 33 C) beobachtet werden kann.

4.3.6.3 Die partielle Entfaltung der Trp 219-Umgebung bedingt die Änderung von $\langle \lambda \rangle$

Trp 219 wurde bereits in Kap. 4.1.3.2 und Kap. 4.2 eingehend untersucht und als Zentrum eines aromatischen Clusters in GlpF identifiziert. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde überprüft, inwieweit die Änderung der Fluoreszenz von Trp 219 bei ansteigenden χ_{SDS} auf die Entfaltung seiner unmittelbaren Umgebung im aromatischen Cluster zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurde auch die Entfaltung der in Kap. 4.2.2 beschriebenen GlpF-Variante Y105A genauer untersucht. Laut der Resultate aus Kap. 4.2.2 ist Tyr 105 an der Stabilisierung des GlpF-Tetramers beteiligt. GlpF Y105A weist eine ähnliche Aktivität und Stabilität wie das stark destabilisierte W219A auf (Kap. 4.2.2), weshalb auf eine potenzielle Wechselwirkung von Tyr 105 mit Trp 219 geschlossen werden kann. GlpF Y105A stellt somit eine destabilisierte Variante von GlpF dar, die allerdings im Besitz aller fünf Tryptophane ist und deren Destabilisierung sehr wahrscheinlich auf

eine strukturelle Änderung in der Nähe von Trp 219 zurückzuführen ist. GlpF Y105A dient folglich in diesem Versuch als „Positivkontrolle“ mit einer natürlich (ohne Zugabe von SDS) entfalteten Trp 219-Umgebung. Die Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ von GlpF Y105A wurde mit der Änderung von $\langle\lambda\rangle$ von GlpF W219F verglichen.

GlpF Y015A wurde mit ansteigenden χ_{SDS} für eine Stunde inkubiert und die Änderung von $\langle\lambda\rangle$ verfolgt. Abbildung 34 B zeigt den Verlauf von $\langle\lambda\rangle$ für GlpF Y105A, GlpF W219F und für das wildtypische GlpF. Der Verlauf der mittleren Wellenlänge für GlpF Y105A ist dem Verlauf von GlpF W219F sehr ähnlich: In beiden Varianten kann ein charakteristischer initialer Abfall der mittleren Wellenlänge bei niedrigen χ_{SDS} beobachtet werden, der auch bei der Messung des GlpF-Wildtyps vorkommt (Abbildung 34 B). Dieser Verlauf kann die Folge einer weiteren strukturellen Änderung sein, die schon nach Zugabe niedriger χ_{SDS} stattfindet und im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht worden ist. Auffällig ist das Fehlen des charakteristischen Anstiegs von $\langle\lambda\rangle$ sowohl bei der Variante GlpF W219F, als auch bei GlpF Y105A. Obwohl sich die Stabilität von GlpF Y105A maßgeblich von der Stabilität von W219F unterscheidet, weisen beide Varianten keine markante Verschiebung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ auf.

Im Fall von GlpF Y105A kann der fehlende Anstieg auf die destabilisierte Struktur des Proteins zurückgeführt werden. Diese Annahme wird durch den Verlauf des Graphen von GlpF Y105A bestätigt (Abbildung 34 B, orange). Besonders ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,4$ befindet sich die mittlere Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ von GlpF Y105A auf dem Wert von $\langle\lambda\rangle$ des entfalteten GlpF-Wildtyps bei höheren χ_{SDS} . Dies deutet auf einen potenziell ähnlich entfalteten Zustand von GlpF Y105A und dem GlpF-Wildtyp hin. Der Verlauf von $\langle\lambda\rangle$ in der instabilen GlpF-Variante Y105A zeigt das Fehlen der strukturellen Änderung, die normalerweise im GlpF wt unter Einfluss von SDS stattfindet. Der Verlauf von GlpF W219F bewegt sich im Bereich der mittleren Wellenlänge des GlpF-Wildtyps bei niedrigen χ_{SDS} . Trp 219 fehlt in dieser Variante, weswegen keine Verschiebung von $\langle\lambda\rangle$ stattfindet, da die strukturelle Änderung durch das Fehlen von Trp 219 dessen Fluoreszenz nicht beeinflussen kann.

Der Anstieg der mittleren Wellenlänge nach Zugabe von SDS ist auf eine partielle Entfaltung der Tertiärstruktur in der Umgebung von Trp 219 zurückzuführen, die als Folge Trp 219 aus einem hydrophoberen Milieu in eine hydrophilere Umgebung versetzt. Der partiell entfaltete Zustand der Tertiärstruktur des GlpF wt bei hohen χ_{SDS} ist mit dem entfalteten Zustand der destabilisierten Variante GlpF Y105A vergleichbar.

4.3.7 Das Zentrum des GlpF-Tetramers und seine peripheren Bereiche weisen unterschiedliche Stabilitäten auf

Der Verlauf der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ sieht für alle untersuchten Tryptophanvarianten von GlpF unterschiedlich aus (siehe Abbildung 33). Aus den unterschiedlichen Ausgangs- und Endpunkten lassen sich nur schwer Informationen über mögliche strukturelle Änderungen in GlpF ermitteln, da hierbei stets nur ein Tryptophan entfernt wurde und eine Kombination der übrigen vier Tryptophane Einfluss auf die resultierende mittlere Wellenlänge des Proteins nimmt. Allerdings wurde im vorigen Kapitel die Änderung der Umgebung um Trp 219 und seine entsprechende Sensitivität gegenüber dieser Änderung als primäre Ursache für den Anstieg von $\langle\lambda\rangle$ ausfindig gemacht. Da alle Tryptophanvarianten von GlpF – mit der Ausnahme von GlpF W219A und W219F – diese Änderung zeigen, lässt sich der Verlauf des Anstiegs von $\langle\lambda\rangle$ in diesen Varianten vergleichen. Zu diesem Zweck wurde der Verlauf der mittleren Wellenlängen $\langle\lambda\rangle$ aller Tryptophanvarianten sowie des Wildtyps normiert und in Abbildung 35 B gegen χ_{SDS} aufgetragen (Darstellung mit Fehlerbalken siehe Abbildung 59, Anhang) und miteinander verglichen. Über einen angepassten Boltzmann-Fit wurden die c_m -Werte der Graphen ermittelt (Abbildung 61 und Tabelle 26, Anhang).

Die Wendepunkte c_m von $\langle\lambda\rangle$ verlaufen bei den jeweiligen Tryptophanvarianten bei unterschiedlichen χ_{SDS} . Im Allgemeinen lässt sich der Verlauf der verschiedenen Tryptophanvarianten je nach Steigung des Anstiegs von $\langle\lambda\rangle$ in zwei Gruppen einordnen: Der Verlauf von Gruppe 1 (pink) hat einen durchschnittlichen c_m -Wert von $\chi_{\text{SDS}} \sim 0,5$. Hierzu gehören die Varianten GlpF W42A und W48A. Auch die in Kap. 4.3.5 untersuchte GlpF-Variante W48F wird dieser Gruppe zugeordnet. Gruppe 2 (blau) weist einen durchschnittlichen c_m -Wert von $\chi_{\text{SDS}} \sim 0,57$ auf. Hierzu gehört der GlpF wt sowie die Varianten GlpF W76A und W215A. Diese zwei Gruppen lassen sich innerhalb der Struktur des GlpF-Tetramers trennen (Abbildung 35 A). In den Varianten der Gruppe 1 fehlen die Tryptophane, die sich im Zentrum des GlpF-Tetramers befinden. Obwohl GlpF W48A kein Tetramer ausbildet, fällt auch diese Variante eindeutig in Gruppe 1. Gruppe 2 beinhaltet die Varianten, deren fehlende Tryptophane in der Peripherie des Tetramers lokalisiert sind. Auch der GlpF-Wildtyp gehört zu Gruppe 2.

Die GlpF-Varianten der Gruppe 1 entfalten bei niedrigeren χ_{SDS} als der GlpF-Wildtyp. Diese Verläufe entsprechen der Änderung von $\langle\lambda\rangle$ für die Tryptophane der Tetramerperipherie, da die Tryptophane des GlpF-Zentrums in diesen Varianten fehlen. Die Tryptophane der Tetramerperipherie weisen repräsentativ die strukturelle Änderung der Bereiche nach, in denen sie lokalisiert sind. Folglich entfalten die Bereiche der Tetramerperipherie bei geringeren χ_{SDS} als

die anderen untersuchten Bereiche (Gruppe 2). Die Bereiche der Tetramerperipherie entfalten auch dann bereits bei niedrigen χ_{SDS} , wenn das Protein als Monomer vorliegt (siehe GlpF W48A).

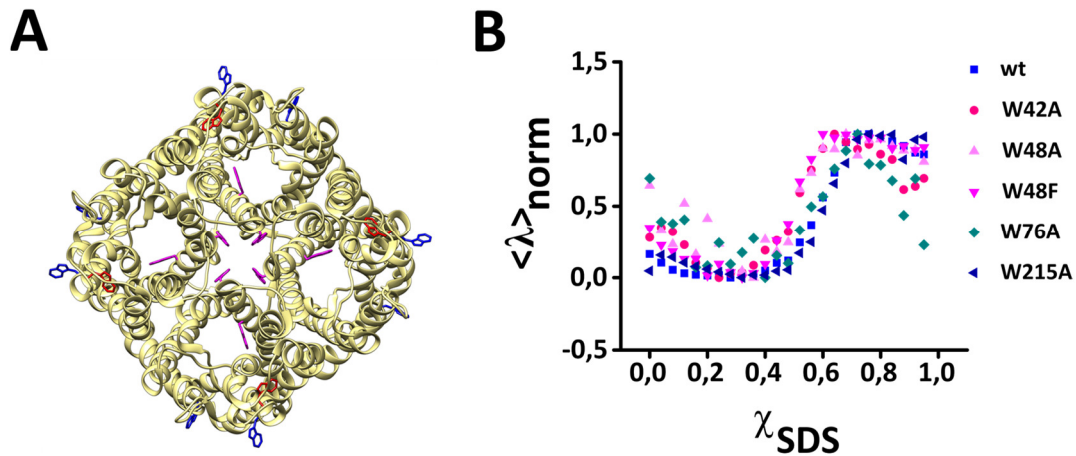


Abbildung 35: Untersuchung der Stabilität verschiedener Bereiche des GlpF-Tetramers.

(A) Struktur des GlpF-Tetramers (PDB-ID:1FX8) mit farblicher Einteilung der Tryptophane nach Position im Tetramer und nach Verlauf ihrer mittleren Wellenlänge in (B). Die Tryptophane im Tetramerkern sind in Pink, die Tryptophane der Tetramerperipherie in Blau dargestellt. Trp 219 ist in Rot gezeigt und wurde nicht in die Klassifizierung einbezogen. (B) Normierte Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ verschiedener GlpF-Varianten sowie des GlpF-Wildtyps bei ansteigenden χ_{SDS} . Die Fehlerbalken sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt (siehe Abbildung 59, Anhang). Der Verlauf der hier gezeigten Graphen lässt sich anhand des c_m -Wertes des Anstiegs von $\langle \lambda \rangle$ in zwei Gruppen einordnen. Die Verläufe des Signals der mutierten Tryptophanen des Tetramerkerns sind in pinken Farbtönen dargestellt. Diese Verläufe entsprechen der Änderung von $\langle \lambda \rangle$ der Tryptophane der Tetramerperipherie. Die Verläufe des Signals der Varianten der Tetramerperipherie sowie des GlpF-Wildtyps sind in blauen Farbtönen dargestellt. Diese Verläufe beschreiben die Änderung von $\langle \lambda \rangle$ der Tryptophane des Tetramerkerns. Die Peripherie des GlpF-Tetramers entfaltet unter niedrigeren χ_{SDS} als der Tetramerkern. Die Stabilität des GlpF-Wildtyps wird überwiegend von der Stabilität des Tetramerkerns bestimmt ($n = 3 \pm SD$).

Das Signal der Gruppe 2 entspricht der Entfaltung der Bereiche, die im Zentrum des GlpF-Tetramers lokalisiert sind, da in den Varianten der Gruppe 2 die Tryptophane der peripheren Regionen von GlpF fehlen. Das Zentrum des GlpF-Tetramers entfaltet auch bei höheren χ_{SDS} als die peripheren Bereiche. Da der Wildtyp auch der Gruppe 2 zugeordnet wird, dominiert die Stabilität des Tetramerkerns die Gesamtstabilität des GlpF-Wildtyps.

Die peripheren Bereiche des GlpF-Tetramers weisen folglich in gemischten Mizellen eine geringere Stabilität als das Tetramerkern auf. Die Stabilität des GlpF-Wildtyps wird zudem überwiegend von der Stabilität der zentralen Regionen des GlpF-Tetramers bestimmt.

4.3.8 Ansätze zur Rückfaltung von entfaltetem GlpF

Das thermodynamische Gleichgewicht zwischen einem nativen Protein und seinen möglichen (Ent)faltungszuständen wird durch Zugabe eines Denaturans verschoben [201]. Bei einer solchen Entfaltung nimmt die Population an ungefaltetem Protein zu und das Verhältnis zwischen den Faltungsintermediaten verschiebt sich gegebenenfalls. Durch Entfernen oder Verdünnen der denaturierenden Substanz kann das ursprüngliche thermodynamische Gleichgewicht wiederhergestellt werden. Ob die Einstellung eines neuen Gleichgewichts vom nativen bzw. denaturierten Zustand eines Proteins ausgeht, spielt in diesem Falle keine Rolle, da die Entstehung des Faltungszustandes wegunabhängig und deswegen reversibel ist [202]. Im Idealfall können der native und der rückgefaltete Zustand eines reversibel faltenden Proteins strukturell und funktionell nicht voneinander unterschieden werden.

In den vorangegangenen Experimenten wurde stets die Entfaltung von GlpF untersucht. Um die Reversibilität und das thermodynamische Gleichgewicht der Entfaltung von GlpF zu überprüfen, wurden zusätzlich Rückfaltungsexperimente am wildtypischen GlpF durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde GlpF in Titrationsansätzen schrittweise entfaltet und das enthaltene SDS im Anschluss mit DDM-haltigem Phosphatpuffer verdünnt, um eine Rückfaltung zu ermöglichen. Die genaue Vorgehensweise bei der Probenvorbereitung ist in Kap. 3.15.7 beschrieben.

4.3.8.1 Monomerisiertes GlpF liegt nach SDS-Verdünnung erneut als Tetramer vor

Erste Rückfaltungsexperimente an SDS-entfaltetem GlpF in DDM-Mizellen wurden bereits von Veerappan *et al.* [167] durchgeführt. Ausgehend von diesen Versuchen wurden auch in dieser Arbeit die Proben der Entfaltungs- und Rückfaltungsansätze mittels seminativer SDS-PAGE untersucht und die Änderung der Quartärstruktur von GlpF analysiert (Abbildung 36). Entsprechend Kap. 3.15.7 wurde eine SDS-Titration durchgeführt. Parallel dazu erfolgte zur Untersuchung der Rückfaltung eine SDS-Titration mit der doppelten Proteinkonzentration. Der Titrationsansatz mit der doppelten Proteinkonzentration wurde nach Inkubation im SDS-haltigen Puffer mit DDM-haltigem Phosphatpuffer gleichen Volumens aufgefüllt. Die SDS-Konzentration im Ansatz wurde auf diese Weise um die Hälfte verringert. Die Verwendung der doppelten Proteinkonzentration diente dem besseren Vergleich beider Ansätze, was allerdings die Unabhängigkeit der Ent- und Rückfaltung von der Proteinkonzentration von GlpF voraussetzt (siehe Abbildung 62, Anhang). Die GlpF-Konzentration entsprach nach der Verdünnung der Konzentration im Entfaltungsansatz. Zusammen mit dem Entfaltungsansatz wurde der Rückfaltungsansatz nach mehrstündiger Inkubation mittels seminativer SDS-PAGE untersucht.

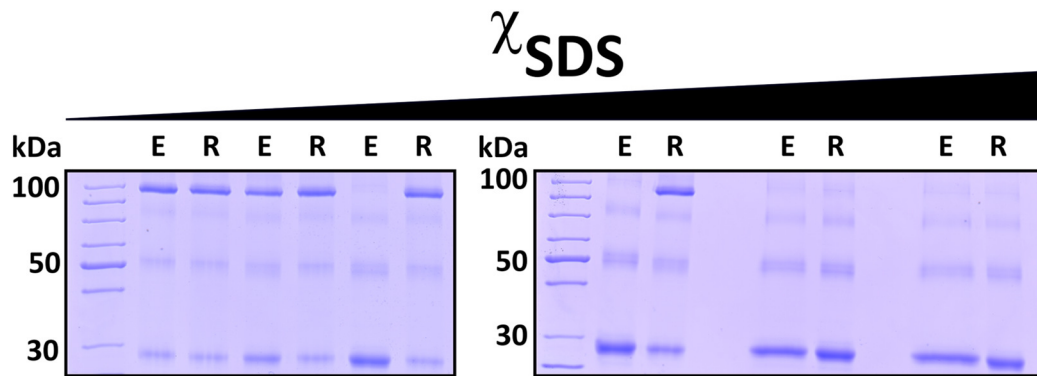


Abbildung 36: Ent- und Rückfaltung des GlpF-Tetramers.

Exemplarisches Polyacrylamidgel der seminativen SDS-PAGE von GlpF nach Zugabe ansteigender χ_{SDS} (Entfaltung, E) und anschließender Verdünnung von SDS auf die Hälfte der ursprünglichen Konzentration (Rückfaltung, R). Jeweils zwei benachbarte Spuren (E und R) zeigen den Entfaltungsansatz und den Rückfaltungsansatz, welcher die um die Hälfte verringerte SDS-Konzentration des entsprechenden Entfaltungsansatzes enthält. Zum Erzielen ähnlicher Bandenintensitäten wurde für die Rückfaltungsansätze die doppelte Proteinkonzentration eingesetzt. Auf diese Weise wurde die GlpF-Konzentration nach Verdünnen der Probe auf die Konzentration des Entfaltungsansatzes gebracht. Voraussetzung für dieses Vorgehen war die zuvor gezeigte Unabhängigkeit der Ent- und Rückfaltung von der Proteinkonzentration (Abbildung 62, Anhang). Im Bereich niedriger χ_{SDS} (erste vier Banden, (Paar 1: $E(\chi_{\text{SDS}} = 0,412)$, $R(\chi_{\text{SDS}} = 0,412)$; Paar 2: $E(\chi_{\text{SDS}} = 0,504)$, $R(\chi_{\text{SDS}} = 0,419)$)) liegt GlpF nach Ent- und Rückfaltung überwiegend als Tetramer vor (Bande bei 100 kDa). Im Bereich ansteigender χ_{SDS} (Paar 3: $E(\chi_{\text{SDS}} = 0,619)$, $R(\chi_{\text{SDS}} = 0,426)$; Paar 4: $E(\chi_{\text{SDS}} = 0,688)$, $R(\chi_{\text{SDS}} = 0,443)$) wird monomerisiertes GlpF (ausgeprägte Bande bei 30 kDa) durch Verdünnen wieder in seine tetramere Form überführt. Bei hohen χ_{SDS} (letzte vier Banden, (Paar 5: $E(\chi_{\text{SDS}} = 0,852)$, $R(\chi_{\text{SDS}} = 0,426)$; Paar 6: $E(\chi_{\text{SDS}} = 0,688)$, $R(\chi_{\text{SDS}} = 0,443)$)) hat das Verdünnen von SDS keine Auswirkung auf das überwiegend als Monomer vorliegende GlpF.

Wie in Abbildung 36 gezeigt, liegt GlpF bei niedrigen χ_{SDS} (Abbildung 36, erste vier Spuren) sowohl im Ent- als auch im Rückfaltungsansatz überwiegend als Tetramer vor, wobei zusätzliche Banden zu erkennen sind, die dem Monomer (30 kDa), Dimer (50 kDa), und einem Trimer (80 kDa) zugeordnet werden können. Ab $\chi_{\text{SDS}} \sim 0,7$ ist GlpF im Entfaltungsansatz überwiegend als Monomer vorzufinden. Ab diesem χ_{SDS} befindet sich das GlpF-Tetramer in einem kritischen Übergangsbereich, in dem die Menge an SDS die Quartärstruktur von GlpF maßgeblich beeinflusst. Wird der Entfaltungsansatz mit dem gleichen Volumen an Puffer versetzt, so wird die Konzentration des enthaltenen SDS auf die Hälfte verringert und die erneute Ausbildung des Tetramers induziert. Dieser Übergangsbereich ist begrenzt, da bei geringen χ_{SDS} Ent- und Rückfaltung keinen Einfluss auf die Monomerisierung haben und in Bereichen höherer χ_{SDS} auch in der verdünnten Probe noch zu viel SDS vorhanden ist, um eine Rückfaltung zu ermöglichen. Daher liegt GlpF bei hohen χ_{SDS} (Abbildung 36, letzte vier Spuren) sowohl im Entfaltungs- als auch im Rückfaltungsansatz überwiegend als Monomer vor.

Die SDS-PAGE-Analyse der Titrationsansätze zur Ent- und Rückfaltung von GlpF zeigt, dass das durch SDS dissoziierte GlpF-Tetramer durch Verdünnen von SDS in einem Übergangsbereich

bestimmter χ_{SDS} erneut tetramerisiert. Eine erneute Tetramerisierung nach vorangegangener Entfaltung (entsprechend [167]) des GlpF-Tetramers ist folglich innerhalb eines bestimmten SDS-Konzentrationsbereichs möglich.

4.3.8.2 Ent- und Rückfaltung von GlpF verlaufen bei unterschiedlichen χ_{SDS}

Die Rückfaltung von GlpF wurde neben der Analyse der Tetramerbandenintensität im Acrylamidgel auch über die Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ untersucht. Dabei wurde die Änderung beider Parameter nach einstündiger Inkubation für die Ent- und Rückfaltung, aber auch nach einer Inkubationszeit von 12 (Entfaltung) und anschließend 42 Stunden (Rückfaltung) beobachtet. Die Messungen der Ansätze mit längeren Inkubationszeiten sollten der Ent- und Rückfaltung unter Gleichgewichtsbedingungen entsprechen. Die Messungen nach jeweils einstündiger Inkubation der Ent- bzw. Rückfaltungsansätze wurden zur genaueren Untersuchung der ablaufenden Prozesse durchgeführt, da sich die größten Veränderungen der Tertiärstruktur im Laufe von einer Stunde abspielen (siehe Abbildung 29 B, Kap. 4.3.1).

In Abbildung 37 A und C ist die normierte Tetramerbandenintensität für die Ent- und Rückfaltung von GlpF beider Messansätze (nach 1h und unter Gleichgewichtsbedingungen) gegen χ_{SDS} aufgetragen. Sowohl die Ent- als auch die Rückfaltungskurve in Abbildung 37 A zeigen einen sigmoidalen Verlauf, wie er bereits in Abbildung 31 (Kap. 4.3.1) gezeigt wurde. Im Vergleich zur Ent- und Rückfaltung nach einstündiger Inkubation (Abbildung 37 A) sind die Graphen in Abbildung 37 C zu kleineren χ_{SDS} verschoben, da die Entfaltung von GlpF zu diesem Zeitpunkt fortgeschrittener ist und die Rückfaltung dementsprechend von diesem Zustand ausgehend induziert wird. Die Übergangsbereiche beider Kurven sind allerdings gegeneinander verschoben: Es ist eine Hysterese zwischen den Übergängen der Kurven für die Ent- und Rückfaltung von GlpF erkennbar. Dabei ist der Übergangsbereich der Rückfaltungsmessung gegenüber dem der Entfaltung zu kleineren χ_{SDS} verschoben. Das Auftreten einer Hysterese deutet auf die Existenz einer kinetischen Barriere (einen energetisch hohen Übergangszustand) bei der Rückfaltung des Proteins hin, die verhindert, dass sich das ursprüngliche Gleichgewicht zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand erneut wieder einstellen kann. Dadurch wird eine reversible Dissoziation bzw. Assemblierung von GlpF unter den gegebenen Bedingungen verhindert.

Abbildung 37 B zeigt den Verlauf der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ der Ent- bzw. Rückfaltung von GlpF nach einer jeweils einstündigen Inkubation. Sowohl für den Graphen der Ent- als auch für den der Rückfaltung ist ein sigmoidaler Verlauf gezeigt. Auch hier lässt sich, ähnlich zu dem Verlauf der Tetramerbandenintensität in Abbildung 37 A, eine Hysterese beider Kurven und eine Verschiebung des Verlaufs der Rückfaltung zu kleineren χ_{SDS} beobachten. Die zuvor beobachtete

Hysterese tritt demnach nicht nur bei Änderungen der Quartärstruktur, sondern auch bei den Änderungen innerhalb der Tertiärstruktur während der Ent- und Rückfaltung von GlpF auf.

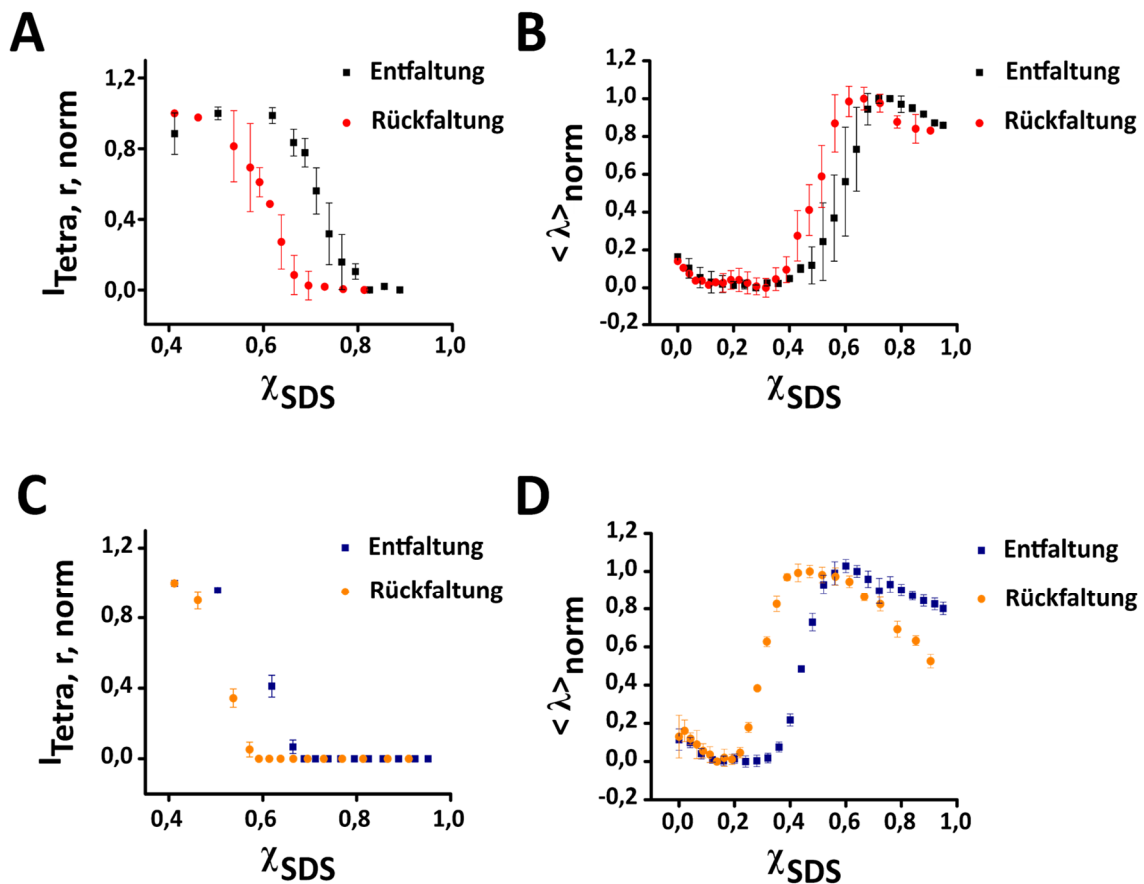


Abbildung 37: Untersuchung der Ent- und Rückfaltung der Quartär- und Tertiärstruktur von GlpF. Die Messungen wurden jeweils nach einstündiger Ent- und Rückfaltung (A und B) sowie nach einer Entfaltungszeit von 12 Stunden und einer Rückfaltungszeit von 42 Stunden durchgeführt (C und D). Letztere Messungen sollen die Ent- und Rückfaltung unter Gleichgewichtsbedingungen nachbilden. Da die Entfaltung von GlpF nach der längeren Inkubationszeit vollständig ablaufen konnte, sind die Graphen von C und D (Gleichgewichtsbedingungen) im Vergleich zu A und B zu kleineren χ_{SDS} verschoben. Das eingestellte Gleichgewicht wird durch die verhältnismäßig kleinen Fehlerbalken in C und D bestätigt, da in diesem Zustand nur geringe Abweichungen innerhalb der Messungen auftreten. (A und C) Die normierte relative Tetramerbandenintensität der Ent- und Rückfaltungsansätze von GlpF nimmt unter ansteigenden χ_{SDS} ab. Der Graph der Rückfaltungsmessung ist im Vergleich zu dem der Entfaltung stets zu kleineren χ_{SDS} verschoben ($n = 3 \pm \text{SD}$). (B und D) Die mittlere Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ ist zum besseren Vergleich der Graphen zur Ent- und Rückfaltung auf den Maximalwert der Entfaltungsmessung normiert. Alle Graphen weisen einen sigmoidalen Anstieg von $\langle \lambda \rangle$ bei ansteigenden χ_{SDS} auf. Die Rückfaltung von GlpF unter Gleichgewichtsbedingungen (siehe D, Rückfaltung) weicht bei hohen χ_{SDS} von dem Verlauf des Graphen der Entfaltungsmessung ab und verläuft in diesem Bereich bei geringeren $\langle \lambda \rangle$ ($n = 3 \pm \text{SD}$). Bei allen Messungen zeigt sich eine Hysterese zwischen Ent- und Rückfaltung, bei der die Graphen der entsprechenden Rückfaltungsmessungen zu kleineren χ_{SDS} verschoben sind. Die Entfaltung von GlpF ist unter den gegebenen Bedingungen demnach nicht reversibel.

Ähnliches lässt sich auch für den Verlauf der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ bei Ent- und Rückfaltung von GlpF unter Gleichgewichtsbedingungen beobachten (Abbildung 37 D). Auch hier liegt eine

Hysterese zwischen Ent- und Rückfaltung vor. Wie schon für Abbildung 37 C diskutiert, ist auch der Verlauf der Graphen zur Ent- und Rückfaltung von GlpF unter Gleichgewichtsbedingungen im Vergleich zu den Graphen in Abbildung 37 B zu kleineren χ_{SDS} verschoben. Ein markanter Unterschied im Vergleich zum Verlauf der in Abbildung 37 B gezeigten Graphen zeigt sich im Bereich hoher χ_{SDS} : Die Messwerte der Rückfaltungsmessung weichen maßgeblich von dem Verlauf der Werte der Entfaltungsmessung ab. In den übrigen Messungen (Abbildung 37 A-C) konnten die Messwerte der Ent- und Rückfaltungsmessungen bei hohen χ_{SDS} nicht voneinander unterschieden werden, da die SDS-Konzentration zu hoch war, um eine ausreichend große Population von unterscheidbarem GlpF eines anderen Faltungszustandes zu erzeugen. Aufgrund der langen Inkubationszeit der Rückfaltungsmessung (42 h) kann möglicherweise jedoch ein Faltungszustand von GlpF populiert werden, dessen Fluoreszenzsignal in einer niedrigeren mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ resultiert (Abbildung 37 D, Rückfaltung ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,6$). Diese Beobachtung weist auf eine mögliche Veränderung der lokalen Umgebung der Tryptophane in GlpF zu einem vergleichsweise hydrophoberen Milieu hin. Diese Abweichung vom Verlauf des Graphen der Entfaltungsmessung verringert sich im Bereich kleinerer χ_{SDS} ($\chi_{\text{SDS}} = 0,5-0,7$) bis zum Übergangsbereich, der die bereits beschriebene Hysterese aufweist.

Die durchgeführten Versuche zur Rückfaltung von GlpF zeigen, dass unter den gegebenen Bedingungen denaturiertes GlpF durch Verdünnung von [SDS] (entsprechend der Vorgehensweise in [167]) erneut in seine tetramere Form überführt werden kann. Auch die Fluoreszenzänderung, die durch einen Anstieg von $\langle\lambda\rangle$ gezeigt wird und unabhängig von der Tetramerisierung von GlpF stattfindet (siehe Kap.4.3.8), lässt sich durch Verdünnen von SDS während der Rückfaltung von GlpF verfolgen. Die Übergänge der Ent- und Rückfaltung zeigen jedoch eine Hysterese. Dies deutet darauf hin, dass die Ent- und Rückfaltung von GlpF unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht reversibel ist. Aus diesem Grund lassen sich keine thermodynamischen Parameter (wie z.B. ΔG , m-Wert) zur Entfaltung und Stabilität von GlpF bestimmen [97]. Obwohl bei der Entfaltung ein Gleichgewicht zwischen dem nativen Zustand N und den möglichen entfalteten Zuständen U eingestellt wird, verläuft die Rückfaltung offensichtlich über ein anderes Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht stellt sich aufgrund einer möglichen energetischen Barriere folglich zwischen dem entfalteten Zustand U und einem rückgefalteten Zustand A ein, der sich strukturell von dem nativen Zustand N unterscheidet. Im Fall von GlpF unterscheidet sich wahrscheinlich sogar der entfaltete Zustand der Rückfaltungsmessung vom entfalteten Zustand der Entfaltungsmessung (siehe Abbildung 36 D), sodass sich bei der Rückfaltung ein Gleichgewicht zwischen einem neuen entfalteten Zustand B und dem neuen rückgefalteten Zustand A einstellt (die Zustände sind hier exemplarisch angeführt; tatsächlich ist die Existenz von mehreren Zustände möglich). Da diese Ergebnisse die Entfaltung von GlpF unter den verwendeten

Bedingungen als irreversiblen Prozess kennzeichnen, ist die Ausbildung eines universellen Gleichgewichtes zwischen nativem und entfaltetem Zustand von GlpF nicht gegeben. Aus diesem Grund werden die in diesem Kapitel durchgeführten Messungen im Weiteren als Messungen unter „quasi“-Gleichgewichtsbedingungen bezeichnet.

4.4 Kinetische Untersuchungen zur Entfaltung von GlpF

Die Entfaltungskinetik von GlpF wurde spektroskopisch mit Hilfe einer *Stopped-Flow*-Apparatur untersucht. Im vorliegenden Versuch wurde die Änderung der intrinsischen Fluoreszenzintensität der Tryptophane von GlpF nach direkter Vermischung von Lösungen mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen erfasst.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Daten wurden teilweise in Zusammenarbeit der Bachelorarbeit von Herrn Konrad Maxeiner gewonnen.

4.4.1 Die Interaktion von GlpF mit SDS resultiert in einem rapiden Abfall der Fluoreszenzintensität

Abbildung 38 zeigt exemplarisch den Verlauf der Fluoreszenzintensität nach dem direkten Vermischen von GlpF mit SDS ansteigender Konzentrationen in DDM-haltigen Phosphatpuffer. Die Vermischung beider Lösungen erfolgt im Laufe der sogenannten Totzeit (1 ms). Die strukturellen Änderungen, die durch den Einfluss von SDS auf GlpF erfolgen, können nach dieser Totzeit fluoreszenzspektroskopisch erfasst werden. Auch in der Totzeit können bereits strukturelle Änderungen des Proteins und somit auch Änderungen der Fluoreszenzintensität stattfinden. Diese lassen sich aber aufgrund technischer Begrenzungen nicht detektieren. Nach vollständiger Vermischung beider Substanzen ist ein Abfall der Fluoreszenzintensität zu erkennen, welcher bereits innerhalb von zwei Sekunden ein Plateau erreicht. Die Änderung der Fluoreszenzintensität bis zum Erreichen einer konstanten Intensität wird als Relaxation bezeichnet. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität ab einer Wellenlänge von 320 nm (*cut-off*) deutet auf eine Umgebungsänderung der Tryptophane zu einem hydrophileren Milieu hin. Bei der Vermischung von GlpF mit Lösungen steigender χ_{SDS} nimmt die Geschwindigkeit, mit der sich die Fluoreszenzintensität ändert, tendenziell zu (Abbildung 38 A). Durch den Einsatz von Negativkontrollen konnte die aufgenommene Relaxation der Entfaltung von GlpF zugeordnet werden.

Die Geschwindigkeitskonstante des Abfalls der gemessenen Fluoreszenzintensität wurde für GlpF mithilfe einer Fitfunktion bestimmt (Abbildung 39). Eine doppelt exponentielle Fitfunktion beschrieb hierbei am ehesten die aufgenommenen Kurven und zeigte eine gleichmäßigere Verteilung der Residuen im Vergleich zum einfach exponentiellen Fit (Abbildung 38 B). Der Verlauf des Intensitätsabfalls k_{obs} von GlpF nach Zugabe von SDS wurde daher mithilfe von zwei Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 beschrieben.

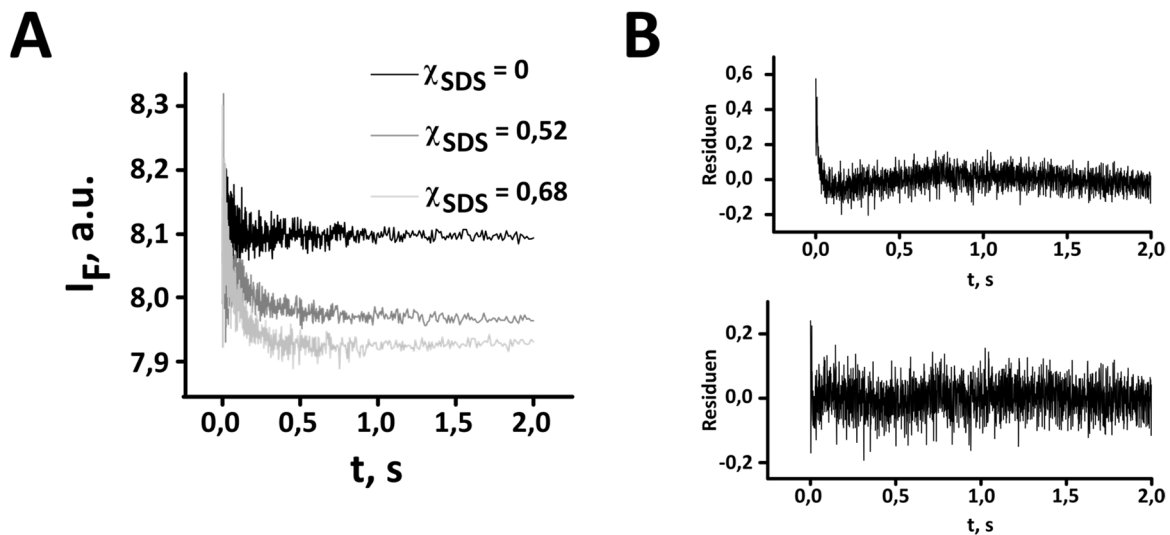


Abbildung 38: Änderung der Fluoreszenzintensität nach Vermischen von GlpF mit SDS.

(A) Exemplarischer Verlauf der Fluoreszenzintensität von GlpF nach Vermischen mit SDS-Lösungen verschiedener Konzentrationen. Sowohl GlpF als auch SDS liegen in Phosphatpuffer mit 5 mM DDM vor. Das Emissionssignal nach Zugabe von SDS zu GlpF zeigt einen Abfall, der nach ca. zwei Sekunden ein Plateau erreicht. Mit zunehmender SDS-Konzentration nimmt auch die Steigung des Abfalls des Emissionssignals (Relaxation) zu. Das Emissionssignal wurde zuvor durch einen 320 nm *cut-off*-Filter gesendet, um ausschließlich das Signal der Tryptophanfluoreszenz zu verfolgen. (B) Exemplarische Verteilung der Residuen bei unterschiedlichen Fitfunktionen zur Beschreibung des Verlaufs des Emissionssignals. Die Verteilung der Residuen ist für die Verwendung einer einfach exponentiellen (oben) und einer doppelt exponentiellen (unten) Fitfunktion gezeigt. Über eine doppelt exponentielle Fitfunktion werden die Residuen über den Zeitraum von zwei Sekunden gleichmäßig verteilt. Aus diesem Grund wurde der Verlauf der Relaxation im Weiteren mit einer doppelt exponentiellen Fitfunktion mit den Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 beschrieben.

Werden die beiden Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 gegen die nach Vermischung erhaltenen χ_{SDS} aufgetragen, so ergeben sich zwei unterschiedliche Verläufe (Abbildung 39 A und B). Die Werte von k_1 bewegen sich im Bereich von $0,2 \text{ s}^{-1}$ bis 1 s^{-1} . k_1 sind im Verhältnis zu k_2 (bis zu 4 s^{-1}) tendenziell verlangsamt (Abbildung 39 B). Außerdem lässt sich durch die unterschiedliche Verteilung der Werte keine eindeutige Tendenz im Verlauf von k_1 bei ansteigenden χ_{SDS} erkennen. k_1 beschreibt demnach einen verhältnismäßig langsamen Abfall, der keine eindeutige Abhängigkeit von χ_{SDS} aufweist. Die Geschwindigkeitskonstante k_2 besitzt im Gegensatz zu k_1 einen biphasigen, tendenziell ansteigenden Verlauf. Die Existenz mindestens zweier Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 ist ein Indiz für zwei verschiedene Entfaltungsprozesse, die mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ablaufen.

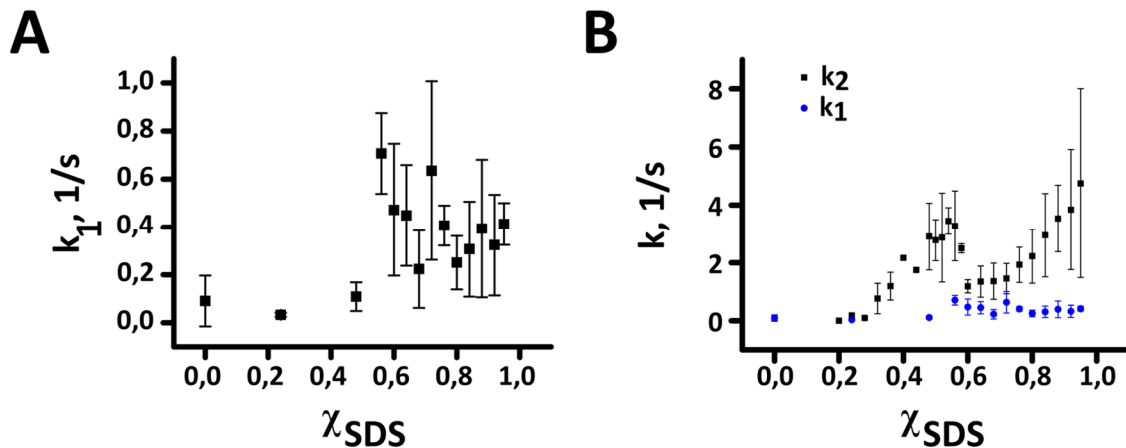


Abbildung 39: Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 aufgetragen gegen χ_{SDS} .

(A) Verlauf von k_1 bei ansteigenden χ_{SDS} . k_1 verläuft in einem Geschwindigkeitsbereich unterhalb 1 s^{-1} und zeigt große Schwankungen zwischen den Datenpunkten. Es lässt sich keine eindeutige Korrelation zwischen k_1 und χ_{SDS} feststellen ($n = 7 \pm \text{SD}$, eine Messung setzt sich aus fünf aufeinanderfolgenden Einzelmessungen einer Probe zusammen). (B) Verlauf der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 bei ansteigenden χ_{SDS} . k_2 verläuft im Vergleich zu k_1 um ein Vielfaches schneller und weist eine deutlich ansteigende Tendenz nach Vermischen mit SDS ansteigender Konzentrationen auf. Bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,5$ ist ein lokales Maximum, ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,7$ ein exponentieller Anstieg von k_2 zu erkennen. Aufgrund des deutlicheren Verlaufs von k_2 wurden in den nachfolgenden Messungen weitere Werte von k_2 auch bei niedrigeren χ_{SDS} ermittelt. Der Verlauf von k_2 wurde im Folgenden über einen Chevronplot dargestellt ($n = 10 \pm \text{SD}$, eine Messung setzt sich aus fünf aufeinanderfolgenden Einzelmessungen einer Probe zusammen).

4.4.2 Der Chevronplot von k_2 weicht von dem Verlauf eines Zweizustands-Entfaltungsmechanismus ab

Zur weiteren Untersuchung der Kinetik von GlpF wurde der Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante k_2 in Form eines Chevronplots gegen χ_{SDS} aufgetragen (Abbildung 40 A). Der Chevronplot wurde bereits in der Einleitung vorgestellt (Kap. 1.3.1) und dient der Darstellung der Veränderung der Ent- und Rückfaltungskinetik eines Proteins durch Zugabe eines Denaturans. Der Chevronplot des GlpF-Wildtyps lässt sich in einen Rückfaltungsarm (schwarz) sowie in einen Entfaltungsarm (rot und blau) unterteilen. Für die zuverlässige und repräsentative Darstellung eines vollständigen Chevronplots werden normalerweise sowohl Ent- als auch Rückfaltungsmessungen mit dem entsprechenden Protein durchgeführt. Bei der kinetischen Untersuchung der Entfaltung von GlpF konnten aber keine Rückfaltungsmessungen durchgeführt werden. Aus diesem Grund war eine vollständige Darstellung des Chevronplots mit einem kompletten Rückfaltungsarm (wie in Abbildung 5 B exemplarisch gezeigt) nicht möglich.

Der Rückfaltungsarm (schwarz) wird in diesem Chevronplot von Datenpunkten ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,3$ repräsentiert. Da durch das Fehlen eines vollständigen Rückfaltungsarmes kein eindeutiges Minimum am Schnittpunkt c_m zwischen dem Ent- und Rückfaltungsarm bestimmt werden konnte (siehe Kap. 1.3.1), kann nur eine grobe Bestimmung des SDS-Molenbruchs erfolgen, an dem der

Logarithmus der Entfaltungsrates k_u dem Logarithmus der Rückfaltungsrates k_f entspricht. Das Minimum befindet sich demnach bei $\chi_{\text{SDS}} \sim 0,6$ im Chevronplot.

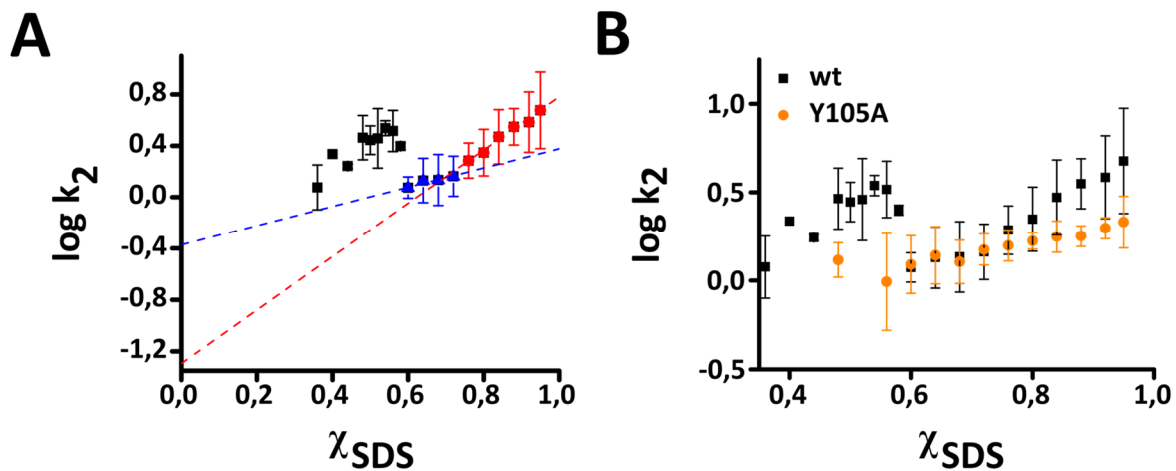


Abbildung 40: Chevronplot des Verlaufs der Geschwindigkeitskonstante k_2 des GlpF Wildtyps und der Variante GlpF Y105A.

(A) Chevronplot der Geschwindigkeitskonstante k_2 des GlpF-Wildtyps. Der Chevronplot wurde ausschließlich basierend auf Entfaltungsexperimenten erstellt. Der Rückfaltungsarm (schwarz) ist ab $\chi_{\text{SDS}} = 0,3$ bis zum Minimum bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,6$ gezeigt und besitzt ein lokales Maximum (*roll-over*) bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,54$. Der Entfaltungsarm ist durch einen aufwärtsgewandten Knick (*upward curvature*) in zwei Entfaltungsarme (blau und rot) unterteilt. Mittels linearer Extrapolation der entsprechenden Werte wurde der y-Achsenabschnitt ($\log k_{2u0}$) und die Steigung (m_{2u}) beider Entfaltungsarme bestimmt. Der y-Achsenabschnitt entspricht dem Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von SDS. Die Steigung ist ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der sich k_2 ändert. Der Chevronplot von GlpF weist keinen V-förmigen Verlauf auf ($n = 10 \pm \text{SD}$, eine Messung setzt sich aus fünf aufeinanderfolgenden Einzelmessungen einer Probe zusammen). (B) Chevronplot der Geschwindigkeitskonstante k_2 des GlpF-Wildtyps und der Variante GlpF Y105A. GlpF Y105A stellt eine monomere, destabilisierte Variante von GlpF dar. Der Entfaltungsarm von GlpF Y105A verläuft parallel zum Entfaltungsarm des GlpF-Wildtyps bei niedrigen χ_{SDS} (vgl. A, blau). Dieser weicht aber bei hohen χ_{SDS} (vgl. A, rot) von dem des GlpF Y105A ab ($n = 10 \pm \text{SD}$, eine Messung setzt sich aus fünf aufeinanderfolgenden Einzelmessungen einer Probe zusammen).

Wie bereits ausführlicher in Kap. 1.3.1 erklärt, deutet ein V-förmiger Chevronplot mit geraden Ent- und Rückfaltungsarmen auf eine klassische Entfaltung nach dem Zweizustandsmodell hin, das häufig für einfache lösliche Proteine zutrifft. Abweichungen von der klassischen Form des Chevronplots geben Hinweise auf komplexere (Ent)faltungsmechanismen, die auf ihrem Weg Intermediate bilden oder parallele Entfaltungswege einschlagen können. Im Falle von GlpF lassen sich zwei markante Abweichungen vom V-förmigen Verlauf eines klassischen Chevronplots erkennen:

1. Ein stark abgewinkelter Rückfaltungsarm (sog. *chevron rollover* [203,204]) bei $\chi_{\text{SDS}} < 0,54$. Da das relative Maximum bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,54$ in zahlreichen Messungen reproduziert werden konnte

(siehe Abbildung 40 A), kann trotz fehlender Experimente zur Bestimmung der Rückfaltungskinetik von einem veränderten Rückfaltungsarm ausgegangen werden.

2. Ein Knick bzw. eine Aufwärtsbiegung (sog. *upward curvature* [205,206]) im Entfaltungsarm des Chevronplots bei $\chi_{\text{SDS}} \sim 0,72$. Durch diesen Knick können die Datenpunkte des Entfaltungsarms in zwei separate Entfaltungsarme aufgeteilt werden, die unterschiedliche Steigungen und Achsenabschnitte aufweisen (Abbildung 40 A, blau und rot, Tabelle 20). Unter der Annahme der linearen Abhängigkeit zwischen $\log k_{2u}$ und χ_{SDS} konnte die Entfaltungsrate k_{2u0L} und k_{2u0H} beider Entfaltungsarme in Abwesenheit von SDS durch Extrapolation bestimmt und die Steigung m_{2u} der Extrapolationsgeraden ermittelt werden (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Parameter der kinetischen Entfaltung des GlpF-Wildtyps und von GlpF Y105A. Der Fehler wurde anhand des erstellten Fits ermittelt.

	Steigung m_{2u}	$\log k_{2u0}$	k_{2u0}, s^{-1}
GlPF wt_{high}SDS (rot)	$2,07 \pm 0,13$	$-1,29 \pm 0,11$	$0,051 \pm 0,0135$
GlPF wt_{low}SDS (blau)	$0,74 \pm 0,14$	$-0,37 \pm 0,08$	$0,42 \pm 0,079$
GlPF wt_{gesamt} (schwarz)	$1,64 \pm 0,12$	$-0,94 \pm 0,09$	$0,116 \pm 0,024$
GlPF Y105A (orange)	$0,53 \pm 0,06$	$-0,21 \pm 0,05$	$0,617 \pm 0,071$

Um zu prüfen, ob die beobachteten Abweichungen wildtypspezifischen Eigenschaften zugeordnet werden können, wurde zusätzlich eine Variante von GlpF, GlpF Y105A, untersucht. Aus den vorhergehenden Experimenten ist bekannt, dass GlpF Y105A eine monomere, destabilisierte Variante von GlpF darstellt (siehe Kap. 4.2.1 und 4.3.6.2). Der Entfaltungsarm des Chevronplots von k_2 von GlpF Y105A ist in Abbildung 40 B gezeigt. Im Gegensatz zum GlpF-Wildtyp verläuft dieser linear und weist eine Steigung auf, die der Steigung des Entfaltungsarms bei niedrigeren χ_{SDS} (Abbildung 40 A, blau) entspricht (siehe Tabelle 20). Diese Übereinstimmung deutet auf die mögliche Existenz zweier Bereiche im Entfaltungsarm vom GlpF, welche unterschiedliche Steigungen besitzen. Der obere Entfaltungsarm (Abbildung 40 A, rot) ist nur im stabilen, tetrameren GlpF, jedoch nicht im destabilisierten GlpF Y105A sichtbar.

Der Chevronplot von GlpF weist nicht den klassischen V-förmigen Verlauf auf, der für eine einfache Entfaltung nach dem Zweizustandsmodell typisch wäre. Die Entfaltung von GlpF scheint demnach über einen komplexeren Mechanismus zu erfolgen. Dieser abweichende Verlauf lässt sich allerdings nicht für die Variante GlpF Y105A beobachten.

4.4.3 Die Interaktion einiger GlpF-Varianten mit SDS resultiert in einer atypischen Relaxation

Varianten von GlpF, in denen jeweils ein Tryptophan ausgetauscht worden ist, wurden ebenfalls mit Hilfe der *Stopped-Flow*-Apparatur fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Zum besseren Vergleich wurden nur Varianten von GlpF untersucht, welche im Hinblick auf die Tetramerstabilität mit dem GlpF-Wildtyp weitestgehend vergleichbar waren (siehe Kap. 4.1). In der Regel ähnelte dabei der Verlauf der Relaxation dem des GlpF-Wildtyps (siehe Abbildung 38). In zwei Fällen konnten jedoch abweichende Relaxationsprozesse detektiert werden (Abbildung 41). Im vorliegenden Kapitel sollen die Varianten vorgestellt werden, die von der Norm des Intensitätsabfalls des wildtypischen GlpF abweichen und somit zusätzliche Informationen zu möglichen strukturellen Änderungen bei der Entfaltung von GlpF bringen.

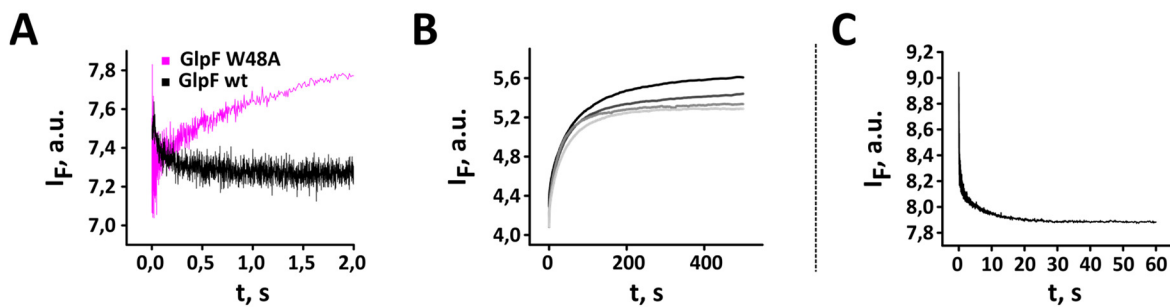


Abbildung 41: Relaxationen von GlpF W48F und GlpF W219F im Vergleich zum GlpF wt nach Vermischen mit SDS.

(A) Exemplarischer Verlauf der Fluoreszenzintensität von GlpF W48F (pink) im Vergleich zum GlpF wt (schwarz). Im Gegensatz zu den restlichen untersuchten Varianten von GlpF steigt die Fluoreszenzintensität von GlpF W48F an. (B) Verlauf der Fluoreszenzintensität von GlpF W48F unter Einfluss ansteigender χ_{SDS} (schwarz: niedrige χ_{SDS} ; hellgrau: hohe χ_{SDS}). Die Relaxation erreicht bei hohen χ_{SDS} erst nach ca. 200 Sekunden ein Plateau, welches beim wildtypischen GlpF bereits nach zwei Sekunden erreicht ist. (C) Exemplarischer Verlauf der Fluoreszenzintensität von GlpF W219F nach Vermischen mit SDS ($\chi_{SDS} = 0,95$). Auch die Relaxation des Fluoreszenzsignals von GlpF W219F ist im Vergleich zum GlpF wt verlangsamt und erreicht erst nach ca. 30 Sekunden ein Plateau.

Im Gegensatz zum GlpF wt ist bei der Interaktion von GlpF W48F mit SDS ein **Anstieg** der Fluoreszenzintensität zu beobachten (Abbildung 41 A, pinker Graph), welcher auch unter ansteigenden χ_{SDS} stets beobachtet werden kann. (Abbildung 41 B). Das Plateau des Graphen, das dem sich neu einstellenden Gleichgewicht entspricht, wird mit ansteigenden χ_{SDS} tendenziell schneller erreicht. Diese Umkehrung der Fluoreszenzänderung kann nur in der Variante GlpF W48F beobachtet werden. Das Fehlen anderer Tryptophane führt stets zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität nach Vermischen mit SDS. Darüber hinaus ist die Relaxation bei dieser Variante mit bis zu 200 Sekunden deutliche langsamer als die des GlpF-Wildtyps.

Auch GlpF W219F zeigt eine ungewöhnlich langsame Relaxation, bei welcher das Plateau erst nach 30 Sekunden erreicht wird (Abbildung 41 C). Diese langsamen Relaxationen lassen sich nur in Abwesenheit von Trp 48 bzw. Trp 219 beobachten. Die Entfaltung von GlpF scheint daher über mehrere parallele Prozesse abzulaufen, die unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen.



5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Entfaltung des Aquaglyceroporins GlpF sowie die Rolle seiner Tryptophanseitenketten bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers untersucht. Die Ergebnisse werden entsprechend ihrer Reihenfolge in Kap. 4 in den folgenden Kapiteln diskutiert.

5.1 Einfluss der Tryptophane auf die Stabilität des GlpF-Tetramers

Die in Kapitel 4.1 aufgeführten Ergebnisse zu den jeweils untersuchten Varianten von GlpF sind in Tabelle 21 entsprechend der betrachteten Kriterien zusammengefasst.

Tabelle 21: Zusammenfassung der relevanten Parameter der erstellten GlpF-Varianten hinsichtlich ihrer Tetramerstabilität.

+: Vergleichbar mit GlpF wt; +/-: Geringe Abweichung vom GlpF wt, leicht destabilisiert;

- : Markante Abweichung vom GlpF wt, stark destabilisiert.

Hellgrau: Lipidzugewandte Tryptophane; Grau: W42A (Sonderfall); Dunkelgrau: Proteinzugewandte Tryptophane.

	GlpF-Variante	Präsenz des GlpF-Tetramers im SDS-Gel	Stabilität des GlpF-Tetramers nach Zugabe von SDS	Aktivität - <i>in vivo</i> (im Vergleich zum GlpF wt)
	W76A	+	+	+
	W215A	+	+	+
	W42A	+/-	+/-	-
	W48A	-	-	+/- verringert um 30 %
	W48F	+/-	+	-
	W48Y	-	-	-
	W219A	-	-	- verringert um 50 %
	W219F	+/-	- wird bereits ab $\chi_{SDS} = 0,6$ destabilisiert	+
	W219Y	-	-	+/- verringert um 30 %

5.1.1 Die Tryptophane 76 und 215 sind für die Stabilität des GlpF-Tetramers nicht relevant

Die Untersuchungen an den erstellten GlpF Varianten W76A und W215A zeigen, dass die beiden lipidzugewandten Tryptophane in Detergenzumgebung keinen Einfluss auf die Stabilität des GlpF-Tetramers haben. Dass beide GlpF-Varianten ähnliche Tetramerstabilitäten und-aktivitäten in Detergenzumgebung aufweisen, lässt sich auf ihre Belegung derselben Position im *inverted repeat*-Motiv von GlpF zurückführen [135]. Da das GlpF-Monomer sowie alle Aqua(glycero)porin-Monomere aus zwei punktsymmetrisch zueinander angeordneten Subdomänen aus jeweils dreieinhalb Transmembranhelices bestehen [207] (vgl. Abbildung 9), entspricht das Trp 76 aus einer Subdomäne dem Trp 215 der jeweils anderen Subdomäne. Dementsprechend können beide Tryptophane auf die Position im ursprünglichen GlpF-Vorläuferprotein zurückgeführt werden, welches im Laufe der Evolution durch Genduplikation zum heute bekannten *glpF*-Gen fusioniert ist [208]. Aus diesem Grund haben beide Tryptophane vermutlich eine vergleichbare Funktion. Ein Vergleich mit den Sequenzen anderer Organismen zeigt jedoch, dass diese Tryptophane nicht hoch konserviert und daher vermutlich nicht von genereller Relevanz für Aqua(glycero)porine sind (siehe Abbildung 63, Anhang). Da alle Aqua(glycero)porine Tetramere ausbilden [131], bestärkt die Sequenzanalyse die Annahme, dass Trp 76 und Trp 215 keine direkte Relevanz bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers besitzen.

In Untersuchungen des in *E. coli*-Lipid rekonstituierten Aquaporins SoPIP2;1 konnte ein zu kürzeren Wellenlängen verschobenes Emissionsmaximum des Fluoreszenzspektrums beobachtet werden, als es für das in Detergenzmizellen solubilisierte SoPIP2;1 der Fall ist [209]. Das Protein interagiert in Detergenzmizellen folglich verstärkt mit der löslichen Umgebung, als es in Membranlipiden der Fall ist. Auch SoPIP2;1 enthält überwiegend Tryptophane, die im Protein an der Grenzfläche zur löslichen Umgebung angeordnet sind. Diese besitzen aufgrund der in den Detergenzmizellen locker um das Protein angeordneten Alkylketten eine erhöhte Zugänglichkeit zur löslichen Umgebung als in der geschützteren Umgebung der Lipidmembran [209,210]. Dies kann darauf hindeuten, dass die lipidzugewandten Tryptophane schwächer mit den Detergenzmizellen interagieren, als mit Lipiden. So könnten die Wechselwirkungen von Trp76 und Trp 215 von GlpF mit der natürlichen Lipidumgebung durchaus Auswirkungen auf das GlpF-Tetramer haben, die in den durchgeführten Experimenten in Detergenzmizellen nicht detektierbar sind.

Die beiden Tryptophane Trp 76 und Trp 215 befinden sich auf Höhe des *interface* der Lipiddoppelschicht, in die GlpF inseriert ist (siehe Abbildung 15). Diese Position deutet auf eine mögliche Funktion als Membrananker hin, die für Tryptophane weitestgehend angenommen wird

[79,81,84,211]. Diese Funktion ist nicht zwangsläufig an den oligomeren Zustand von GlpF gebunden, da sie primär einem *hydrophobic mismatch* (d.h. einer Diskrepanz zwischen der Dicke der hydrophoben Proteinregionen und der Membran) entgegenwirken soll [85]. Auch als Monomer bildet GlpF eine funktionale Einheit [159], obgleich diese in ihrer Aktivität eingeschränkt ist. Beide Tryptophane könnten die Funktion als Membrananker demnach auch im monomeren Zustand ausüben. Besonders nach Ausbildung des Tetramers ergibt sich allerdings durch die symmetrische Anordnung der lipidzugewandten Tryptophane eine mögliche radiale Verankerung in der Membran. Diese entspricht in seiner Anordnung einem *aromatic belt*, der einem *hydrophobic mismatch* entgegenwirken kann [212,213]. Auf diese Weise bleiben die funktionalen Poren der Monomere im Inneren des Tetramers geschützt (Abbildung 42).

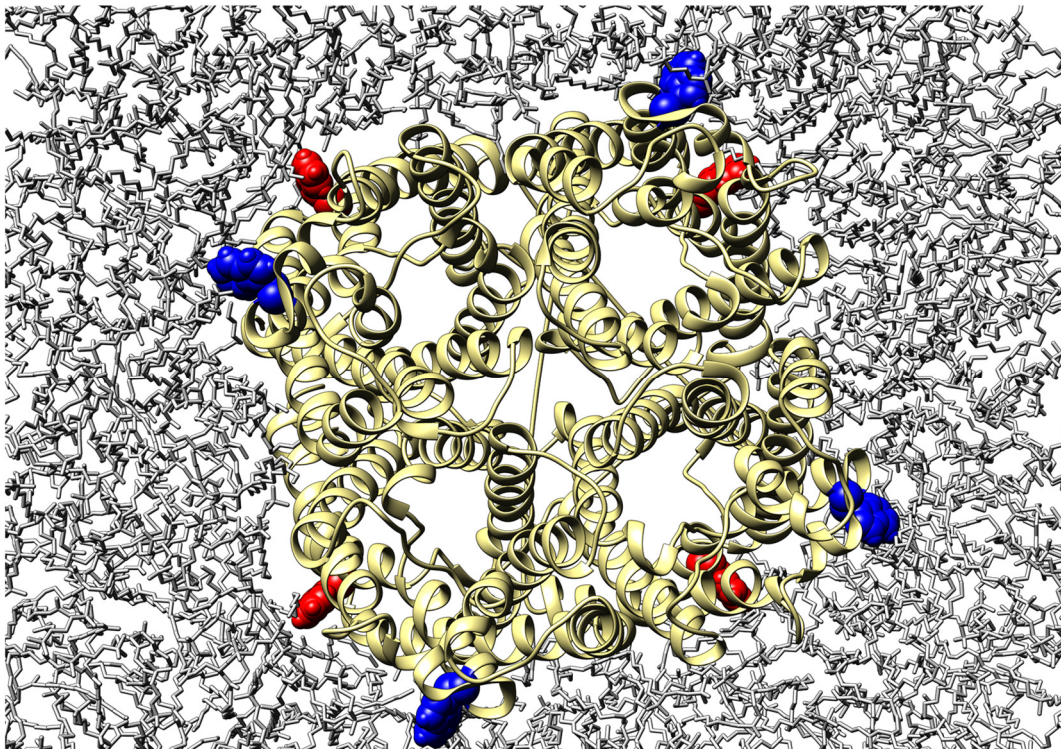


Abbildung 42: Radiale Anordnung der lipidzugewandten Tryptophane in GlpF.

Periplasmatische Aufsicht des GlpF-Tetramers (gelb) eingebettet in eine Lipidmembran bestehend aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, weiß). Die lipidzugewandten Tryptophane in GlpF sind für die Stabilisierung des GlpF-Tetramers nicht relevant. Doch durch die Ausbildung des Tetramers können die lipidzugewandten Tryptophane Trp 215 (blau) und Trp 76 (rot) über eine potenzielle radiale Verankerung einem möglichen *hydrophobic mismatch* besser entgegenwirken. Die über <http://memprotmd.bioch.ox.ac.uk> (Stand 10/2018) zur Verfügung gestellte Struktur von GlpF in DPPC wurde über eine Simulation mittels MemprotMD [193] erstellt.

Die *in vivo*-Aktivitätsmessungen zeigen im Fall von W76A und W215A wildtypische Aktivität, und besitzen auch in Mizellenumgebung die dementsprechende Stabilität. Die oben beschriebene potenzielle Funktion von Trp 76 und Trp 215 als Lipidanker ist in Mizellenumgebung

wahrscheinlich nicht relevant, was die Stabilität des GlpF-Tetramers aber nicht beeinflusst. Sollten Trp 76 und Trp 215 als Lipidanker von GlpF dienen, so hat dies zumindest keinen Einfluss auf die *in vivo*-Aktivität von GlpF. Bei den Bedingungen der hier beschriebenen Experimente sind Trp 76 und Trp 215 für die Stabilität des GlpF-Tetramers daher nicht relevant.

5.1.2 Trp 42 hat nur bedingt Einfluss auf die Tetramerstabilität von GlpF

Bereits in [159] wurde postuliert, dass Tryptophan 42 keinen Einfluss auf die Oligomerisierung von GlpF hat. In dieser Arbeit wurde die genauere Stabilität unter den in Kap. 4.1 erwähnten Kriterien überprüft. Die hierbei gemachten Beobachtungen stimmen mit den Aussagen in [159] überein: GlpF W42A bildet ein weitestgehend stabiles Tetramer aus. Dieses weist aber keine Aktivität auf. Eine solche Beobachtung konnte in der Regel bei Varianten von GlpF gemacht werden, die direkt an der Translokation von Glycerin beteiligt sind (z.B. GlpF W48F); Trp 42 ragt jedoch mit seiner funktionellen Gruppe in die Tetramerpore von GlpF und geht keine direkte Interaktion mit den Substraten ein. Die Rolle von Trp 42 steht im Gegensatz zur Relevanz der benachbarten Aminosäure Glu 43, deren Austausch zu Alanin in einer monomeren Variante von GlpF resultiert [159]. Diese weist allerdings (verminderte) Aktivität auf. Es wird eine Wechselwirkung von Glu 43 mit den Glutaminsäureresten der anderen Monomere vermutet, die zur Ausbildung eines stabilisierenden Netzwerks führt [159]. Im Fall von Trp 42 kann keine eindeutige Aussage über die Wechselwirkung mit anderen Aminosäuren gemacht werden.

Die *in vitro* Stabilität von GlpF W42A ist im Vergleich zum GlpF wt leicht verringert (siehe Abbildung 20 B). Da in *in vivo*-Experimenten gezeigt wurde, dass die Tendenz zur Oligomerisierung mit der des GlpF-Wildtyps übereinstimmt [159], könnte die in dieser Arbeit beobachtete Destabilisierung auf die künstliche Mizellenumgebung zurückgeführt werden, der das GlpF-Tetramer ausgesetzt ist. Trp 42 ragt mit seiner funktionalen Gruppe in die Pore, die durch die Oligomerisierung in der Mitte des Tetramers gebildet wird (Abbildung 19). Da sich Trp 42, wie die lipidzugewandten Tryptophane, an der Grenzfläche zur löslichen Umgebung befindet, könnte sich eine Wechselwirkung mit den nicht-annularen Lipiden der Tetramerpore stabilisierend auf das GlpF-Tetramer auswirken. Allerdings gibt es keinen Beleg dafür, dass die Pore von Lipiden ausgefüllt wird, obwohl diese Annahme für andere Aquaporine bestätigt werden konnte [155]. In vielen Fällen wird vielmehr die Existenz einer zusätzlichen zentralen Pore, die durch die Tetramerisierung ausgebildet wird, diskutiert [157,214]. Auch die Fixierung eines Ions in der Tetramerpore, wie es bei Aqy1 aus *Pichia pastoris* der Fall ist [215], wurde zunächst für GlpF angenommen. In der Kristallstruktur von GlpF wurden zwei Magnesiumionen in der Tetramerpore detektiert, die potenziell durch die vier Seitenketten von Glu 43 bzw. Trp 42 fixiert werden können. Da allerdings seitdem belegt werden konnte, dass GlpF für seine Tetramerisierung keine

Ionen benötigt [164], ist das Vorhandensein der Magnesiumionen auf die Kristallisationsbedingungen zurückzuführen, für die eine hohe Magnesiumkonzentration (300 mM) eingesetzt wurde.

Unter den angewandten Kriterien (Existenz eines Tetramers unter seminativen Bedingungen, Verlauf der Destabilisierung unter ansteigenden χ_{SDS} , ferner Durchflussaktivität, siehe Kap. 4.1) hat Trp 42 eine, wenn auch eingeschränkte, Relevanz für die Stabilität des GlpF-Tetramers. Allerdings wurde die weitere Untersuchung von Trp 42 durch Austausch mit anderen Aminosäuren (beispielsweise mit Phe und Tyr) nicht durchgeführt. Der Fokus wurde in dieser Arbeit auf die Tryptophane gelegt, die durch den Austausch zu Alanin eine Dissoziation des GlpF-Tetramers bewirken. Möglicherweise hat Trp 42 eine regulatorische Rolle im GlpF-Monomer und steuert durch Wechselwirkungen mit einem potenziellen Koordinator (möglicherweise mit Lipiden in der Tetramerpore) die Aktivität der einzelnen Monomere. Da allerdings nicht bekannt ist, ob und von welchen Substanzen die zentrale Pore belegt wird, lässt sich nicht einschätzen, wie stark der Einfluss von Trp 42 auf die Stabilität des GlpF-Tetramers tatsächlich ist. Der Einfluss von Trp 42 auf die Stabilität des GlpF-Tetramers ist nicht so weitreichend, dass ein Fehlen dieses Tryptophans an dieser Stelle die Ausbildung des GlpF-Tetramers einschränkt.

5.1.3 Die zentrale Position von Trp 48 ist für die allgemeine Stabilität von GlpF relevant

Der Austausch von Trp 48 gegen Alanin, Phenylalanin und Tyrosin beeinträchtigte in unterschiedlichen Ausprägungen die Stabilität des GlpF-Tetramers. GlpF W48A und W48Y liegen im Polyacrylamidgel nicht als Tetramer vor und zeigen eine reduzierte bzw. keine Kanalaktivität. Trp 48 bildet als Teil des Selektivitätsfilters der substratleitenden Pore im GlpF-Monomer zusammen mit Phe 200 eine hydrophobe Tasche aus, die mit der Alkylkette von Glycerin interagiert und die stereoselektive Passage von linearen Polyalkoholen zulässt [135]. Die Passage durch den Selektivitätsfilter stellt bei der Durchflussaktivität der Aquaglyceroporine den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar [216], weshalb ein Austausch der selektivitätsrelevanten Aminosäuren Trp 48, Gly 199, Phe 200 und Arg 206 signifikante Änderungen der Durchflussaktivität hervorrufen kann [135]. Beim Austausch von Trp 48 gegen Alanin entsteht daher möglicherweise eine zu den wasserleitenden Aquaporinen analoge Pore. Diese lässt zwar eine verbesserte Koordination von Wasser zu, unterbindet aber die van-der-Waals-Wechselwirkung zu den Alkylketten des hier verwendeten Ribitols. Aus diesem Grund wird der Substratfluss in GlpF W48A vermutlich verringert. Diese Beobachtung stimmt hierbei mit den Ergebnissen aus [135] überein, bei denen sowohl jeweils Trp 48, als auch Phe 200 gegen Alanin ausgetauscht worden sind.

Durch den Austausch von Trp 48 zu Phenylalanin oder Tyrosin ist der Ribitolfluss vollständig unterbunden, was wahrscheinlich auf den spezialisierten Aufbau und die spezifische Wechselwirkung mit dem hydrophoben Phe 200 zurückgeführt werden kann. Die Kombination beider Aminosäuren (Trp 48 und Phe 200) ist für die Translokation von Ribitol von Bedeutung [135]. Dabei spielt nicht nur die Hydrophobizität, sondern auch die Größe von Trp 48 eine maßgebliche Rolle, weswegen ein Austausch zu dem kleineren Phenylalanin an Position 48 für die Gewährleistung des Ribitolflusses in GlpF nicht ausreicht. Nur die Variante GlpF W48F zeichnet sich durch ein stabiles (wenn auch inaktives) Tetramer aus. Phenylalanin an Position 48 kann die Stabilität des GlpF-Tetramers aufrechterhalten, wenn auch nicht seine Aktivität. Folglich ist ein Tryptophan an Position 48 nicht *per se* relevant für die GlpF-Tetramerstabilität. Dennoch ist ein Tryptophan an dieser Position für die volle Durchflussaktivität unabdingbar. Trp 48 wirkt durch seine zentrale Position in der Monomerpore demnach wahrscheinlich stabilisierend auf das gesamte GlpF-Monomer, was wiederum zur Stabilisierung des GlpF-Tetramers führt. Trp 48 hat daher nur einen indirekten Einfluss auf die Stabilität des GlpF-Tetramers.

5.1.4 Trp 219 hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität des GlpF-Tetramers

Trp 219 befindet sich in der periplasmatischen Vestibülregion von GlpF und ist in Loop E lokalisiert. Im GlpF-Tetramer ist Trp 219 in der Tetramerperipherie, nahe der Lipidschicht angesiedelt (siehe Abbildung 23). Die funktionelle Gruppe ragt in das Innere des Proteins, ist aber kein Teil der substratleitenden Pore von GlpF. Ein Austausch von Trp 219 gegen Alanin hat dennoch erhebliche Auswirkungen auf Tetramerstabilität und -aktivität des Proteins. GlpF W219A weist ein stark destabilisiertes Monomer und die mit Abstand niedrigste messbare Durchflussaktivität aller untersuchten Tryptophanvarianten auf, und zeigt obendrein ein vergleichsweise stark verringertes Expressionsniveau. Dieses wurde (wie bei allen GlpF-Varianten) auch in die Berechnung der gewichteten Durchflussaktivität einbezogen, konnte aber die gemessene niedrige Flussrate nicht kompensieren. Trotz seiner Distanz zu den Interaktionsbereichen des GlpF-Tetramers (Abbildung 43) spielt Trp 219 eine entscheidende Rolle für dessen Struktur und Funktion.

Ein Austausch von Trp 219 zu Tyrosin resultierte in einer monomeren GlpF-Variante mit verringerter Aktivität, was möglicherweise auf eine störende Wechselwirkung der Hydroxylgruppe von Tyrosin mit den bestehenden Wasserstoffbrücken in GlpF zurückgeführt werden kann. Die Ergebnisse zeigen jedoch des Weiteren, dass Trp an Position 219 durch Phenylalanin ersetzt werden kann, sodass GlpF W219F als funktionsfähiges Tetramer vorliegt. Diese Variante weist allerdings nicht die gleiche Tetramerstabilität wie das wildtypische GlpF auf. Phenylalanin kann

das GlpF-Tetramer aber nur bedingt stabilisieren, weshalb GlpF W219F im Vergleich zum GlpF wt unter geringeren χ_{SDS} monomerisiert. Ein Tryptophan an Position 219 ist folglich für die Stabilität des GlpF-Tetramers essenziell.

Auf Grundlage seiner Kristallstruktur (PDB-ID: 1FX8) wurde die Oligomerisierung des GlpF-Tetramers auf Interaktionen der Helices 1 und 2 eines Monomers mit den Helices 5 und 6 des benachbarten Monomers zurückgeführt, die auf hydrophoben, aber auch polaren Wechselwirkungen beruhen [159,217,218]. Des Weiteren wurde im Aquaporin AQP1 ein Interaktionsmotiv aus drei Aminosäuren (Asn, Lys, Asp) gefunden, welches für die Bindung zwischen Helix 2 und Helix 5 und die Tetramerisierung der jeweiligen AQP1-Monomere von Bedeutung ist [219]. Diese Interaktionsstellen befinden sich an den angrenzenden Transmembranbereichen der jeweiligen Monomere. Umso ungewöhnlicher ist der maßgebliche Einfluss einer einzigen Aminosäure (Trp 219) auf das GlpF-Tetramer, welche nicht an einer dieser Interaktionsflächen lokalisiert ist. Die Aminosäuren in der Umgebung von Trp 219 könnten aber über potenzielle van-der-Waals-Wechselwirkungen Einfluss auf die Aminosäuren des Interaktionsbereichs zwischen den GlpF-Monomeren ausüben und somit indirekt an der Oligomerisierung von GlpF beteiligt sein. Diese Möglichkeit besteht, da Trp 219 sich im Interaktionsradius zu Loop C oder der damit verbundenen Helix 4 befindet, welche zu Helix 2 benachbart ist und deren strukturelle Anordnung möglicherweise beeinflussen kann (Abbildung 43). Auf diese Weise könnten sowohl Transmembran- als auch Loop-Regionen über Trp 219 in einem gewissen Maße Einfluss auf die Stabilität des Tetramers von GlpF nehmen. Im Fall von AQP4 konnte die stabilisierende Wirkung einer Loop-Region auf die Tetramerstruktur beobachtet werden [220], die allerdings keinen Einfluss auf die Durchflussaktivität von AQP4 hat. In ähnlicher Weise würde Trp 219 vermutlich keine direkte Schlüsselfunktion bei der Oligomerisierung von GlpF einnehmen. Vielmehr beeinflusst Trp 219 (wie auch Trp 48) vermutlich aufgrund eines stark verknüpften Netzwerkes von Interaktionen über eine größere Distanz die allgemeine (oligomere) Struktur von GlpF.

Der Austausch einzelner Aminosäuren in GlpF kann laut den gewonnenen Resultaten bereits drastische Auswirkungen auf die Oligomerisierung haben. Diese Beobachtung untermauert auch bereits gemachte Untersuchungen an GlpF und AQP1 [159,221]. Da das GlpF-Monomer im Gegensatz zum Tetramer schneller von zelleigenen Mechanismen abgebaut wird [159], kann der relativ leicht erreichbare monomere Zustand einen Sicherheitsmechanismus darstellen, der mutierte oder fehlgefaltete GlpF-Varianten schneller eliminiert. Dieser Mechanismus kann in vielen Fällen überlebenswichtig sein, da gerade in einzelligen Organismen defekte Proteine über Leben und Tod der Zelle entscheiden können [222]

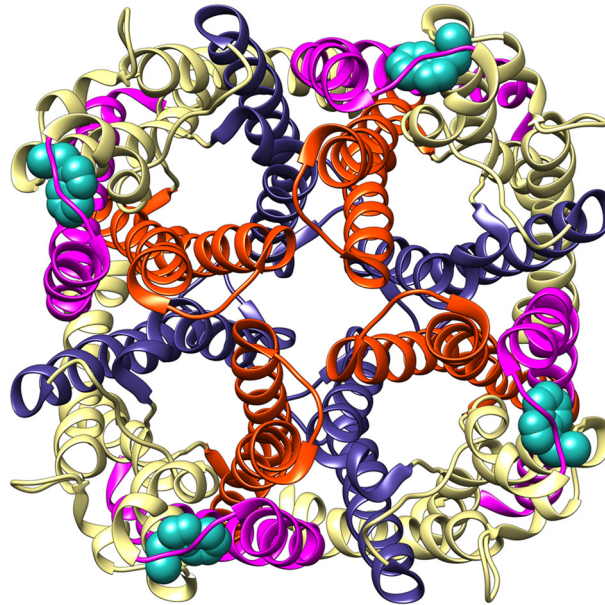


Abbildung 43: Potenzieller Einfluss von Trp 219 auf die Stabilität des GlpF-Tetramers. Die Interaktion zwischen den GlpF-Monomeren findet über die Helices 2 und 3 (rot) statt, die mit den Helices 5 und 6 (blau) wechselwirken. Obwohl Trp 219 (türkis) nicht in direktem Kontakt zu diesen Helices steht, besitzt diese Aminosäure einen maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität des GlpF-Tetramers. Dies könnte der Interaktion mit Helix 4 oder Loop C (beide pink) geschuldet sein, welcher in Verbindung zu Helix 4 steht. Helix 4 ist benachbart zu Helix 2 und könnte durch das Fehlen von Trp 219 einen destabilisierenden Einfluss auf Helix 2 und den gesamten Interaktionsbereich des GlpF-Tetramers haben (PDB-ID: 1FX8).

5.1.5 Zur Rolle der Tryptophane bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers

Die Resultate zeigen, dass die Tryptophane in GlpF von unterschiedlicher Relevanz für die Stabilität des GlpF-Tetramers sind. Die meisten Tryptophane haben keinen Einfluss auf die Stabilität des GlpF-Tetramers (Trp 76, Trp 215 und zum Teil auch Trp 42) oder weisen eine allgemeine stabilisierende Funktion aufgrund ihrer zentralen Position im GlpF-Monomer auf (Trp 48). Eine Untersuchung der Rolle der Tryptophane in einem Protein ist dennoch sinnvoll, da diese Aminosäure oft an relevanten Positionen (*hot spots*) von Protein-Protein-Interaktionen zu finden ist [223]. Auf diese Weise wurde beispielsweise die wichtige Rolle von Trp 240 bei der Stabilisierung des Oligomers von MscS (mechanosensitiver Kanal in *E. coli*) entdeckt [224]. Im Fall von GlpF konnte Trp 219 als relevante Aminosäure für die Stabilisierung des GlpF-Tetramers identifiziert werden (siehe auch [225]). Die genauere Rolle von Trp 219 in GlpF wurde in Kap. 4.2 untersucht und wird im Folgenden diskutiert.

5.2 Die Rolle von Trp 219 im periplasmatischen GlpF-Vestibül

5.2.1 Trp 219 trägt zur Stabilisierung der Vestibülregion in GlpF bei

Die Mitglieder der Aquaglyceroporin-Familie sind strukturell hoch konserviert [207]. Aus diesem Grund können strukturelle Unterschiede zwischen Aquaporinen und Aquaglyceroporinen häufig auf die Anpassung an unterschiedliche Substrate zurückgeführt werden. Diese Unterschiede betreffen in der Regel die Translokationspore, die entweder die ausschließliche Passage von Wasser oder zusätzlich von kleinen löslichen Molekülen zulassen muss [138]. Doch auch die periplasmatische Vestibülregion von Aquaglyceroporinen unterscheidet sich von der in Aquaporinen. Diese ist in Aquaglyceroporinen meist ausgeprägter und ragt daher weiter in das Periplasma hinein [137]. Ein Sequenzvergleich von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen verschiedener Organismen zeigte in dieser Arbeit (Kap. 4.2.1), dass Trp 219 in einem Bereich liegt, der in Aquaporinen vollständig fehlt (siehe Abbildung 26). Dies spricht für die spezifische Rolle dieses Bereiches – und somit auch des Trp 219 – bei der Funktion von Aquaglyceroporinen. Die in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse zeigte, neben dem Fehlen des Bereiches um Trp 219 in Aquaporinen, die hochkonservierte Position von Trp 219 in allen Aquaglyceroporinen (Abbildung 26). Dies deutet auf die allgemeine Relevanz von Trp 219 in allen orthodoxen Aquaglyceroporinen hin. Das Tryptophan, welches in *E. coli* an Position 219 liegt, ist in nahezu allen Aquaglyceroporinen strukturell an ähnlicher Stelle vorzufinden und ist nur in phylogenetisch entfernten Taxa wie *Leishmania* oder *Caenorhabditis* durch Tyrosin ersetzt (siehe Abbildung 26). Die Funktion des Tryptophans an dieser Position hat sich demnach anscheinend in vielen Aquaglyceroporinen im Laufe der Evolution bewährt. Die Resultate aus Kapitel 4.1.3.2 zeigen auch, dass ausschließlich ein Tryptophan an Position 219 die Stabilität und Funktion von GlpF sicherstellen kann. Trp 219 besitzt demnach möglicherweise eine Funktion, die in allen Aquaglyceroporinen relevant ist. Da die ausschließlich wasserleitenden Aquaporine ebenfalls Tetramere ausbilden, ihnen aber der Bereich fehlt, der sich in GlpF um Trp 219 befindet (Abbildung 26), scheint Trp 219 nicht in erster Linie für die Ausbildung des GlpF-Tetramers relevant zu sein. Diese Annahme deckt sich mit der bereits im vorigen Kapitel aufgestellten Hypothese, dass Trp 219 keine direkte Rolle bei der Stabilisierung des GlpF-Tetramers spielt. Trp 219 scheint eine andere, aquaglyceroporinspezifische Rolle zu spielen, die nicht direkt mit der Stabilisierung des GlpF-Tetramers zusammenhängt.

Durch den Vergleich von über 1400 Aqua(glycero)porinsequenzen wurde die durchschnittliche Länge der flexiblen Loop-Regionen bestimmt, die in Aqua(glycero)porinen vorkommen [226]. Dabei stellte sich heraus, dass Loop E (welcher Trp 219 enthält) in Aquaglyceroporinen durchschnittlich um 10 Aminosäuren länger ist als in Aquaporinen und dass Loop C sogar um

10-17 Aminosäuren verlängert ist. Diese erweiterten Bereiche tragen zu der potenziellen Entstehung einer strukturellen Asymmetrie in den Aquaglyceroporin-Monomeren bei, wie sie auch für GlpF beobachtet werden konnte [137]. Eine Erhöhung der Glycerinaffinität sowie eine erhöhte Glycerin-Flussrate konnten mit Hilfe von Simulationen als eine Ursache für die Ausbildung dieser verlängerten Vestibülbereiche angeführt werden [136,137]. Es wird angenommen, dass durch Ausbildung der asymmetrischen Vestibülregion ein „Trichter“ in Form eines Energieminimums (*energy well*) entsteht, welcher die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme und Translokation von Glycerin auf der periplasmatischen Seite der bakteriellen Membran erhöht [136]. Diese Eigenschaft kann in Zeiten eines erhöhten Glycerinbedarfs von besonderer Wichtigkeit sein [227]. Trp 219 ist allerdings wahrscheinlich auch nicht direkt an dieser erhöhten Glycerinbindung beteiligt, da die hierfür relevanten Bereiche des Aquaglyceroporin-Vestibüls aus hydrophilen Aminosäuren bestehen [136].

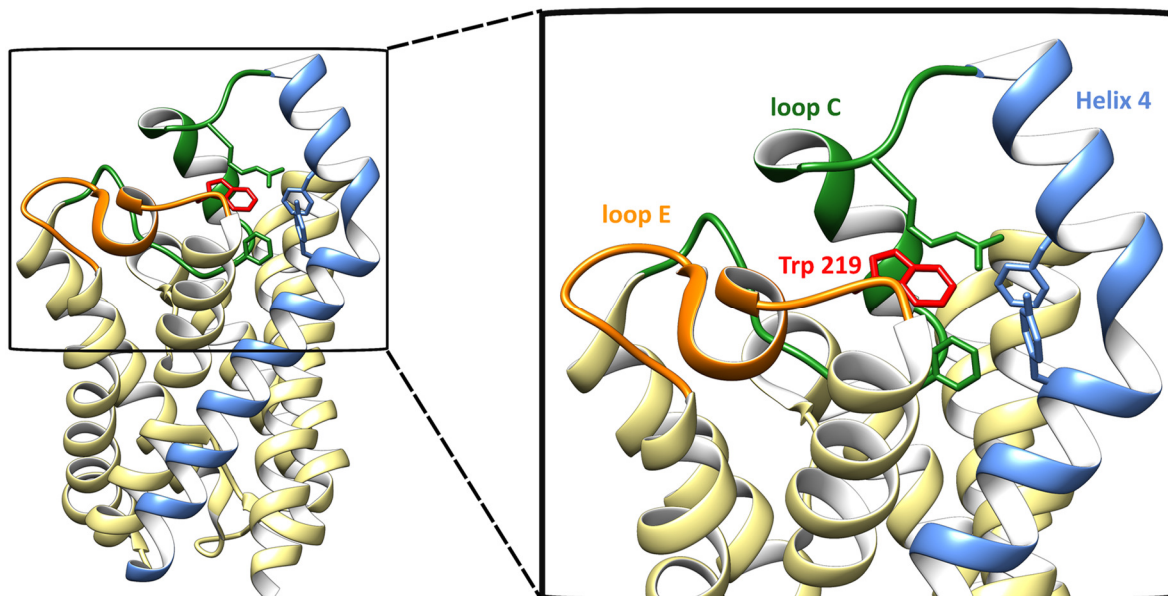


Abbildung 44: Mögliche Rolle von Trp 219 als Verbindung von loop E zu loop C.

Im Gegensatz zu klassischen Aquaporinen ist die Loop C-Region in Aquaglyceroporinen um bis zu 17 Aminosäuren erweitert. Auch Loop E ist in Aquaglyceroporinen erweitert und enthält das hoch konservierte Trp 219, welches mit seiner funktionalen Gruppe in räumlicher Nähe zu Loop C steht. Die Wechselwirkung von Trp 219 mit Aminosäuren des Loop C oder der damit verbundenen Helix 4 (in grün bzw. blau angezeigt) können für eine Verbindung dieser beiden Loop-Regionen verantwortlich sein. Hierbei würde Trp 219 in GlpF die potenzielle Rolle eines „Ankers“ zur Fixierung beider Loop-Regionen einnehmen (PDB-ID: 1FX8).

Die Erweiterung der Bereiche von Loop C und E ist eine Eigenschaft, die für die meisten Aquaglyceroporine charakteristisch ist [226]. Mittels MD-Simulationen wurden mögliche Interaktionen der Loops C und E für GlpF und für das Aquaporin AQP1 beobachtet. Über einen Simulationszeitraum von 100 ns wurden zwischen den Loops C und E im Schnitt die Ausbildung

von 1,78 Wasserstoffbrücken in GlpF, und lediglich 0,44 Wasserstoffbrücken in AQP1 ausgebildet [226]. Dies deutete auf eine Wechselwirkung der beiden Loops hin, die besonders durch die erweiterten Loop-Regionen gefördert wird [226]. Da Trp 219 in der erweiterten Loop E-Region hoch konserviert ist, könnte es als „Anker“ bei der Fixierung der beiden flexiblen Loops C und E eine Rolle spielen (Abbildung 44).

Eine Wechselwirkung von Loop C mit dem Arginin des Selektivitätsfilters konnte im *Plasmodium falciparum* Aquaglyceroporin PfAQP nachgewiesen werden [228]. Auch bei Mutationen innerhalb der Loop C-Region von PfAQP wurden Auswirkungen auf die Aktivität des Aquaglyceroporins postuliert. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte Loop C Einfluss auf die Aktivität von Aquaglyceroporinen im Allgemeinen und im Speziellen auch auf die Aktivität von GlpF nehmen. Die substratregulierende Fähigkeit von Loop-Regionen wurde für einige pflanzliche Aquaporine bereits belegt [229,230]. Punktmutationen im Loop C des *Leishmania major* Aquaglyceroporins LmAQP1 und des *Plasmodium falciparum* Aquaglyceroporins PfAQP führten zu einer Änderung der Permeabilität beider Proteine [231,232]. Diese Funktion könnte auch für GlpF und dessen Loop C zutreffen. Loop E sowie Trp 219 könnten in diesem Zusammenhang auch für Loop C von Bedeutung sein.

5.2.2 Ein Aminosäurecluster um Trp 219 stabilisiert das GlpF-Vestibül

Die Relevanz von Trp 219 für die Stabilität des GlpF-Tetramers sowie seine besondere Rolle in der Vestibülregion wurde in den vorigen Kapiteln bereits diskutiert. Welche genauen Wechselwirkungen dabei eine Rolle spielen, wurde in Kap. 4.2 beschrieben. Trp 219 weist mit seiner funktionellen Gruppe in das GlpF-Monomer und kann somit Wechselwirkungen mit den umgebenden Aminosäuren eingehen. Aufgrund seines Indolsubstituenten kann Trp 219 π - π -Wechselwirkungen mit anderen aromatischen Aminosäuren in seiner Umgebung eingehen. Diese können in π - π -Stapel-Wechselwirkungen (π -stacking oder *face-to-face*) und T-förmige *edge-to-face*-Wechselwirkungen unterteilt werden, wobei letztere, zusammen mit parallel (*offset-stacking*) oder schräg (*herringbone stacking*) [233] zueinander versetzten aromatischen Seitenketten, in Proteinen häufiger auftreten [74]. Diese Wechselwirkungen treten in Proteinen in der Regel innerhalb eines Radius von 7 Å auf [196–198,217]. Drei aromatische Aminosäuren in der Umgebung von Trp 219 fallen nach einer Distanzanalyse (mittels UCSF Chimera) in diesen Radius: Tyr 105, Phe 112 und Phe 135 (Abbildung 45). Darüber hinaus befindet sich Trp 219 in räumlicher Nähe zur Arg 123, mit dem es mögliche Kation- π -Wechselwirkungen eingehen kann [77,234] (Abbildung 45, grün). Alle untersuchten Aminosäuren beeinflussten die Quartärstruktur von GlpF, wie in Kap. 4.2 bereits gezeigt worden ist. Deshalb soll die potenzielle Wechselwirkung dieser Aminosäuren mit Trp 219 hier genauer diskutiert werden. Dabei steht ihre allgemeine Relevanz

als Interaktionspartner von Trp 219 (oder der an entsprechender Position äquivalenten Aminosäure) in GlpF und in anderen Aquaglyceroporinen im Fokus.

Die Zentren der aromatischen Ringe von Phe 112 und Phe 135 haben eine Distanz von 5,9 Å bzw. 5,4 Å zum Trp 219-Ring, sind aber nicht im idealen Winkel zwischen 30° und 90° zu Trp 219 ausgerichtet [75]. Dennoch kommen sie als potenzielle Interaktionspartner für Trp 219 in Frage. Im Gegensatz zu Phe 135 ist Phe 112 in anderen Aquaglyceroporinen nicht hoch konserviert und wird häufiger durch andere hydrophobe Aminosäuren ersetzt (Abbildung 63, Anhang). Der Austausch von Phe 112 zu Ala zeigte entsprechend eine verhältnismäßig schwache Auswirkung auf die Aktivität von GlpF. Phe 112 stellt demnach einen möglichen, im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Aminosäuren jedoch weniger relevanten Interaktionspartner für Trp 219 dar.

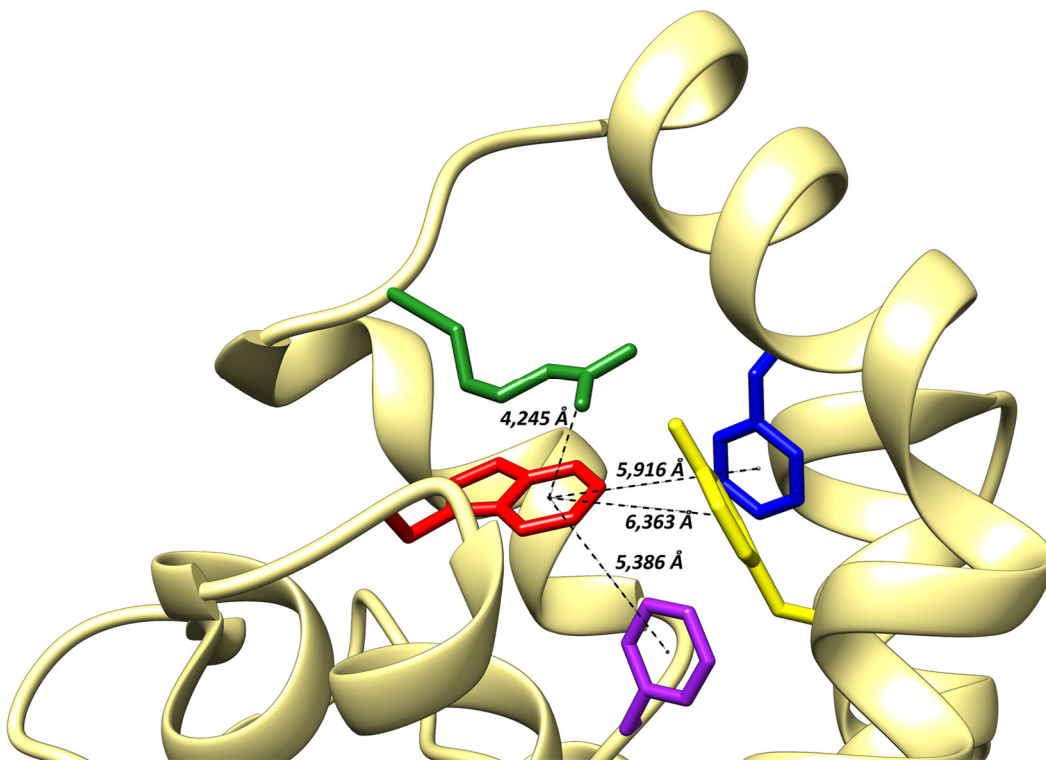


Abbildung 45: Mögliche Interaktionspartner von Trp 219.

Distanzen zwischen Trp 219 (rot) und seinen potenziellen Interaktionspartnern Tyr 105 (gelb), Phe 112 (blau), Arg 123 (grün) und Phe 135 (violett) (PDB-ID: 1FX8).

Die Variante GlpF F135A konnte sowohl in BL21(DE3)-, als auch in SK 46-Zellen nicht exprimiert werden. Dies spricht für die wichtige Rolle von Phe 135 für die Struktur und Funktion von GlpF, da die mutierte Variante in diesem Fall bereits bei der Expression vermutlich abgebaut wird. Phe 135 ist in Aquaglyceroporinen hoch konserviert und nimmt eine wichtige Rolle im Loop C der Translokationspore von Aquaglyceroporinen ein [235]. Daher ist Phe 135 bei Weitem nicht nur als potenzieller Partner von Trp 219 von Bedeutung für GlpF, sondern auch für die Durchflussaktivität von GlpF relevant. Weil keine Aussage über die Wechselwirkung von Phe 135 mit Trp 219

gemacht werden kann, soll hier ein struktureller Vergleich mit dem einzigen strukturell aufgelösten Aquaglyceroporin (neben GlpF), PfAQP aus *Plasmodium falciparum* (PDB-ID: 3C02) durchgeführt werden. Als eine der wenigen Ausnahmen besitzt PfAQP anstelle eines Tryptophans ein Tyrosin an der zu Trp 219 äquivalenten Position. Anstelle eines Phenylalanins ist an der Phe 135-äquivalenten Position ein Tryptophan (Trp 124) positioniert. Auch Trp 124 ist wichtig für die Funktion von PfAQP und wechselwirkt über Wasserstoffbrücken mit Arg 196, welches die Passage von Wasser durch die Pore reguliert [228,232]. Demnach könnte eine Wechselwirkung von einem Tryptophan mit einem Phenylalanin oder Tyrosin an den Positionen 219 und 135 (bzw. an den Positionen 208 und 124 in *P. falciparum*) relevant sein, um die Stabilität beider Proteine zu gewährleisten.

GlpF Y105A ist eine ähnlich destabilisierte Variante von GlpF wie GlpF W219A und weist eine ebenso schwache Durchflussaktivität auf. In vielen anderen Aquaglyceroporinen ist Tyr 105 durch Phenylalanin ersetzt (Abbildung 63, Anhang), was auf eine aromatische Wechselwirkung dieser Aminosäure mit Trp 219 hindeutet. Arg 123 hingegen bildet potenzielle Kation- π -Kontakte mit Trp 219 aus. Die Strukturanalyse zeigt zudem, dass Arg 123 und Tyr 105 vermutlich auch miteinander über eine Wasserstoffbrücke verbunden sind und somit zusätzliche Kontakte zueinander ausbilden, welche die Region um Trp 219 partiell stabilisieren könnten. Tyr 105 ist in den Aminosäuresequenzen anderer Organismen hoch konserviert und wird in nur einigen Aquaglyceroporinen durch Phenylalanin ersetzt. Da Arg 123 in Loop C lokalisiert ist und dieser sich in PfAQP (PDB-ID: 3C02) strukturell von dem in GlpF unterscheidet, lassen sich nur bedingt allgemeine Aussagen zur Relevanz von Arg 123 an der entsprechenden Position in Aquaglyceroporinen machen. Dennoch könnten die Interaktion von Arg 123 mit Trp 219 relevant für die Stabilität von GlpF sein.

5.2.3 Zur Funktion von Tryptophan 219 in GlpF

Obwohl Trp 219 in nahezu allen bekannten Aquaglyceroporinen hoch konserviert ist, gilt dies weitestgehend nicht für die Aminosäuren in seiner Umgebung, die als mögliche Wechselwirkungspartner zur Verfügung stehen. So wenig, wie ein konserviertes Tetramerisierungsmotiv an den Grenzflächen der einzelnen Monomere gefunden werden konnte [219], so wenig scheint auch die Interaktion von Trp 219 mit einem spezifischen Interaktionspartner konserviert zu sein. Diese Beobachtung konnte auch bei den translokationsrelevanten Aminosäuren der Substratpore aller Aquaglyceropore gemacht werden [235]. Analog zum individuellen Tetramerisierungsmotiv ist der Bereich um Trp 219 in den entsprechenden Aquaglyceroporinen individuell ausgestattet und kann daher nicht auf bestimmte Aminosäuren eingegrenzt werden. Dennoch scheint Trp 219 aromatische und weitestgehend

hydrophobe Aminosäuren in seiner Umgebung zu benötigen, die in Aquaglyceroporinen innerhalb dieser Grenzen variieren können.

Durch die potenzielle Wechselwirkung mit Loop C könnte das hochkonservierte Tryptophan 219 auf Loop E für die Fixierung beider Loop-Regionen im GlpF-Vestibül von Bedeutung sein. Trotz der Notwendigkeit weiterer Experimente kann die hypothetische Rolle von Trp 219 möglicherweise auf Aquaglyceroporine im Allgemeinen ausgeweitet werden.

5.3 Zur Untersuchung der SDS-induzierten Entfaltung von GlpF unter „quasi“-Gleichgewichtsbedingungen

Eine einführende Analyse der Entfaltung von GlpF in gemischten DDM/SDS-Mizellen auf mehreren Strukturebenen wurde bereits von Veerappan *et al.* durchgeführt und in diesem Zusammenhang die Monomersierung des GlpF-Tetramers über ein stabiles dimeres Intermediat nachgewiesen [167]. Daran anknüpfend, wurden in dieser Arbeit weitere Experimente zur SDS-induzierten Entfaltung von GlpF durchgeführt und um neue Analysemethoden und Mutationsstudien erweitert.

5.3.1 Die Entfaltung von GlpF ist unter den gegebenen Bedingungen nicht reversibel

Der entfaltete Zustand eines Proteins befindet sich im Gleichgewicht, wenn über einen definierten Zeitraum keine Signaländerung beobachtet werden kann [236]. Dieser Zeitraum kann je nach Protein stark variieren, der grobe Richtwert bei der (Ent)faltung eines Proteins umfasst allerdings das Fünffache der Halbwertszeit der jeweiligen Signaländerung [202]. Im Fall von GlpF wurde die Änderung der mittleren Wellenlänge über einen weitaus größeren Zeitraum beobachtet (bis zu 12 h, siehe Abbildung 29 B), wobei für den GlpF wt nach 7 h keine weitere Signaländerung mehr beobachtet werden konnte. Für diesen Zeitpunkt wurde ein chemisches Gleichgewicht für die Entfaltung von GlpF angenommen, das sich unter den gegebenen Bedingungen einstellt und nicht mehr verändert. Ausgehend von diesem Zustand wurden die Rückfaltungsexperimente an GlpF durchgeführt. Dabei wurde eine Hysterese zwischen der Ent- und Rückfaltung sowohl der Tertiär- als auch der Quartärstruktur von GlpF beobachtet. Die Ent- bzw. Rückfaltung von GlpF ist unter den gegebenen Bedingungen folglich nicht reversibel. Diese ist jedoch für die Bestimmung thermodynamischer Größen der Entfaltung von GlpF essenziell. Aufgrund der fehlenden Reversibilität wurde in dieser Arbeit nur eine qualitative Untersuchung der Entfaltung von GlpF unter „quasi“-Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt und der Verlauf der Entfaltung mit dem anderer GlpF-Varianten verglichen.

Basierend auf dem Faltungstrichter-Modell (Abbildung 6) begründet sich das Aufkommen einer Hysterese durch die Existenz einer „rauen“ Energielandschaft, die – im Gegensatz zur Entfaltung – bei der Rückfaltung auf höhere Energiebarrieren trifft, die nicht auf gleichem Weg überwunden werden können. Aus diesem Grund ist der Verlauf der Rückfaltungskurve von GlpF im Gegensatz zur Entfaltungskurve zu geringeren χ_{SDS} verschoben (Abbildung 37). Dies äußert sich bei GlpF auf beiden Strukturebenen (Tertiär- und Quartärstruktur). Die Ursache für diese Energiebarriere kann dabei unterschiedlich begründet sein: Die häufigste Ursache der irreversiblen (Ent)faltung *in vitro*

ist die Ausbildung von Aggregaten, die besonders bei höheren Temperaturen und Proteinkonzentrationen auftritt [237]. Im Fall von GlpF konnte eine Abhängigkeit der Proteinkonzentration von der Entfaltung der Quartärstruktur – zumindest im Rahmen der durchgeführten Experimente – allerdings ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 62, Anhang).

Nach dem Stand von 2014 wurden bis zu 90 Membranproteine erfolgreich *in vitro* ent- und wieder zurückgefaltet [238]; nur die wenigsten unter ihnen konnten allerdings reversibel entfaltet werden. Unter diesen Membranproteinen ist kein Mitglied der Aqua(glycero)porin-Familie vorhanden, was auf eine mögliche besondere Beschaffenheit bzw. eine mögliche besondere Bedingung zur reversiblen Faltung dieser Proteinfamilie *in vitro* zurückgeführt werden kann. Diese Beschaffenheit kann an Eigenschaften der Aquaglyceroporin-Umgebung *in vivo*, beispielsweise an die Eigenschaften einer Membran (z.B. pH-Wert, Ladung, Lipidzusammensetzung) gekoppelt sein [201]. So konnte durch die Anpassung der pH-Umgebung sowie der Proteinkonzentration die Hysterese zwischen Ent- und Rückfaltung des β -Fasses OmpLA in DLPC-Membranen aufgehoben werden [201]. Auch das Immobilisieren eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors auf einer festen Matrix (Nickel-Affinitätsmatrix) hat dessen reversiblen Rückfaltung ermöglicht [239].

Eine weitere mögliche Ursache der beobachteten Hysterese ist das Fehlen eines Translocons bzw. einer Translocon-ähnlichen Proteinumgebung für die richtige (Rück)faltung von GlpF. Obwohl für viele Membranproteine gezeigt wurde, dass im Rahmen einer sog. zellfreien Expression die Präsenz eines Translocons nicht zwangsläufig notwendig ist [240], haben *in vivo*-Untersuchungen der Faltung von AQP1 und AQP4 eine starke Interaktion der bereits synthetisierten Aquaporin-Helices mit dem Translocon gezeigt [241,242]. Noch vor der vollständigen Synthese und Membranintegration findet ein „Ausklappen“ der TM-Helix 2 von AQP4 in den Intrazellulärraum des Endoplasmatischen Reticulums statt, welche erst nach Synthese aller Helices wieder ins Translocon integriert wird. Die Faltung von AQP1 weist wiederum einen anderen Ablauf auf. Möglicherweise ist die Faltung und dementsprechend die Rückfaltung von GlpF auf eine komplexere Umgebung angewiesen, die das Translocon als „Faltungshelfer“ benötigt und dem die einfache Mizellenumgebung zur korrekten (Rück)faltung nicht genügt. Diesen Ansatz würde das Drei-Stufen-Modell (siehe Kap. 1.2.3) von GlpF nicht beschreiben, sondern vor Membraninsertion die Wechselwirkung mit einem Translocon benötigen.

Die Art der Entfaltung von GlpF über SDS ist ebenfalls ein Faktor, der in einer Hysterese im Verlauf zwischen Ent- und Rückfaltung resultieren kann. Untersuchungen zur Änderung der Struktur eines Membranproteins unter Einfluss von SDS legen nahe, dass SDS als Konkurrent zu bestehenden Interaktionspartnern im Membranprotein auftritt. Dadurch entstehen folglich nicht-native Wechselwirkungen des Membranproteins mit SDS, was in der Entfaltung des Proteins resultiert

[128]. Das Entfernen von SDS bei der Rückfaltung des Proteins führt zu einem Verlust der mit SDS bestehenden Wechselwirkungen, was im entfalteten Protein nicht zwangsläufig zur Wiederherstellung der nativen Kontakte führt [238]. Dieses trifft möglicherweise auch bei GlpF zu, dessen mittlere Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ bei hohem χ_{SDS} nach Rückfaltung nicht mehr mit dem Verlauf der Entfaltung übereinstimmt (siehe Abbildung 37 D). Da diese Abweichung erst nach einer längeren Inkubationszeit stattfindet (vgl. mit Abbildung 37 B), scheint die intensivere Wechselwirkung von SDS mit GlpF in einer entfalteten Variante von GlpF zu resultieren, die durch Entfernen von SDS fluoreszenzspektroskopisch nachweisbar verändert wird. Das ist ungewöhnlich, da trotz Verdünnung der vorhandenen SDS-Anteile in diesem Bereich weiterhin hoch ist. Es sei an dieser Stelle nochmals erwähnt, dass eine Verringerung des Signals durch eine Ausbildung von Aggregaten weitestgehend ausgeschlossen werden konnte (siehe Abbildung 62, Anhang). Vermutlich wurde durch die Verdünnung das SDS an strukturell relevanten Positionen in GlpF entfernt, die zu einer Neuordnung des Proteins geführt haben. Auch bei dieser Rückfaltung kann nicht ausgeschlossen werden, dass die rückgefaltete Version von GlpF nicht aktiv ist und damit dem nativen Zustand nicht entspricht. Die Geschwindigkeit der Verdünnung von SDS sowie die Interaktion mit dem umgebenden DDM können ebenfalls eine Rolle bei der Rückfaltung von GlpF spielen.

Die Entfaltung von GlpF ist unter den in dieser Arbeit durchgeführten Bedingungen nicht reversibel. Die gewonnenen Ergebnisse wurden daher (nur) für eine qualitative Analyse der Stabilität von GlpF verwendet.

5.3.2 Die Entfaltung löslicher Bereiche des GlpF-Vestibüls ist potenzielle Ursache für die Umgebungsänderung von Trp 219

Die Experimente in Kap. 4.3.6 zeigen, dass die Verschiebung von $\langle\lambda\rangle$ auf einer strukturellen Änderung der Umgebung von Trp 219 beruht. Durch Messungen konnte gezeigt werden, dass das Emissionsspektrum von GlpF und somit auch der Wert von $\langle\lambda\rangle$ nicht zu gleichen Teilen aus der Fluoreszenz der fünf in GlpF enthaltenen Tryptophane zusammengesetzt ist (siehe Fluoreszenzspektren Abbildung 64, Anhang). Die beobachtete Signaländerung der mittleren Wellenlänge von GlpF ist folglich auch nicht auf die Entfaltung der gesamten Struktur von GlpF zurückzuführen, sondern stellt wahrscheinlich eine partielle Entfaltung der Tertiärstruktur von GlpF dar. Eine strukturelle Änderung anderer Bereiche von GlpF kann zwar ebenfalls stattfinden, wird aber wahrscheinlich von dem Hauptsignal von $\langle\lambda\rangle$ überlagert oder resultiert nicht in der Änderung der Polarität und ist daher spektroskopisch nicht erfassbar.

Die Umgebung von Trp 219 zeichnet sich besonders durch die beiden periplasmatischen löslichen Loop-Regionen von Loop C und Loop E aus. Trp 219 ist in Loop E lokalisiert und dem gegenüberliegenden Loop C und dessen Umgebung zugewandt (Abbildung 46). Die Entfaltung einer dieser beiden Loop-Regionen unter Einfluss von SDS stellt eine mögliche Ursache für die beobachtete Verschiebung von $\langle\lambda\rangle$ dar. Die Entfaltung von Loop C könnte in der Exposition von Trp 219 in eine hydrophilere Umgebung resultieren, die eine Änderung seiner Fluoreszenz zur Folge hat. In ähnlicher Weise könnte aber auch eine Entfaltung von Loop E unter Einfluss von SDS für die beobachtete Änderung verantwortlich sein.

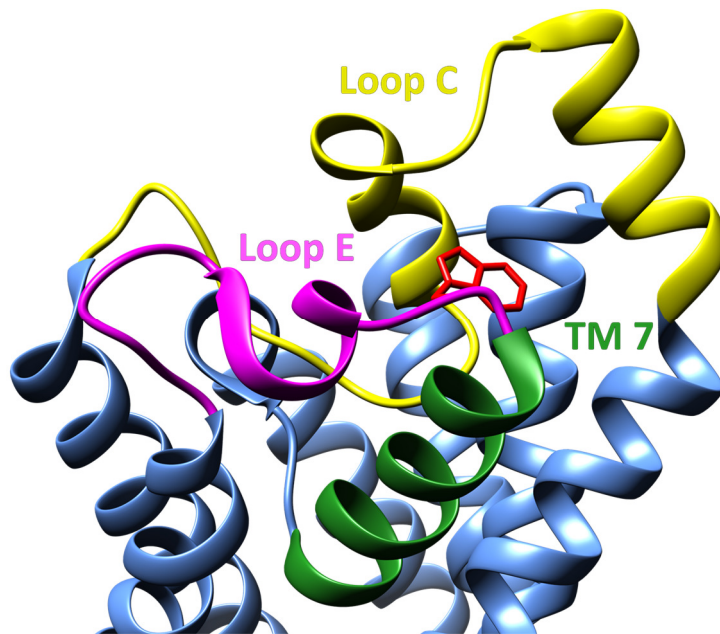


Abbildung 46: Entfaltung löslicher Bereiche um Trp 219 in der periplasmatischen Vestibülregion von GlpF.

Die Verschiebung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ konnte der Entfaltung der Umgebung von Trp 219 (rot) zugeordnet werden. Trp 219 ist in der periplasmatischen Vestibülregion verortet, befindet sich in einer löslichen Loop-Region (Loop E, pink), die mit der Halbhelix TM 7 (grün) verbunden ist. Trp 219 ist von Loop C und seinen angrenzenden löslichen Bereichen umgeben (gelb). Die Zugabe von SDS resultiert in der potenziellen Entfaltung einer dieser Loop-Regionen bzw. der flexiblen Halbhelix TM 7 von GlpF. Trp 219, welches im nativen Zustand durch das hydrophobe Umfeld von Loop C geschützt ist, befindet sich durch die Entfaltung in einem hydrophileren Milieu. Dies wird durch die bathochrome Verschiebung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ detektiert. PDB-ID: 1FX8.

Die Resultate der durchgeführten Experimente aus Kap. 4.3.6 sollen in diesem Kontext ebenfalls interpretiert werden: Die Verschiebung von $\langle\lambda\rangle$, die aus der potenziellen Entfaltung einer Loop-Region resultiert, findet in der Variante GlpF W219F statt, ist aber durch das Fehlen des Trp 219 fluoreszenzspektroskopisch nicht zu verfolgen (Abbildung 34). Auch bei der Variante GlpF Y105A ist die markante Änderung von $\langle\lambda\rangle$ nicht zu beobachten, da diese Variante wahrscheinlich eine bereits entfaltete Loop-Region besitzt. Da Tyr 105 sich in der Nähe von

Trp 219 befindet und Teil eines stabilisierenden Aminosäureclusters um Trp 219 ist (siehe Kap. 5.2.2), kann das Fehlen dieser Aminosäure in einer GlpF-Variante mit entfalteter Loop-Region resultieren. Diese Beobachtungen bestärken auch die postulierte Rolle von Trp 219 für die Stabilisierung der Loop C-Region des Vestibüls von GlpF (Kap. 5.2.2). Darüber hinaus würde die Entfaltung einer Loop-Region zu der Beobachtung passen, dass die Änderung der Tertiärstruktur bereits im Monomer und unabhängig vom oligomeren Zustand von GlpF stattfindet (siehe Kap. 4.3.5).

Die Flexibilität von Loop C wurde bereits im Zusammenhang mit einer regulatorischen Funktion für andere Aquaglyceroporine vermutet [231,243,244]. Laut den Ergebnissen durchgeführter MD-Simulationen ist Loop C in einigen Aquaglyceroporinen über die Vestibülregion dennoch rigide verankert (z.B. [245], diese Arbeit). Durch seine dem löslichen Milieu zugewandte Position könnte Loop C allerdings für die Destabilisierung mittels SDS besonders zugänglich sein. Über genauere Untersuchungen zur Dynamik von GlpF mittels H/D-Austausch ist dabei die Halbhelix TM 7 in den Fokus gerückt, die im Gegensatz zu anderen Transmembransegmenten eine schnelle Deuterierung aufwies [246]. Dieser Hinweis auf ein mobiles Strukturelement könnte auch im Zusammenhang mit der potenziellen Entfaltung der Loop-Regionen von GlpF stehen: Da TM 7 mit Loop E in Verbindung steht (Abbildung 46), könnte die dynamische lokale Struktur dieser Halbhelix auch zur schnelleren Destabilisierung dieses Bereiches unter Einfluss von SDS beitragen und in einer Entfaltung der Loop E-Region resultieren. Da die Zugänglichkeit dieser mobilen Region auch für SDS erhöht sein könnte und flexible Bereiche in der Regel einfacher destabilisiert werden können [247], könnte die Entfaltung von TM 7 und dementsprechend von Loop E ebenso für die Umgebungsänderung von Trp 219 verantwortlich sein. Dies würde auch im Einklang mit dem beobachteten Rückgang der α -helikalen Struktur von GlpF stehen, der bei dem gleichen SDS-Molenbruch wie die Änderung der Tertiärstruktur stattfindet.

Die beobachtete Tertiärstrukturentfaltung der Umgebung von Trp 219 ist wahrscheinlich auf die Strukturänderung löslicher Bereiche um Trp 219 zurückzuführen. Diese können von der Entfaltung des Loops C, des Loops E, und der mit ihm verbundenen mobilen Halbhelix TM 7 stammen.

5.3.3 Die SDS-induzierte Entfaltung von GlpF ist ein mehrstufiger Prozess

5.3.3.1 Die Strukturebenen von GlpF weisen unterschiedliche Stabilitäten auf

Die SDS-induzierte Entfaltung von GlpF wurde in Kap. 4.3 hinsichtlich seiner Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur untersucht. Abbildung 47 fasst die in Kap. 4.3 beschriebenen Ergebnisse zusammen. Die gezeigten Ergebnisse entstammen den Messungen, die nach einer einstündigen

Inkubation von GlpF mit SDS durchgeführt wurden. Nach dieser Inkubationszeit befindet sich GlpF allerdings nicht im Gleichgewicht, da weiterhin eine Signaländerung in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet werden kann (Kap. 4.3.2). Die Verwendung der Resultate dieser unterbrochenen Messungen war notwendig, um Änderungen zwischen den verschiedenen untersuchten Varianten von GlpF erfassen zu können. Aus diesem Grund können die hier gemachten Angaben der SDS-Molenbrüche nicht als Absolutwerte verwendet werden, sondern dienen nur zur besseren Orientierung und Zuordnung in diesem Kapitel. Dementsprechend zeigt das in diesem Kapitel vorgeschlagene Entfaltungsschema von GlpF (Abbildung 48) die relative Abfolge der Destabilisierung der unterschiedlichen Bereiche des Proteins auf, ohne diese eindeutigen SDS-Molenbrüche zuzuordnen. Auch hierbei handelt es sich um Messungen, die unter „quasi“-Gleichgewichtsbedingungen stattfinden.

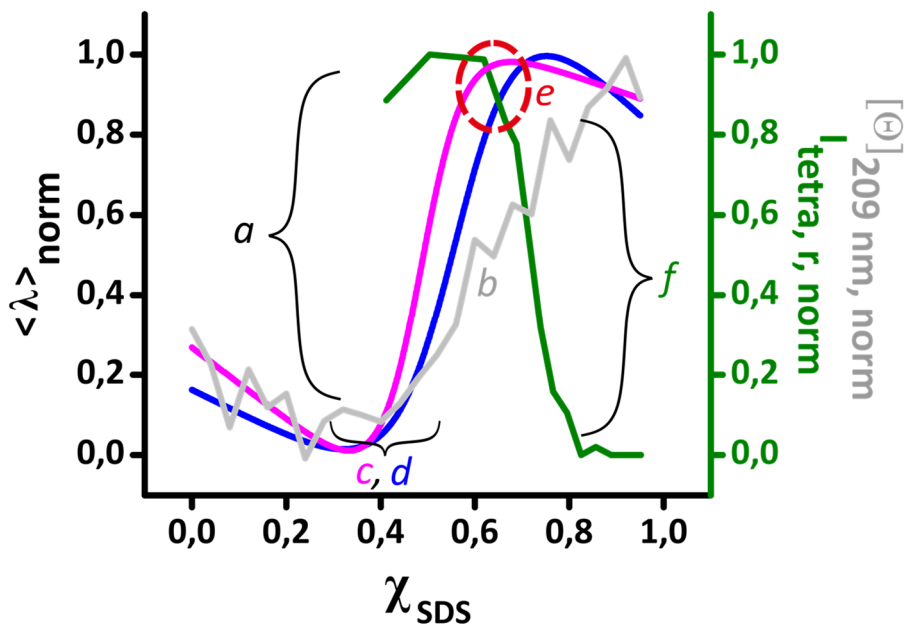


Abbildung 47: Resultate zur Entfaltung von GlpF unter „quasi“-Gleichgewichtsbedingungen zusammengefasst in einem Diagramm.

Die gezeigten Graphen weisen auf Merkmale oder Besonderheiten hin, die bei den Entfaltungsmessungen in Kap. 4.3 beobachtet werden konnten. Diese wurden interpretiert und entsprechend der oben gezeigten alphabetischen Reihenfolge in einem Schema zusammengefasst (Abbildung 48). Gezeigt sind die Resultate der Messungen, die nach einer einstündigen Inkubation von GlpF mit SDS erfolgten. Zur besseren Veranschaulichung sind die Verläufe der Graphen zum Teil normiert dargestellt und die Fehlerbalken nicht gezeigt. **a**: Verschiebung der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ (blau, pink) als Indiz für die Änderung der Tertiärstruktur um Trp 219. **b**: Änderung der molaren Elliptizität bei 209 nm als Maß für die Sekundärstrukturentfaltung α -helikaler Regionen von GlpF. Die Änderung des Signals ist allerdings gering (siehe Abbildung 30 A). **c, d**: Unterschiedliche Verläufe von **a** innerhalb der verschiedenen Tryptophanvarianten von GlpF. Gezeigt ist hier der gefittete exemplarische Verlauf jeweils einer Variante aus beiden Gruppen, in die die unterschiedlichen Verläufe eingeteilt werden konnten (pink: GlpF W48F, blau: GlpF wt). Die zwei Gruppen lassen sich den strukturellen Bereichen der Tetramerperipherie und der des Tetramerkerns zuordnen. Demnach findet eine Destabilisierung von GlpF von der

Tetramerperipherie (pink, **c**) in Richtung des Tetramerkerns (blau, **d**) statt. **e**: Zustand, in dem die Tertiärstrukturentfaltung von **a** abgeschlossen ist und die Dissoziation des GlpF-Tetramers einsetzt. Hier wird die Akkumulation eines Intermediats vermutet, welches als Tetramer vorliegt, aber eine partiell entfaltete Sekundär- und Tertiärstruktur besitzt. **f**: Abnahme der Intensität der Bande, die im Acrylamidgel dem GlpF-Tetramer entspricht, als Indiz für die Dissoziation des GlpF-Tetramers.

Der erste Übergang beschreibt GlpF die Entfaltung des nativen Zustandes in ein tetrameres Intermediat bei $\chi_{\text{SDS}} = 0,6 - 0,62$. Diese Änderung findet im GlpF-Tetramer statt und beinhaltet die partielle strukturelle Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur (**a**, **b**). Die Änderung ist vermutlich partiell, da diese nur der Änderung der Umgebung von Trp 219 zugeordnet werden kann. Wie in Kap. 5.3.2 beschrieben, zeigt dieser Übergang möglicherweise die Entfaltung einer löslichen Loop-Region von GlpF. Die mit der Änderung der Tertiärstruktur einsetzende Entfaltung der α -helikalen Sekundärstruktur (**b**) von GlpF setzt sich bei ansteigenden χ_{SDS} linear fort und ist im Verhältnis zu den großen Änderungen der Tertiärstruktur von GlpF marginal (zu sehen in Abbildung 30 A). Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der hohen Stabilität, die α -Helices in Lipid- und lipidähnlichen Umgebungen erfahren. Obwohl SDS in löslichen Proteinen massive strukturelle Änderungen induzieren kann, wirkt es als Detergenz weitestgehend stabilisierend auf die Sekundärstruktur der Transmembranbereiche α -helikaler Membranproteine [126,128,248]. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Änderung der Sekundärstruktur die parallele Umstrukturierung möglicher löslicher Bereiche von GlpF dokumentiert, die sich darüber hinaus nach der Entfaltung der Loop-Region von GlpF fortsetzt.

Die Dissoziation des GlpF-Tetramers (**f**) verläuft über die Akkumulation eines dimeren Intermediats [167]. Ein dimeres Entfaltungsintermediat konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden (Abbildung 16 A) was die Ergebnisse von [167] bestätigt. Die Ausbildung dieses Intermediats stand in dieser Arbeit jedoch nicht im Fokus. Aus diesem Grund wurde der Übergang zum dimeren und monomeren Zustand bei der Dissoziation des GlpF-Tetramers impliziert, ohne diese zwei Zustände in dieser Arbeit genauer zu differenzieren.

Die beiden Übergänge **a** und **f** werden durch das Intermediat **e** getrennt, welches ein Tetramer mit partiell entfalteter Tertiärstruktur beschreibt. Ein ähnlicher Zustand, welcher unter ähnlichen Bedingungen zwischen den beiden Übergangszuständen der Tertiärstrukturentfaltung des Membranproteins DGK populiert wird, wurde ebenfalls als Intermediat klassifiziert [127]. Intermediate stellen ausgeprägte, definierte Zwischenzustände bei der (Ent)faltung eines Proteins dar und kennzeichnen relevante, strukturbestimmende Schritte, die das Protein oder dessen Teilbereiche in Richtung eines bestimmten Faltungszustandes „festigen“ [112]. In Bezug auf GlpF stellt hierbei die tetramere Form ein (Entfaltungs)intermediat dar, bei dem die transmembranären und löslichen Tertiärstrukturbereiche allerdings partiell entfaltet sind. Bei der

Faltung von GlpF wird dieses wahrscheinlich zunächst ausgebildet, ehe die vollständige Faltung der Tertiärstruktur abgeschlossen werden kann. Die Resultate basierend auf den Entfaltungsmessungen an GlpF zeigen ebenfalls die Existenz eines Intermediats auf, dessen Tertiärstruktur sich von der Struktur des nativen GlpF-Tetramers unterscheidet. In dieser Hinsicht stimmen die in [167] gewonnenen Erkenntnisse mit den vorherigen Untersuchungen überein. Allerdings wurde dieses Intermediat in [167] dem dimeren Intermediat von GlpF zugeordnet, welches sich nach der Dissoziation des GlpF-Tetramers ausbildet. Durch optimierte Versuchsbedingungen konnte in dieser Arbeit die Entfaltung des Tetramers und des Dimers besser voneinander getrennt und zwischen der Entfaltung der Tertiärstruktur und der Entstehung des GlpF-Dimers genauer unterschieden werden. Liegt in [167] GlpF bereits unter dem Einfluss der minimalen SDS-Konzentration eine Bandenverteilung vor, die dem Tetra-, Di- und Monomer entspricht, so ist im Polyacrylamidgel in Abbildung 16 A unter den gleichen Bedingungen nur eine dem Tetramer entsprechende Bande vorzufinden. Aus diesem Grund kann die Entfaltung der Tertiärstruktur einem Prozess zugeordnet werden, der vor der Dissoziation des Tetramers von GlpF stattfindet.

Die Entfaltung von GlpF verläuft über alle relevanten Strukturebenen. Die (Ent)faltung der Tertiär- und Quartärstruktur von Membranproteinen stellt in vielen Fällen eng gekoppelte Prozesse dar [249,250], die weitestgehend parallel stattfinden. Im Fall von GlpF scheint die Entfaltung dieser beiden Strukturebenen allerdings größtenteils nacheinander abzulaufen: Die partielle Entfaltung der Tertiär- und Sekundärstruktur, die der Entfaltung löslicher Regionen im GlpF-Monomer zugeordnet wird, findet innerhalb des GlpF-Tetramers statt. Dies zeigt, dass die Quartärstruktur eine höhere Stabilität aufweist und unter höheren χ_{SDS} entfaltet, als die Tertiärstruktur des Proteins. Darüber hinaus wird zwischen dem nativen und entfalteten Zustand von GlpF ein Intermediat populiert, das aus einem Tetramer mit partiell entfalteter Sekundär- und Tertiärstruktur besteht.

5.3.3.2 GlpF wird auf löslicher und auf Transmembranebene destabilisiert

Die Graphen (**a**) der unterschiedlichen Varianten von GlpF lassen sich in zwei Gruppen einteilen (**c**, **d**), die den Bereichen der Tetramerperipherie (**c**) und denen des Tetramerkerns (**d**) in GlpF zugeordnet werden können (Abbildung 35 A). Es handelt sich hierbei jedoch nicht um unterschiedliche Verläufe der Entfaltung der destabilisierten GlpF-Varianten. So weist beispielsweise die GlpF-Variante W48F eine zum Wildtyp weitestgehend identische Stabilität auf (siehe Tabelle 21). Der Verlauf von $\langle \lambda \rangle$ besitzt allerdings bei GlpF W48F (**c**) eine stärkere Steigung und erreicht bereits bei niedrigeren χ_{SDS} ein Plateau, als der Graph des GlpF-Wildtyps (**d**) (Abbildung 47). Daher ist der Verlauf des Graphen von GlpF W48F der anderen der zwei Gruppen

zuzuordnen, die nicht dem GlpF-Wildtyp entspricht. Der Anstieg von $\langle \lambda \rangle$ (**a**) kann der Entfaltung löslicher Bereiche von GlpF zugeordnet werden (Kap. 5.3.2). Die abweichenden Steigungen dieses Verlaufes (Abbildung 35 bzw. Abbildung 47) deuten aber darauf hin, dass einige Regionen von GlpF dem destabilisierenden Einfluss des SDS besser bzw. schlechter standhalten können, d.h. stabiler bzw. instabiler sind. Dadurch konnte rekonstruiert werden, welche Bereiche von GlpF bei einer Entfaltungsmessung möglicherweise zuerst dissoziieren (ähnlich zu durchgeführten Experimenten in [251]). Darüber hinaus zeigen die unterschiedliche Steigung der Graphen von $\langle \lambda \rangle$, dass parallel zu der Entfaltung der löslichen Regionen von GlpF eine mögliche Entfaltung oder Umverteilung anderer Regionen, möglicherweise der Transmembranregionen, im GlpF-Tetramer stattfindet.

Die Tatsache, dass die Entfaltungskurven der GlpF-Varianten in zwei Gruppen eingeteilt werden können (Abbildung 47), lässt die sequenzielle Dissoziation definierter Bereiche von GlpF vermuten. Dies spricht für die Entfaltung von Regionen mit kategorisierten Stabilitäten im GlpF-Tetramer, die neben der graduellen Entfaltung löslicher Bereiche um Trp 219 stattfinden. Eine ähnliche Trennung der Entfaltung löslicher und membraninserterter Regionen wurde auch für das Membranprotein Diacylglycerolkinase (DGK) beobachtet, deren beide Übergangphasen über die Analyse der Entfaltung verschiedener Tryptophanvarianten ebenfalls der löslichen und der Transmembranregion zugeordnet werden konnten [127]. Im Fall von GlpF könnte es sich um einzelne Helices oder Helixbündel handeln, deren interhelikale Wechselwirkungen unter aufgelöst werden. Bei den Aquaporinen SoPIP2;1 und AqpZ wurde über Fluoreszenzmarkierung der Proteine mit einem polaritätssensitiven Sensor (Badan) eine Änderung der nativen Zusammensetzung der Transmembransegmente unter Zugabe von SDS beobachtet [252]. Diese durchgeführten Untersuchungen konnten keine Entfaltung und Denaturierung im klassischen Sinne nachweisen; vielmehr fand eine Umstrukturierung der α -helikalen Bereiche durch sukzessive Zugabe von SDS statt [252]. Im Fall von GlpF würde dies für eine schrittweise Dissoziation (d.h. einer Auflösung interhelikaler Wechselwirkungen) oder Umverteilung (d. h. einer Ausbildung neuer, nicht nativer Wechselwirkungen) abgegrenzter Transmembranregionen oder Helices sprechen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die monomere GlpF-Variante W48A, deren Verlauf von $\langle \lambda \rangle$ dem des tetrameren W48F (**c**) und W42A entspricht (Abbildung 35). Erwartungsgemäß hätte der Verlauf der Entfaltungskurve von GlpF W48A zu vergleichsweise kleineren χ_{SDS} verschoben sein müssen, da im GlpF W48A-Monomer Transmembranregionen für SDS zugänglicher sind, die im GlpF-Wildtyp durch das Tetramer geschützt werden. Die Entfaltungskurve verläuft aber unter ansteigenden χ_{SDS} identisch zu den tetrameren Varianten von

GlpF: GlpF W48A weist die gleiche Signaländerung, d.h. die gleiche Entfaltung der Tetramerperipherie von GlpF auf, wie die tetrameren Varianten GlpF W48F und W42A, ohne durch die Einschränkungen seiner monomeren Quartärstruktur beeinflusst zu werden. Demnach weist GlpF bereits als Monomer in einigen Regionen eine hohe Stabilität auf, die sogar der Stabilität einiger tetramerer GlpF-Varianten entspricht. Möglicherweise wird bereits im GlpF-Monomer eine relativ stabile Grundstruktur ausgebildet, die zwar im Zentrum des Tetramers des GlpF-Wildtyps lokalisiert ist, durch die Tetramerisierung aber nicht an Stabilität gewinnt. Ähnliche Beobachtungen konnte bereits für andere Membranproteine gemacht werden [127,185,253] und deuten darauf hin, dass GlpF, ähnlich zu kleinen löslichen Proteinen, möglicherweise stabilere Bereiche im Zentrum des Tetramers besitzt, um die sich das Protein stetig (ent)faltet [254]. Diese Bereiche können einen Faltungskern von GlpF darstellen, der bei vielen Membranproteinen ebenfalls vermutet wird [169,255–258]. Dieser Faltungskern wird wahrscheinlich von den Interaktionsbereichen der GlpF-Monomere gebildet, da diese bereits im Monomer formiert sein müssen, damit die Oligomerisierung von GlpF stattfinden kann. Die Entfaltung dieses Kerns würde unter dem Einfluss höherer χ_{SDS} stattfinden und möglicherweise mit der beobachteten Dissoziation des GlpF-Tetramers einhergehen.

Viele Membranproteine besitzen lösliche Domänen, die unter dem Einfluss denaturierender Substanzen andere Stabilitäten aufzeigen, als ihre Transmembranregionen [109,127,169,259]. Die oben erwähnte parallele Entfaltung oder Umverteilung der Transmembranbereiche von GlpF könnte getrennt von der Entfaltung der löslichen Bereiche stattfinden, aber in Kombination in der Dissoziation des GlpF-Tetramers resultieren. Der Verlauf der Destabilisierung der Tetramerperipherie in Richtung des Tetramerkerns entspricht der Flexibilität bzw. der Rigidität des GlpF-Tetramers. Diese wurde durch den sogenannten B-Faktor bereits an anderer Stelle für GlpF bestimmt [135,167]. Der B-Faktor ist an den löslichen peri- und cytoplasmatischen Bereichen des GlpF-Tetramers am geringsten und nimmt in Richtung der Monomerporen des Tetramers zu (siehe B-Faktor von GlpF, PDB-ID: 1FX8). Die Erhöhung der Stabilität einzelner Untereinheiten ist eine der häufigsten Ursachen für die Ausbildung von oligomeren Membranproteinen [260]. Die bereits hohe Rigidität der Monomere könnte durch die Ausbildung des GlpF-Tetramers begünstigt werden und die Faltung weniger stabiler bzw. flexibler löslicher und Transmembranregionen der Tetramerperipherie ebenfalls begünstigen.

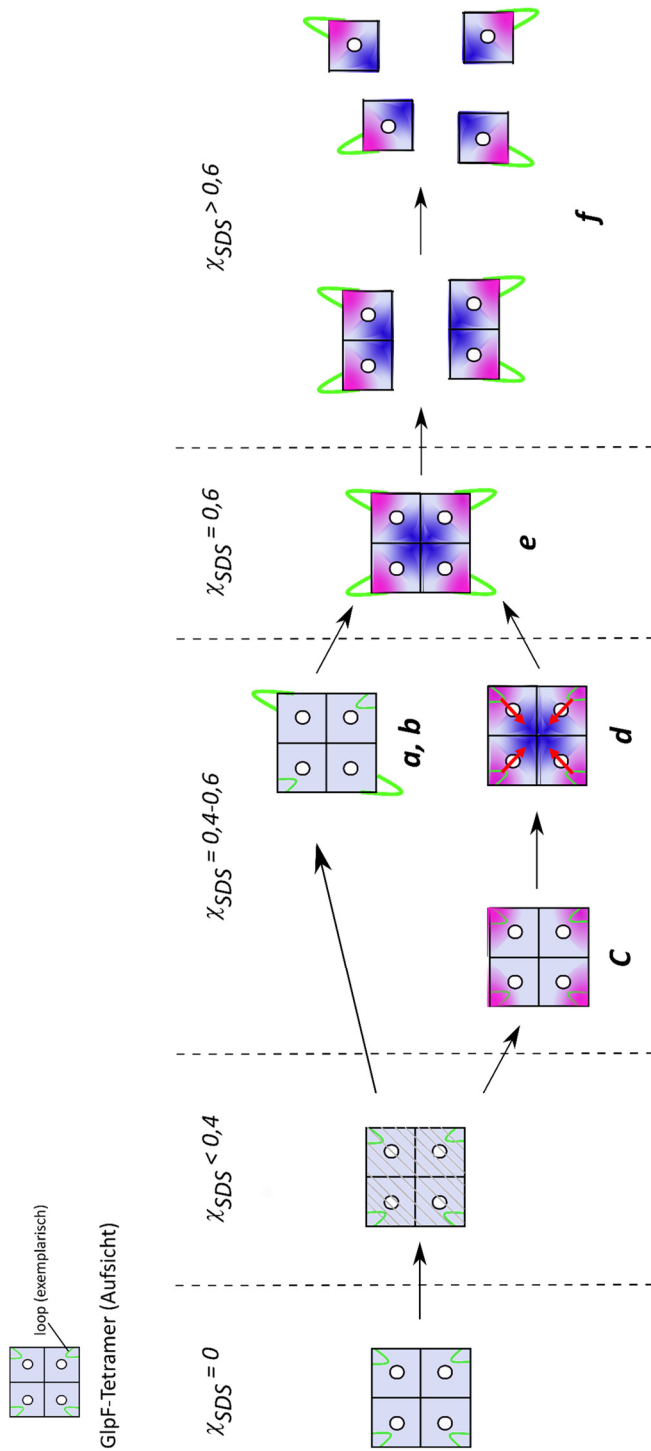


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Destabilisierung und Entfaltung von GlpF unter dem Einfluss von SDS.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine Darstellung in Mizellenumgebung verzichtet. Die angegebenen SDS-Molenbrüche (χ_{SDS}) sind als grobe Richtwerte angegeben. Die in Abbildung 47 gezeigten gemessenen Signaländerungen des GlpF-Wildtyps sowie der unterschiedlichen GlpF-Varianten wurden nach einer Inkubationszeit von einer Stunde durchgeführt (Begründung siehe Kap. 4.3.2). Die Entfaltung von GlpF ist zu diesem Zeitpunkt nicht abgeschlossen. Aus diesem Grund ist die exakte Angabe des SDS-Molenbruchs nicht möglich. Das Schema zeigt somit vielmehr die Abfolge der Destabilisierung der unterschiedlichen strukturellen Bereiche von GlpF bei sukzessiver Zugabe von SDS. Das native GlpF ($\chi_{SDS} = 0$) erfährt bereits unter dem Einfluss geringer χ_{SDS} ($\chi_{SDS} < 0,4$) eine leichte Destabilisierung (siehe Kap. 4.3.3). Ab $\chi_{SDS} = 0,4$ findet die Entfaltung löslicher Loop-Regionen im periplasmatischen Vestibül von GlpF statt (**a**). Unter dem Einfluss derselben χ_{SDS} ist eine leichte Entfaltung der α -helikalen Struktur von GlpF zu beobachten (**b**). Diese kann auf die potenzielle Entfaltung α -helikaler Bereiche zurückgeführt werden, die Teil der löslichen Vestibülregion sind (siehe Abbildung 46). Die Entfaltung der löslichen Loop-Region verläuft parallel zur Entfaltung der Transmembranregionen von GlpF (**c, d**). Diese setzt sich von der weniger stabilen Peripherie (**c**, pink) zum stabileren Kern (**d**, blau) des GlpF-Tetramers fort (roter Pfeil). Die Entfaltung mehrerer Regionen in GlpF resultiert in der Akkumulation eines Intermediats (bei $\chi_{SDS} \sim 0,6$), welches ein Tetramer mit einer partiell entfalteten Tertiärstruktur darstellt (**e**). Unter dem Einfluss größerer χ_{SDS} erfolgt die Dissoziation und Monomerisierung des GlpF-Tetramers (**f**), die über ein dimeres Intermediat verläuft. Nach diesem Schema erfolgt die SDS-induzierte Destabilisierung von GlpF über mehrere Schritte und auf mehreren strukturellen Ebenen.

Die Entfaltung von GlpF findet nicht nur innerhalb der Strukturebenen auf unterschiedliche Weise statt, sondern muss auch im Hinblick auf die löslichen und die Transmembranregionen getrennt betrachtet werden. Dabei findet unter sukzessiver Zugabe von SDS sowohl eine Entfaltung des löslichen GlpF-Vestibüls, als auch die sequenzielle Dissoziation oder Umstrukturierung der Transmembranbereiche von GlpF statt. Diese verläuft von der Peripherie zum Zentrum des GlpF-Tetramers und resultiert auch letztendlich in der Dissoziation des GlpF-Tetramers.

Die in diesem Kapitel beschriebenen und in Abbildung 47 dargestellten Verläufe sind im nachfolgenden Schema zusammengefasst (Abbildung 48). Dieses stellt ein mögliches Modell für die Destabilisierung von GlpF unter dem Einfluss von SDS dar. Gezeigt sind die unterschiedlichen Stabilitäten einzelner Regionen und Strukturbereiche innerhalb des Proteins unter bestimmten χ_{SDS} . Das hier vorgeschlagene Schema soll im Weiteren zur besseren Interpretation der kinetischen Untersuchung der Entfaltung von GlpF herangezogen werden.

5.4 Kinetik der SDS-induzierten Entfaltung von GlpF

Um die möglichen Intermediate auf dem Entfaltungsweg von GlpF zu detektieren, wurden kinetische Untersuchungen an GlpF durchgeführt. Ein Vorteil der kinetischen Untersuchung von GlpF besteht in der zeitlichen Trennung der mizellenbedingten Änderungen von den konformationsbedingten Änderungen der Fluoreszenzintensität. Durch Zugabe von SDS zu dem bereits in Detergenz (DDM) solubilisierten GlpF findet – neben der Interaktion mit dem Protein – auch eine Wechselwirkung mit der Detergenzumgebung statt. Diese wirkt sich auf die resultierende Fluoreszenzintensität aus. Die Interaktion des Proteins mit SDS resultiert in Änderungen der Tryptophanfluoreszenz, die die konformationsbedingten Fluoreszenzänderungen, welche bei der Entfaltung des Proteins auftreten, überlagern. Dieser bekannte Einfluss von SDS-Mizellen auf das Fluoreszenzsignal [43] ist für die beobachtete lineare Abnahme der Trp-Fluoreszenzintensität unter „quasi“-Gleichgewichtsbedingungen verantwortlich. Ausschließlich die Signaländerung aufgrund des linear ansteigenden χ_{SDS} wird hierbei detektiert (siehe Kap. 4.3.1, Abbildung 28) und die Wiedergabe der Konformationsänderung über die Änderung der intrinsischen Fluoreszenzintensität wird somit verhindert. Da die Interaktion des Fluorophors mit der Detergenzumgebung bereits innerhalb weniger Millisekunden (während des Mischvorgangs innerhalb der Totzeit) abgeschlossen ist, kann dieser Prozess mit Hilfe des *Stopped-Flow*-Verfahrens zeitlich von der Entfaltung von GlpF getrennt werden (Abbildung 49). Konformationsbedingte Änderungen der Fluoreszenzintensität bei der Entfaltung von GlpF konnten dadurch in dieser Arbeit beobachtet werden [43] (Abbildung 28).

Die Messung der Entfaltung mit Hilfe der *Stopped-Flow*-Spektroskopie war im Fall von GlpF dennoch mit Einschränkungen verbunden. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis war besonders für den GlpF-Wildtyp sehr gering, weswegen eine Nachjustierung der Amplitude bei jeder Messung vorgenommen werden musste. Aus diesem Grund konnte keine zuverlässige Aufnahme der Amplitude unter dem Einfluss ansteigender SDS-Konzentrationen erfolgen. Die Beobachtung möglicher früher Entfaltungsprozesse unmittelbar nach der Totzeit in der sog. *burst phase* war ebenfalls nicht möglich [261,262]. Zwar ließen sich aufgrund der fehlenden Rückfaltungsmessungen keine thermodynamischen Parameter aus den kinetischen Untersuchungen von GlpF bestimmen, dennoch konnte die Entfaltung von GlpF genauer charakterisiert werden.

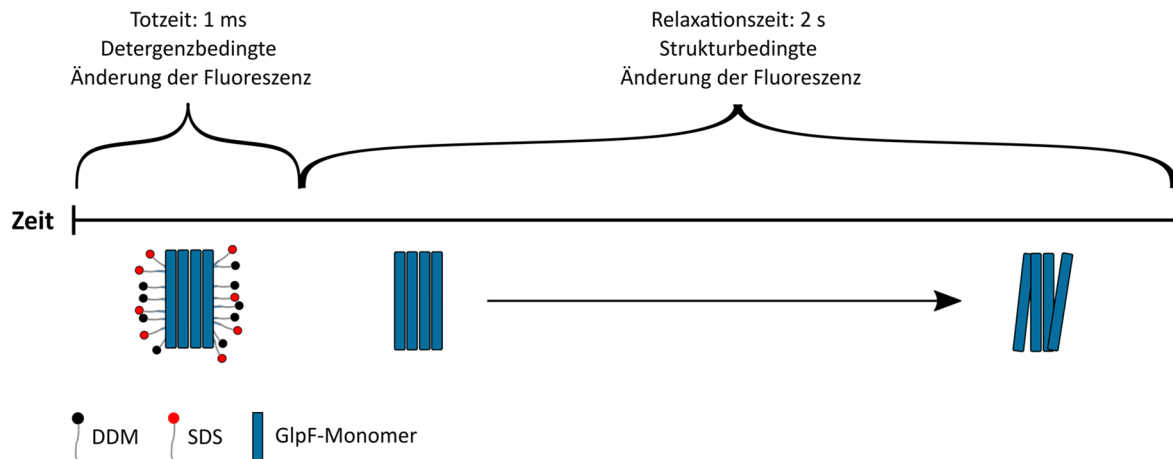


Abbildung 49: Schematische Darstellung der zeitlichen Trennung detergenz- und konformationsbedingter Änderungen der Fluoreszenzintensität nach Vermischen von GlpF und SDS mittels des *Stopped-Flow*-Verfahrens.

Durch die zeitliche Auflösung der Ereignisse nach dem Mischvorgang von GlpF mit SDS kann die Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz durch die strukturelle Änderung von GlpF verfolgt werden. Der maskierende Effekt von SDS auf die Umgebung der GlpF-DDM-Mizellen, schränkt die Beobachtung der strukturellen Änderung von GlpF unter Einfluss von SDS ein (siehe Kap. 4.3.1, Abbildung 28). Dieser findet mit Hilfe der *Stopped-Flow*-Spektroskopie innerhalb der Totzeit statt und kann somit aus dem weiteren Vorgang der Fluoreszenzintensitätsänderung „herausgefiltert“ werden. Änderungen der Fluoreszenzintensität und der Relaxationszeit können somit auf Änderungen der Konformation (beispielsweise der Tertiär- und Quartärstruktur) zurückgeführt werden.

5.4.1 GlpF entfaltet in mehreren Schritten, die unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen

Die beobachteten zeitlichen Signaländerungen lassen sich in drei Phasen einteilen (Abbildung 50). Phase 1 wird mittels *Stopped-Flow*-Spektroskopie über die Änderung der Fluoreszenzintensität nach Vermischen des GlpF-Wildtyps mit SDS beobachtet (Kap. 4.4.1). Die Relaxationszeit dieser Phase liegt bei etwa zwei Sekunden. Phase 2 hingegen konnte über die gleiche Methode lediglich bei zwei Varianten von GlpF (GlpF W48F und GlpF W219F) nachgewiesen werden und besitzt eine langsamere Relaxationszeit, die je nach Variante einen Zeitraum von 30-200 Sekunden beträgt (Kap. 4.4.3). Phase 3 kann über die Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ verfolgt werden (Kap. 4.3.2, Abbildung 29 B). Ihre Relaxation erstreckt sich je nach GlpF-Variante über eine halbe bis zu zehn Stunden. Die kinetische Untersuchung der Entfaltung von GlpF befasst sich hauptsächlich mit den Beobachtungen aus Phase 1, die in Kap. 5.4.2 genauer beleuchtet wird. In diesem Kapitel sollen die Phasen 2 und 3 genauer diskutiert werden.

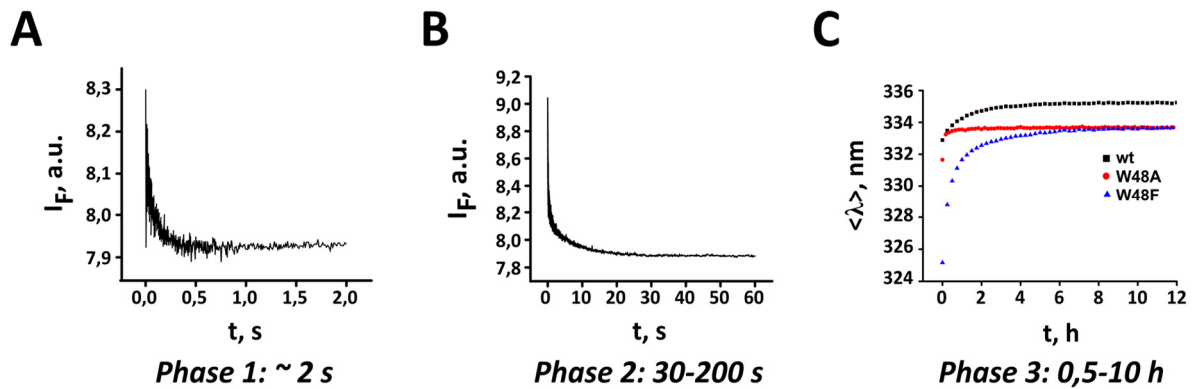


Abbildung 50: Einteilung der Entfaltungskinetik von GlpF in drei Phasen.

Exemplarische Verläufe zeitaufgelöster Signaländerungen basierend auf der Entfaltung von GlpF. (A) Phase 1 äußert sich in der Relaxation der intrinsischen Fluoreszenzintensität des GlpF-Wildtyps innerhalb eines Zeitraumes von zwei Sekunden. (B) Phase 2 ist im Vergleich zu (A) stark verlangsamt, umfasst einen Zeitrahmen von 30-200 Sekunden und ist ausschließlich bei Varianten des GlpF-Wildtyps zu beobachten. Bei GlpF W48F äußert sich die Relaxation zusätzlich in einem Anstieg der Fluoreszenzintensität (nicht gezeigt, siehe Abbildung 41 B). (C) Phase 3 wird ausschließlich über die Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ erfasst. Die Relaxationszeit kann stark zwischen den GlpF-Varianten schwanken und variiert innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten bis zu 10 Stunden.

Wie bereits erwähnt, lässt sich eine Relaxation der Phase 2 nur bei den Varianten GlpF W48F und GlpF W219F beobachten. Kinetische Untersuchungen wurden nur an GlpF-Varianten durchgeführt, die nach den Kriterien in Kap. 4.1 in Abwesenheit von SDS als Tetramer vorliegen und eine möglichst identische Stabilität zum GlpF wt aufweisen (siehe Tabelle 21). Daher liegt keine Information vor, ob der Verlauf der Fluoreszenzintensität der Varianten GlpF W48A und W219A ebenfalls im Vergleich zum GlpF wt verlangsamt wäre. Die Beobachtung der verlangsamt Relaxation bei zwei Varianten von GlpF ist nicht durch den Vorgang einer Hintergrundentfaltung von GlpF zu erklären, die sich parallel zur Entfaltung der Phase 1 abspielt. Wird die Relaxation der Phase 1 entweder von Trp 48 oder Trp 219 bestimmt, so müsste sich die verlangsamt Relaxation nur in einer der beiden genannten Varianten äußern. Tatsächlich lässt sich die hier vorliegende Konstellation der Relaxationen von Phase 2 mit keinem möglichen Modell für die Entfaltung von GlpF erklären. Aus diesem Grund ist die Relaxation der Phase 2 wahrscheinlich auf den Austausch der Aminosäuren Trp 48 bzw. Trp 219 zurückzuführen, der in einer Änderung der Stabilität und der Fluoreszenzintensität von GlpF resultiert. Folglich ist Phase 2 keiner wildtypischen Änderung der Struktur von GlpF zuzuordnen und wird in der Weiteren Betrachtung der Entfaltung von GlpF ausgelassen. Die Beobachtung der Entfaltung von GlpF wird auf die Phasen 1 und 3 eingeschränkt.

Phase 3 ist im Vergleich zu den Relaxationszeiten anderer Proteine außergewöhnlich langsam und konnte ausschließlich über die Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle \lambda \rangle$ erfasst werden.

Langsame Entfaltungsprozesse lassen sich überwiegend in außerordentlich stabilen Proteinen aus extremophilen Organismen beobachten [263,264]. Wenn in Betracht gezogen wird, dass bereits geringe Änderungen der funktionellen Gruppen der Aminosäuren von GlpF eine starke Destabilisierung des Proteins hervorrufen können [159,265], ist eine langsame Entfaltung aufgrund einer stabilen Struktur für GlpF nicht wahrscheinlich. Vielmehr liegt GlpF nach Phase 1 in mehreren entfalteten Zuständen vor, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden und zwischen denen sich ein Gleichgewicht einstellen muss. Diese marginalen Änderungen nehmen mehrere Stunden in Anspruch und sind über die Änderung der Fluoreszenzintensität mittels *Stopped-Flow* nicht zu detektieren. Deswegen kann das Einstellen dieses Gleichgewichtes nur über die Änderung der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ beobachtet werden, die im Vergleich zur Fluoreszenzintensität Schwankungen detaillierter erfasst. Dies äußert sich auch in den unterschiedlichen Relaxationszeiten der in Abbildung 50 C gezeigten GlpF-Varianten W48A und W48F, deren mittlere Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$ je nach Anzahl der möglichen entfalteten Zustände schneller oder langsamer als der GlpF wt das Plateau erreichen können.

Die Resultate zeigen, dass die Entfaltung von GlpF in verschiedenen Phasen abläuft, die durch definierte Geschwindigkeitskonstanten beschrieben werden können. Die Entfaltung von GlpF verläuft daher nach einem komplexen Mechanismus, der sich auf unterschiedlichen zeitlichen Ebenen abspielt.

5.4.2 Der Chevronplot von k_2 weist auf kinetische Intermediate und parallele Wege bei der Entfaltung von GlpF hin

Die Änderung der Intensität des Fluoreszenzsignals des GlpF-Wildtyps bei SDS-induzierter Entfaltung (Phase 1) lässt sich über eine bi-exponentielle Fitfunktion beschreiben, die die langsamere Geschwindigkeitskonstante k_1 und die schnellere Konstante k_2 enthält. Aufgrund des eindeutigen Verlaufs von k_2 bei ansteigenden χ_{SDS} , wurde dieser in Form eines Chevronplots dargestellt (Abbildung 40) und eingehender untersucht.

Die Entfaltungskinetik von GlpF wurde bereits in Veerappan et al. innerhalb eines Bereiches von 0,72-0,95 χ_{SDS} untersucht und ebenfalls über zwei Geschwindigkeitskonstanten charakterisiert [167]. Folglich wird die SDS-induzierte Entfaltung von GlpF tatsächlich von mindestens zwei Entfaltungsprozessen bestimmt. Die extrapolierte Rate ($k_{2u0} = 0,116 \text{ s}^{-1} \pm 0,087$) der schnellen Entfaltung in Abwesenheit von SDS stimmt mit dem Wert der langsamen Entfaltungsphase $k_2 = 0,1185 \text{ s}^{-1}$ aus [167] nahezu überein. Interessanterweise wird in [167] eine noch schnellere Entfaltungsrate $k_1 = 0,83 \text{ s}^{-1}$ dokumentiert, wohingegen in dieser Arbeit eine Entfaltungsrate k_1 detektiert wurde, die langsamer als k_2 ist. Die Steigungen m_u der Extrapolationsgeraden, die die

Sensitivität der Entfaltungsraten gegenüber χ_{SDS} angeben, weichen auch voneinander ab (vgl. $m_u = 2,54$ [167] und $m_{2u} = 1,64 \pm 0,12$, diese Arbeit). Insgesamt scheinen die Werte der kinetischen Entfaltung aus [167] stets ungefähr doppelt so hoch zu sein wie die hier vorgestellten Messergebnisse. Die Entfaltung von GlpF scheint in [167] folglich schneller abzulaufen. Wie bereits in Kap. 5.3 erwähnt, kann die in dieser Arbeit beobachtete langsamere Entfaltung der erhöhten Stabilität von GlpF geschuldet sein, die durch eine verbesserte Reinigung des Proteins im Vergleich zu [167] erreicht wurde. Analog ließe sich über angepasste Rückfaltungsmessungen die Rückfaltungsrate für die Entfaltung von GlpF und damit auch die Gibbs'sche freie Energie der (Ent)faltung von GlpF bestimmen.

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, dass die Entfaltung von GlpF einen Prozess mit mehreren Phasen darstellt. Dies spiegelt sich auch in der Form des Chevronplots wieder, der von der typischen V-Form eines einfachen Zwei-Stufen-Übergangs abweicht [107] (Abbildung 51) und die Resultate aus [167] weitestgehend bestätigt. Im vorliegenden Fall muss der Chevronplot aufgrund seiner Unvollständigkeit unter Vorbehalt interpretiert werden.

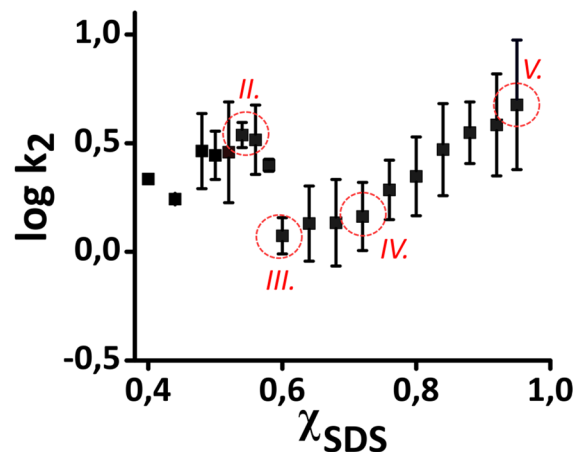


Abbildung 51: Chevronplot des Verlaufs der Geschwindigkeitskonstante k_2 des GlpF Wildtyps mit charakteristischen Punkten.

Entsprechende Erklärung siehe Abbildung 52. Punkt I. ($\chi_{\text{SDS}} = 0$) ist in dieser Abbildung nicht gezeigt. Punkt II. ($\chi_{\text{SDS}} = 0,54$) zeigt das Maximum des gekrümmten Rückfaltungsarms des Chevronplots (*chevron-roll-over*). Punkt III. ($\chi_{\text{SDS}} = 0,6$) markiert den vermuteten c_m -Wert des Chevronplots. An Punkt IV. ($\chi_{\text{SDS}} = 0,72$) ist eine Krümmung des Entfaltungsarmes (*upward curvature*) zu beobachten. An Punkt V. ist $\log k_2$ maximal.

Im ersten Abschnitt des Chevronplots ($\chi_{\text{SDS}} < 0,6$) ist ein nicht linearer Verlauf zu erkennen, der als *chevron-roll-over* oder *curved chevron plot* bezeichnet wird [266]. Dieser Verlauf befindet sich links vom Minimum des Chevronplots und ist daher dem Rückfaltungsarm des Chevronplots zuzuordnen (Abbildung 51, II.). k_2 wird definitionsgemäß im Rückfaltungsarm von k_{2r} dominiert (siehe (IV)). In dieser Arbeit war eine Messung der Rückfaltungskinetik aber nicht möglich, weshalb die Werte, die dem Rückfaltungsarm zugeordnet werden, aus den Entfaltungsmessungen

stammen. k_2 wird auf diese Weise von k_{2r} beeinflusst, deren Signalstärke aber bei Entfaltungsmessungen zu gering ist, um die Geschwindigkeitskonstante zuverlässig bestimmen zu können. Eine Ausnahme können die ermittelten Werte bilden, die sich nahe dem vermuteten c_m -Wert ($\log k_{2u} = \log k_{2r}$, $\chi_{SDS} = 0,6$, Abbildung 51, III.) befinden, da die Werte für k_2 in diesem Übergangsbereich für k_{2u} und k_{2r} ähnlich sind. Aus diesem Grund wurden die Werte ab $\chi_{SDS} > 0,4$ bis $\chi_{SDS} = 0,6$ für eine ansatzweise Interpretation der Entfaltung von GlpF bei niedrigen χ_{SDS} verwendet. Es ist daher allerdings nicht eindeutig, ob der *roll-over* im vollständigen Chevronplot existieren würde. Allerdings wurden für den in Abbildung 40 gezeigten Chevronplot nur Werte verwendet, die über mehrere Messreihen reproduzierbar nachgewiesen werden konnten, weshalb die Tendenz eines gebogenen Entfaltungsarms sicher angenommen werden kann. Nicht-lineare Rückfaltungsarme weisen auf einen dreistufigen Entfaltungsmechanismus, d.h. auf die Existenz eines Intermediates, hin [203,267,268].

Die Unterscheidung zwischen einem *on-* und *off-pathway*-Intermediat ist sehr komplex und kann über einen Vergleich der (Ent)faltungsraten k_{in} zwischen der Ausbildung des Intermediats I und des nativen Zustands N und k_{iu} (zwischen Intermediat I und entfaltetem Zustand U) bestimmt werden [269]. Zu diesem Zweck muss jedoch eine eindeutige zeitliche Trennung der jeweiligen Zustände vorliegen, die im Fall von GlpF nicht gegeben ist. Der in dieser Arbeit gezeigte *roll-over* besitzt eine starke Krümmung. Eine vergleichbar stark ausgeprägte Krümmung konnte für die Faltung einer Proteinfamilie bestehend aus drei Helixbündeln simuliert werden [270]. Entsprechend der Simulation wäre ein stark gekrümmter Rückfaltungsarm ein Indiz für ein vollständig entfaltetes Intermediat, welches hauptsächlich aus nicht-nativen Wechselwirkungen besteht, die zunächst vollständig aufgebrochen werden müssten, um die native Faltung fortzuführen [270]. Folglich würde der beobachtete *roll-over* des Rückfaltungsarms einem möglichen Intermediat entsprechen, welches nicht auf dem natürlichen Entfaltungsweg von GlpF liegt (sog. *off-pathway* Intermediat [203]). Die Ausbildung nicht-nativer Interaktionen kann notwendig sein, um die Ausbildung der nativen Struktur zu stärken [271]. So werden in einigen Proteinen nicht-native Kontakte zur verbesserten Einbindung hydrophober Oberflächen in partiell entfaltete Proteinstrukturen ausgebildet [272–274]. Auch im Fall von GlpF kann das Auftreten eines *off-pathway*-Intermediats bei niedrigen χ_{SDS} die nicht-native Umstrukturierung möglicher exponierter Bereiche in der Detergenzmizelle bedeuten.

Der Entfaltungsarm des Chevronplots ($\chi_{SDS} > 0,6$) hat ebenfalls charakteristische Merkmale: Durch einen „Knick“ (Abbildung 51, IV.) ergibt sich eine Aufteilung des Entfaltungsarms in zwei Abschnitte, die sich durch unterschiedliche Steigungen m auszeichnen (siehe Tabelle 20). Die Relaxation bzw. die Steigung m kann unter anderem durch das Entstehen eines Intermediates

oder durch den Zerfall größerer Komplexe (z.B. Oligomere) bei Zugabe einer denaturierenden Substanz verändert werden [95]. Ein nach innen „geknickter“ Entfaltungsarm (*upward curvature*) ist aber häufig ein Indiz für die Existenz multipler paralleler Entfaltungswege [206,275,276]. Zwei parallele Entfaltungswege sind entsprechend dem Faltungstrichter-Modell in Abbildung 6 exemplarisch gezeigt. In diesem Fall würde ein Entfaltungsweg L bei niedrigeren, ein Entfaltungsweg H bei höheren χ_{SDS} populiert werden. Demzufolge würde sich die Bezeichnung von k_{2u} aus Formel (IV) weiter unterteilen in

$$\log k_{2u} = \log(k_{2uL} + k_{2uH}) \quad (\text{XIII})$$

Wobei gilt k_{2u} : Geschwindigkeitskonstante der Entfaltungsreaktion von k_2 , s^{-1} ;
 k_{2uL} : Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung über den Entfaltungsweg L, s^{-1} ;
 k_{2uH} : Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung über den Entfaltungsweg H, s^{-1} .

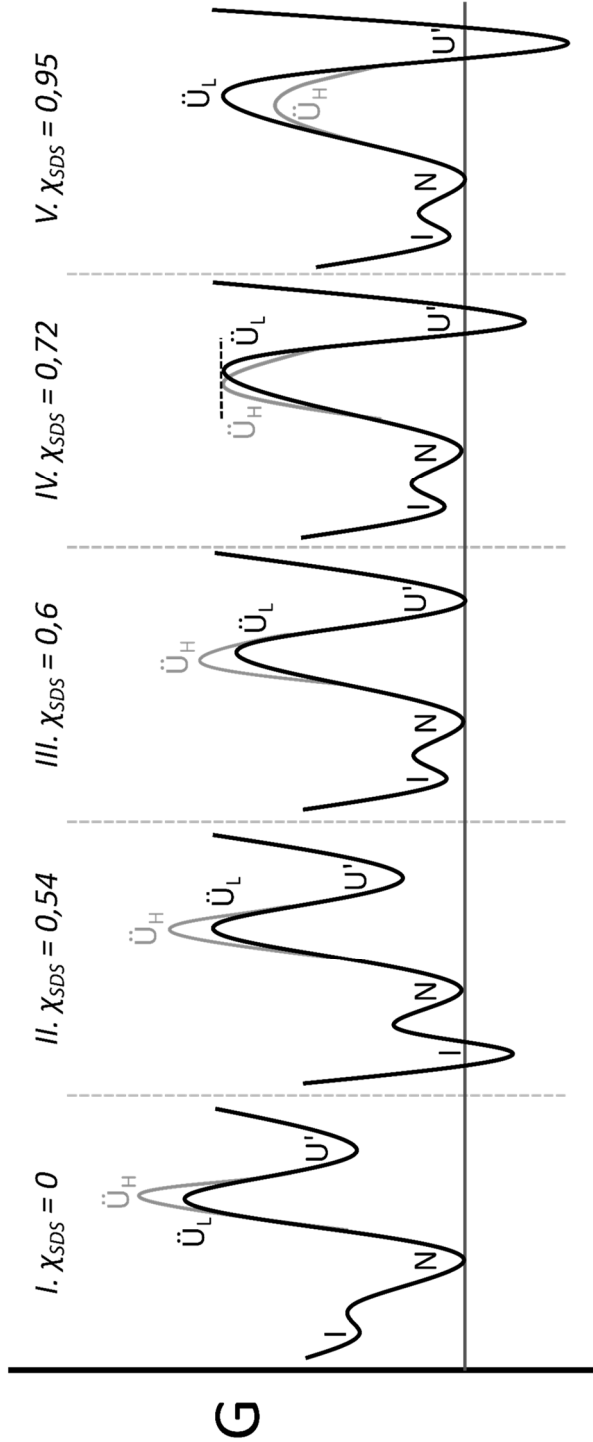
Die Unterteilung des Entfaltungsarms des Chevronplots in zwei Abschnitte wurde durch den Vergleich mit dem Entfaltungsarm der GlpF-Variante Y105A gestützt (Kap. 4.4.2). Der abweichende Verlauf der Entfaltungsrate von GlpF Y105A im Vergleich zum Entfaltungsarm von GlpF bei hohen χ_{SDS} ist ein weiterer Hinweis für die Existenz eines parallelen Entfaltungsweges. Durch den Einsatz veränderter Proteinvarianten kann unter Umständen ein anderer Entfaltungsweg präferiert werden, was stark von der Stabilität der veränderten Region innerhalb des Proteins abhängt [277,278]. Demnach würden GlpF Y105A sowie der GlpF wt unter Einfluss niedrigerer χ_{SDS} der Entfaltung über den gleichen bzw. einem sehr ähnlichen Weg und Übergangszustand verlaufen, der in ähnlichen Geschwindigkeitskonstanten resultiert. Unter höheren χ_{SDS} wird beim wildtypischen GlpF allerdings die Entfaltung über einen anderen Entfaltungsweg präferiert. Der Übergangszustand dieses Entfaltungsweges kann schneller überwunden werden als der ursprüngliche Übergangszustand. Dies äußert sich in der größeren Steigung m_{2uH} des oberen Entfaltungsarmes im Chevronplot von GlpF im Vergleich zur Steigung m_{2uL} bei niedrigeren χ_{SDS} (vgl. Tabelle 20). Die Ursache dieses parallelen Entfaltungsweges kann ab einem bestimmten SDS-Molenbruch in der Präferenz der Destabilisierung anderer Regionen von GlpF liegen. Diese können einen weniger strukturierten Zustand besitzen und damit eine erhöhte Zugänglichkeit zur Anlagerung von SDS ermöglichen [205]. Eine Folge der Ausbildung paralleler Entfaltungswege könnte die Existenz unterschiedlicher entfalteter Zustände sein, unter welchen sich zunächst ein Gleichgewicht einstellen müsste. Die Einstellung dieses Gleichgewichtes könnte mit der zeitlichen Änderung in Phase 3 übereinstimmen, die nach der beobachteten Relaxation stattfindet. Diese Möglichkeit erscheint wahrscheinlich, da GlpF nach der Entfaltung durch SDS der Großteil des Proteins seine Sekundärstruktur beibehält (Kap. 4.3.3) und die entfaltete

Tertiärstruktur daher in mehreren Varianten vorliegen kann, die innerhalb eines längeren Zeitraumes ineinander überführt werden.

Die angeführten Interpretationen des Chevronplots der Geschwindigkeitskonstante k_2 (Abbildung 51) von GIpF sind in Abbildung 52 in einem Energiediagramm zusammengefasst. Dieses stellt eine Hypothese für die mögliche Entfaltung von GIpF unter dem Einfluss von SDS dar. Der Nachweis von Intermediaten und die Interpretation kinetischer Daten ist allerdings nicht immer eindeutig [279], weshalb die hier angeführte Interpretation sehr spekulativ sind. Der Chevronplot spiegelt nicht die vollständige Entfaltung von GIpF wider, sondern erlaubt nur Aussagen über die Entfaltung, die über k_2 charakterisiert wird. Für die Untersuchung der vollständigen Entfaltung von GIpF müsste die Änderung der Geschwindigkeitskonstante k_1 sowie der Geschwindigkeitskonstante der Relaxation von Phase 3 eingehend analysiert werden. Aufgrund der langsamen Relaxation von Phase 3 kann oft keine eindeutige Aussage über den entfalteten Zustand von GIpF nach Phase 1 getroffen werden. Die in Abbildung 52 gezeigte Energielandschaft beschreibt demnach den Zustand eines schnellen Vorgleichgewichtes, das anhand der Änderung von k_2 erstellt worden ist. Der im Vorgleichgewicht entfaltete Zustand wird aus diesem Grund als U' bezeichnet.

Die strukturelle Ursache für die Existenz eines doppelten Entfaltungsweges könnte in einer Änderung der Quartärstruktur oder der Dissoziation des GIpF-Tetramers liegen. Diese Annahme kann nur getroffen werden, wenn die Relaxation der Phase 1, aus der k_2 resultiert, die Monomerisierung des GIpF-Tetramers bereits impliziert. Anhand der Messungen in [167] konnte das GIpF-Monomer bereits nach 15-minütiger Inkubationszeit von GIpF mit SDS detektiert werden, weshalb seine Existenz unmittelbar nach Phase 1 wahrscheinlich erscheint. Auch wenn weitere Untersuchungen notwendig sind, um diese Hypothese zu stärken, sprechen zwei Argumente für diese Option:

a) Der Schnittpunkt beider Entfaltungsarme von k_{2uL} und k_{2uH} ist im Bereich höherer χ_{SDS} angeordnet, in denen das GIpF-Tetramer unter „quasi“-Gleichgewichtsbedingungen bereits dissoziiert (Abbildung 31 A, $\chi_{SDS} = 0,72$), bzw. zwischen dem di- und monomeren Zustand verteilt ist. Dieser Zustand macht sich durch die Abwesenheit der dem Tetramer entsprechenden Bande bei $\chi_{SDS} \sim 0,72$ bemerkbar. Demnach könnte die Dissoziation der Quartärstruktur von GIpF als Entfaltungsweg verstärkt populiert werden, sobald höhere SDS-Konzentrationen auf das Protein einwirken. Der Übergangszustand, den das Protein für die Entfaltung überwinden muss, wäre folglich über den Entfaltungsweg H einfacher zu überwinden.



Reaktionskoordinate

Abbildung 52: Vorschlag für die Änderung der Energielandschaft der SDS-induzierten Entfaltung von GlpF.

Die Entfaltung von GlpF wird über die Änderung der freien Energie (G) während der Interaktion von GlpF mit SDS gezeigt. N, nativer Zustand; I, Intermediat; \ddot{U}_L , Übergangszustand Entfaltungsweg L; \ddot{U}_H , Übergangszustand Entfaltungsweg H; U' , entfalteter Zustand im Vorgleichgewicht. Der native Zustand (N) dient in der Abbildung als Referenzpunkt (schwarze Linie). Die Höhe der angezeigten Übergänge und Minima ist hier hypothetisch angezeigt und gibt ausschließlich grobe Relationen zum nativen Zustand wieder. Die Energiediagramme zu den fünf ausgewählten χ_{SDS} (I.-V.) repräsentieren charakteristische Bereiche des Chevroneplots der Geschwindigkeitskonstante k_2 (siehe Abbildung 51). I. In Abwesenheit von SDS ist der native Zustand von GlpF am stabilsten und bildet das energetische Minimum in der Faltungslandschaft. Die übrigen Zustände werden dabei kaum populiert. Ein Übergangszustand \ddot{U}_L trennt den nativen und ungefalteten Zustand von GlpF. II. Unter Einfluss ansteigender χ_{SDS} wird die Ausbildung eines Intermediats I gefördert, welches nicht auf dem Entfaltungsweg zwischen nativem und entfaltetem Zustand liegt. Dieses *off-pathway*-Intermediat verlangsamt die Ent- und Rückfaltung von GlpF und wird demnach im Laufe der Entfaltung bei $\chi_{SDS} = 0,54$ zunächst aufgelöst, ehe sich der native Zustand wieder ausbilden und die weitere (*on-pathway*) Entfaltung ablaufen kann. Durch Zugabe von SDS wird die Barriere des Übergangszustandes zwischen nativem und entfaltetem GlpF im Vergleich zu I. verringert und der entfaltete Zustand U' weiter stabilisiert. III. Bei $\chi_{SDS} = 0,6$ weisen nativer und ungefalteter Zustand ein vergleichbares energetisches Minimum auf. Im Chevroneplot befindet sich hier der angenehme Schnittpunkt zwischen Ent- und Rückfaltungsweg (c_m) und es gilt $k_f = k_r$. Das Intermediat I wird nicht mehr stark populiert. Seine tatsächliche Position im Energiediagramm ist aber unbekannt und kann von der hier gezeigten Position abweichen. IV. Ein potenzieller paralleler Entfaltungsweg H ist für den Knick im Entfaltungsweg verantwortlich. Der energetische Aufwand zur Überwindung von \ddot{U}_H ist an diesem Punkt mit \ddot{U}_L identisch. Die Verteilung der möglichen Zustände hat sich stark zugunsten des entfaltenen Zustandes U' verschoben. Dieser stellt in IV. das energetische Minimum dar. V. Die Entfaltungsreaktion ist hier stark zugunsten von U' verschoben. Andere mögliche Zustände werden nur minimal populiert. In dem gezeigten Diagramm wird die Entfaltung über den Übergangszustand \ddot{U}_H durch den verringerten energetischen Aufwand einfacher, weshalb dieser bei hohen χ_{SDS} präferiert wird.

b) Basierend auf den durchgeführten Untersuchungen stellt GlpF Y105A eine destabilisierte Variante von GlpF dar. Der Verlauf des Entfaltungsarms entspricht dem Entfaltungsarm von k_{2uL} des GlpF-Wildtyps und setzt sich auch unter Einfluss hoher χ_{SDS} ohne Änderung der Steigung fort. Im Fall von GlpF Y105A wird demnach kein paralleler Entfaltungsweg präferiert, möglicherweise, weil dieser unter den gegebenen strukturellen Eigenschaften (destabilisiert) von Y105A nicht vorliegt bzw. nicht vorliegen kann. Dieser Unterschied könnte gerade unter Einfluss hoher χ_{SDS} die Quartärstruktur von GlpF betreffen.

Basierend auf diesen Beobachtungen würde somit der Entfaltungsweg H, welcher durch den Entfaltungsarm k_{2uH} repräsentiert wird, ab einer bestimmten SDS-Konzentration eine höhere Zugänglichkeit für SDS besitzen als der Entfaltungsweg L, welcher durch den Entfaltungsarm von k_{2uL} dargestellt wird (ähnlich zu [205,280]). Diese erhöhte Zugänglichkeit für SDS könnte durch die Dissoziation des Tetramers oder des Dimers verursacht werden, was dadurch auch die Entfaltung des Tetramerkerns und der Interaktionsflächen zwischen den Monomeren ermöglicht. Dies würde bedeuten, dass die Tetramerisierung von GlpF ein stark stabilisierend ist, was nach der Destabilisierung des Tetramers durch SDS zur raschen Entfaltung des Proteins führt. Dies würde sich auch mit der Hypothese aus Kap. 5.3.3.2 decken, in der das Tetramer als Intermediat bei der Entfaltung von GlpF vorliegt. Im Fall des Entfaltungswegs L könnte bereits eine Dissoziation der Tertiärstruktur von GlpF vonstattengehen, die sowohl im Tetramer, als auch im Monomer stattfindet. Inwieweit der Entfaltungsweg L mit dem Entfaltungsweg von GlpF Y105A tatsächlich strukturell übereinstimmt, würde einer detaillierteren Untersuchung, beispielsweise der Sekundärstrukturänderung, bedürfen. Die vermutete Dissoziation des GlpF-Tetramers könnte durch eine zusätzliche Analyse der Änderung der Lichtstreuung überprüft werden [107]. Es wird vermutet, dass die möglichen strukturellen Differenzen, die für die Präferenz eines bestimmten Entfaltungsweges verantwortlich sind, evolutionäre Mechanismen darstellen, die eine flexible Antwort der Proteinstruktur auf sich ändernde Umweltbedingungen ermöglichen [205]. Demnach könnte auch der parallele Entfaltungsweg eine Möglichkeit für GlpF sein, die Struktur und Funktion des GlpF-Monomers unter höheren χ_{SDS} weiter zu stabilisieren und dadurch die Funktion des Proteins möglichst aufrecht zu erhalten, aber die Dissoziation der Quartärstruktur über diesen Weg in Kauf zu nehmen.

Der Chevronplot der Geschwindigkeitskonstante deutet auf eine Entfaltung von GlpF hin, die nicht mit dem Zweizustandsmodell löslicher Proteine erklärt werden kann. Form und Verlauf deuten auf die Existenz eines *off-pathway*-Intermediates und möglicher paralleler Entfaltungswege hin. Die Existenz eines parallelen Entfaltungsweges steht dabei in möglicher Korrelation zur Dissoziation des Tetramers von GlpF.

5.4.3 Schlussfolgerung der kombinierten Modelle aus Kap. 5.3 und Kap. 5.4 zur SDS-induzierten Entfaltung von GlpF

α -helikale Membranproteine sind besonders stabile Strukturen, die größtenteils nur bis zur Sekundärstrukturebene entfaltet werden können. Dies lässt sich auch anhand der Entfaltung des oligomeren α -helikalen Membranproteins GlpF beobachten. Die Analyse der Entfaltung unter „quasi“-Gleichgewichtsbedingungen ergab eine Abfolge der Destabilisierung von GlpF auf struktureller, sowie auf löslicher und Transmembranebene. Die Untersuchung der Entfaltungskinetik ermöglichte die Rekonstruktion eines potenziellen Entfaltungsweges von GlpF. Bei entsprechend hohen χ_{SDS} wird der Entfaltungsweg der schrittweisen Dissoziation des GlpF-Tetramers [167] gegenüber dem ursprünglichen Entfaltungsweg – der Tertiärstrukturentfaltung von GlpF – bevorzugt. Auf diese Weise bleibt ein Großteil der Struktur der funktionalen Einheit von GlpF – die substratleitende Monomerpore – weitestgehend erhalten. Da aber keiner der im Detail untersuchten Abläufe der Entfaltung im Gleichgewicht betrachtet wurde, sind die gewonnenen Ergebnisse mit Einschränkungen verbunden. Dennoch konnten folgende allgemeine Schlüsse aus den kombinierten Resultaten zur Entfaltung von GlpF gezogen werden:

- Bei der Entfaltung von GlpF werden sowohl kinetische als auch stabile Zwischenzustände populiert.
- Die Entfaltung von GlpF entspricht demnach nicht dem Zweizustandsmodell, nach dem viele lösliche Proteine, aber auch Membranproteine, entfalten.
- Der komplexe Ablauf der Entfaltung von GlpF spielt sich auf unterschiedlichen zeitlichen und räumlichen Ebenen ab.
- Dabei ist die Stabilität der Quartärstruktur von GlpF tendenziell höher als die Stabilität seiner Tertiärstrukturbereiche.

Diese Schlussfolgerungen stellen einen Ausgangspunkt für mögliche eingehendere Untersuchungen des Faltungsgleichgewichtes sowie der Faltungskinetik von GlpF dar. Besonders das Erreichen reversibler Faltungsbedingungen und die damit verbundene Bestimmung relevanter thermodynamischer Faltungsparameter sollten die weitere Untersuchung der (Ent)faltung von GlpF bestimmen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Tiefenauer L, Demarche S. Challenges in the development of functional assays of membrane proteins. *Materials (Basel)* 2012;5:2205–42. doi:10.3390/ma5112205.
- [2] Fagerberg L., Jonasson K., Von Heijne G., Uhlén M., Berglund L. Prediction of the human membrane proteome. *Proteomics* 2010;10:1141–9.
- [3] Heijne G Von. The membrane protein universe : what ' s out there and why bother ? *J Intern Med* 2007;1:543–57. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01792.x.
- [4] Wild A, Schmitt V, Wild A, Schmitt V. Bau, Eigenschaften und Funktionen von Biomembranen Die pflanzliche Zelle als osmotisches System. *Biochem. und Physiol. Versuche mit Pflanz.*, Springer; 2012. doi:10.1007/978-3-8274-2819-6_5.
- [5] Luckey M. *Membrane Structural Biology*. Cambridge University Press; 2008. doi:10.1017/CBO9780511811098.
- [6] Soediono B. *Alberts - Molecular Biology Of The Cell*. Garland Science; 1989. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [7] Warschawski DE, Arnold AA, Beaugrand M, Gravel A, Chartrand É, Marcotte I. Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2011. doi:10.1016/j.bbamem.2011.03.016.
- [8] Lomize A, Lomize M, Pogozheva I. Membrane protein lipid composition atlas. *Oriental Proteins Membr* 2013. [http://opm.phar.umich.edu/atlas.php?membrane=Mitochondrial inner membrane](http://opm.phar.umich.edu/atlas.php?membrane=Mitochondrial%20inner%20membrane).
- [9] Shokri A, Larsson G. Characterisation of the Escherichia coli membrane structure and function during fedbatch cultivation. *Microb Cell Fact* 2004;3. doi:10.1186/1475-2859-3-9.
- [10] White S, Wimley W. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1999;28:319–65. doi:10.1146/annurev.biophys.28.1.319.
- [11] Lodish H, Berk A, Zipursky S. *Cell Biology*. 4th edition. Sect. 22.1 Cell-Cell Adhes. Commun., 2000.
- [12] Cohen C, Parry DAD. α -Helical coiled coils and bundles: How to design an α -helical protein. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 1990;7:1–15. doi:10.1002/prot.340070102.
- [13] Tamm LK, Arora A, Kleinschmidt JH. Structure and Assembly of β -Barrel Membrane Proteins. *J Biol Chem* 2002. doi:10.1074/jbc.r100021200.
- [14] Buchanan SK. β -barrel proteins from bacterial outer membranes: Structure, function and refolding. *Curr Opin Struct Biol* 1999. doi:10.1016/S0959-440X(99)80064-5.
- [15] Schulz GE. β -barrel membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2000. doi:10.1016/S0959-440X(00)00120-2.
- [16] Von Heijne G. Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006. doi:10.1038/nrm2063.
- [17] Heyden M, Freites JA, Ulmschneider MB, White SH, Tobias DJ. Assembly and stability of α -helical membrane proteins. *Soft Matter* 2012. doi:10.1039/c2sm25402f.
- [18] Chen H, Kendall DA. Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer

- and polypeptide orientation. *J Biol Chem* 1995. doi:10.1074/jbc.270.23.14115.
- [19] Nilsson IM, Von Heijne G. Breaking the camel's back: Proline-induced turns in a model transmembrane helix. *J Mol Biol* 1998. doi:10.1006/jmbi.1998.2219.
- [20] Booth PJ, Clarke J. Membrane protein folding makes the transition. *Proc Natl Acad Sci* 2010. doi:10.1073/pnas.0914478107.
- [21] Hardesty B, Kramer G. Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;66:41–66. doi:10.1016/S0079-6603(00)66026-9.
- [22] Fersht AR. From the first protein structures to our current knowledge of protein folding: Delights and scepticisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:650–4. doi:10.1038/nrm2446.
- [23] Dill KA. The protein folding problem. *Annu Rev Biophys* 2008;37:289–316. doi:10.1146/annurev.biophys.37.092707.153558.
- [24] Myers JK, Pace CN. Hydrogen bonding stabilizes globular proteins. *Biophys J* 1996;71:2033–9. doi:10.1016/S0006-3495(96)79401-8.
- [25] Chen J, Stites WE. Energetics of side chain packing in staphylococcal nuclease assessed by systematic double mutant cycles. *Biochemistry* 2001;40:14004–11. doi:10.1021/bi011268l.
- [26] Burley S, Petsko G. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science (80-)* 1985;229:23–8. doi:10.1126/science.3892686.
- [27] Weaver LH, Matthews BW. Structure of bacteriophage T4 lysozyme refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 1987;193:189–99. doi:10.1016/0022-2836(87)90636-X.
- [28] Theillet F-X, Binolfi A, Frembgen-Kesner T, Hingorani K, Sarkar M, Kyne C, et al. Physicochemical Properties of Cells and Their Effects on Intrinsically Disordered Proteins (IDPs). *Chem Rev* 2014. doi:10.1021/cr400695p.
- [29] Buck TM, Wright CM, Brodsky JL. The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 2007. doi:10.1016/j.semcdb.2007.09.001.
- [30] Tomanek L. The Heat-Shock Response: Its Variation, Regulation and Ecological Importance in Intertidal Gastropods (genus *Tegula*). *Integr Comp Biol* 2006. doi:10.1093/icb/42.4.797.
- [31] Genest O, Hoskins JR, Kravats AN, Doyle SM, Wickner S. Hsp70 and Hsp90 of *E. coli* Directly Interact for Collaboration in Protein Remodeling. *J Mol Biol* 2015. doi:10.1016/j.jmb.2015.10.010.
- [32] Rapoport T. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science (80-)* 1992;258:931–6. doi:10.1126/science.1332192.
- [33] Cymer F, Von Heijne G, White SH. Mechanisms of integral membrane protein insertion and folding. *J Mol Biol* 2015;427:999–1022. doi:10.1016/j.jmb.2014.09.014.
- [34] Booth PJ, High S. Polytopic membrane protein folding and assembly in vitro and in vivo. *Mol Membr Biol* 2004. doi:10.1080/09687680410001697215.
- [35] Corradi V, Mendez-Villuendas E, Ingólfsson HI, Gu RX, Siuda I, Melo MN, et al. Lipid-Protein Interactions Are Unique Fingerprints for Membrane Proteins. *ACS Cent Sci* 2018. doi:10.1021/acscentsci.8b00143.
- [36] Bogdanov M, Mileykovskaya E, Dowhan W. Lipids in the Assembly of Membrane Proteins and Organization of Protein Supercomplexes: Implications for Lipid-linked Disorders. *Lipids Health Dis.*, 2008. doi:10.1007/978-1-4020-8831-5_8.

- [37] Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2004;1666:105–17. doi:10.1016/j.bbamem.2004.04.011.
- [38] Huang KS, Bayley H, Liao MJ, London E, Khorana HG. Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *J Biol Chem* 1981.
- [39] London E, Khorana HG. Denaturation and renaturation of bacteriorhodopsin in detergents and lipid-detergent mixtures. *J Biol Chem* 1982.
- [40] Booth PJ, Paulsen H. Assembly of light-harvesting chlorophyll a/b complex in vitro. Time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry* 1996. doi:10.1021/bi953053f.
- [41] Gorzelle BM, Nagy JK, Oxenoid K, Lonzer WL, Cafiso DS, Sanders CR. Reconstitutive refolding of diacylglycerol kinase, an integral membrane protein. *Biochemistry* 1999;38:16373–82. doi:10.1021/bi991292n.
- [42] Yerushalmi H, Lebendiker M, Schuldiner S. EmrE, an Escherichia coli 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J Biol Chem* 1995. doi:10.1074/jbc.270.12.6856.
- [43] Otzen DE. Folding of DsbB in mixed micelles: a kinetic analysis of the stability of a bacterial membrane protein. *J Mol Biol* 2003;330:641–9. doi:10.1016/S0022-2836(03)00624-7.
- [44] Baneres JL, Martin A, Hullot P, Girard JP, Rossi JC, Parello J. Structure-based analysis of GPCR function: Conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B₄ binding to recombinant BLT1. *J Mol Biol* 2003. doi:10.1016/S0022-2836(03)00438-8.
- [45] Popot JL, Engelman DM. Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* 1990;29:4031–7. doi:10.1021/bi00473a001.
- [46] Engelman DM, Chen Y, Chin CN, Curran AR, Dixon AM, Dupuy AD, et al. Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett* 2003;555:122–5. doi:10.1016/S0014-5793(03)01106-2.
- [47] White S, Wimley W. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1999;28:319–65. doi:10.1146/annurev.biophys.28.1.319.
- [48] Hong H. Toward understanding driving forces in membrane protein folding. *Arch Biochem Biophys* 2014. doi:10.1016/j.abb.2014.07.031.
- [49] Dill KA, MacCallum JL. The protein-folding problem, 50 years on. *Science (80-)* 2012. doi:10.1126/science.1219021.
- [50] Samatey FA. On the Distribution of Amino Acid Residues in Transmembrane α -Helix Bundles. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:4577–81. doi:10.1073/pnas.92.10.4577.
- [51] Wimley WC, Creamer TP, White SH. Solvation energies of amino acid side chains and backbone in a family of host - Guest pentapeptides. *Biochemistry* 1996;35. doi:10.1021/bi9600153.
- [52] Wimley WC, White SH. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol* 1996;3:842–8. doi:10.1038/nsb1096-842.
- [53] Hessa T, Kim H, Bihlmaier K, Lundin C, Boekel J, Andersson H, et al. Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* 2005;433:377–81. doi:10.1038/nature03216.

- [54] Ladokhin AS, White SH. Folding of amphipathic [alpha]-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin1. *J Mol Biol* 1999;285:1363–9. doi:10.1006/JMBI.1998.2346.
- [55] Fiedler S, Broecker J, Keller S. Protein folding in membranes. *Cell Mol Life Sci* 2010. doi:10.1007/s00018-010-0259-0.
- [56] Faham S, Yang D, Bare E, Yohannan S, Whitelegge JP, Bowie JU. Side-chain contributions to membrane protein structure and stability. *J Mol Biol* 2004;335:297–305. doi:10.1016/j.jmb.2003.10.041.
- [57] Lemmon MA, Engelman DM. Specificity and promiscuity in membrane helix interactions. *FEBS Lett* 1994;346:17–20. doi:10.1016/0014-5793(94)00467-6.
- [58] Eriksson AE, Baase WA, Zhang XJ, Heinz DW, Blaber M, Baldwin EP, et al. Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect. *Science (80-)* 1992;255:178–83. doi:10.1126/science.1553543.
- [59] Senes A, Gerstein M, Engelman DM. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: The GxxxG motif occurs frequently and association with β -branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* 2000;296:921–36. doi:10.1006/jmbi.1999.3488.
- [60] Cymer F, Veerappan A, Schneider D. Transmembrane helix-helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2012. doi:10.1016/j.bbamem.2011.07.035.
- [61] Langosch D, Heringa J. Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils. *Proteins Struct Funct Genet* 1998;31:150–9. doi:10.1002/(SICI)1097-0134(19980501)31:2<150::AID-PROT5>3.0.CO;2-Q.
- [62] Adamian L, Liang J. Helix-helix packing and interfacial pairwise interactions of residues in membrane proteins. *J Mol Biol* 2001;311:891–907. doi:10.1006/jmbi.2001.4908.
- [63] Bocharov E V., Mineev KS, Volynsky PE, Ermolyuk YS, Tkach EN, Sobol AG, et al. Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state. *J Biol Chem* 2008. doi:10.1074/jbc.M709202200.
- [64] O'Shea EK, Klemm JD, Kim PS, Alber T. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science (80-)* 1991. doi:10.1126/science.1948029.
- [65] Li E, Wimley WC, Hristova K. Transmembrane helix dimerization: Beyond the search for sequence motifs. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2012;1818:183–93. doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.031.
- [66] Ruan W, Becker V, Klingmüller U, Langosch D. The Interface between Self-assembling Erythropoietin Receptor Transmembrane Segments Corresponds to a Membrane-spanning Leucine Zipper. *J Biol Chem* 2004. doi:10.1074/jbc.M309311200.
- [67] Noordeen NA, Carafoli F, Hohenester E, Horton MA, Leitinger B. A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1. *J Biol Chem* 2006. doi:10.1074/jbc.M603233200.
- [68] Smith SO, Smith CS, Bormann BJ. Strong hydrogen bonding interactions involving a buried glutamic acid in the transmembrane sequence of the neu/erbB-2 receptor. *Nat Struct Biol* 1996;3:252–8. doi:10.1038/nsb0396-252.
- [69] Zhou FX, Cocco MJ, Russ WP, Brunger AT, Engelman DM. Interhelical hydrogen bonding

- drives strong interactions in membrane proteins. *Nat Struct Biol* 2000;7:154–60. doi:10.1038/72430.
- [70] Gratkowski H, Lear JD, DeGrado WF. Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:880–5. doi:10.1073/pnas.98.3.880.
- [71] Schneider D. Rendezvous in a membrane: Close packing, hydrogen bonding, and the formation of transmembrane helix oligomers. *FEBS Lett* 2004. doi:10.1016/j.febslet.2004.10.029.
- [72] Joh NHJ, Min A, Faham S, Whitelegge JP, Yang D, Woods VL, et al. Modest stabilization by most hydrogen-bonded side-chain interactions in membrane proteins. *Nature* 2008;453:1266–70. doi:10.1038/nature06977.
- [73] Ulmschneider MB, Sansom MSP, Di Nola A. Properties of integral membrane protein structures: Derivation of an implicit membrane potential. *Proteins Struct Funct Genet* 2005;59:252–65. doi:10.1002/prot.20334.
- [74] Hong H, Park S, Jiménez RHF, Rinehart D, Tamm LK. Role of aromatic side chains in the folding and thermodynamic stability of integral membrane proteins. *J Am Chem Soc* 2007;129:8320–7. doi:10.1021/ja068849o.
- [75] Anjana R, Vaishnavi MK, Sherlin D, Kumar SP, Naveen K, Kanth PS, et al. Aromatic-aromatic interactions in structures of proteins and protein-DNA complexes: a study based on orientation and distance. *Bioinformatics* 2012;8:1220–4. doi:10.6026/97320630081220.
- [76] Unterreitmeier S, Fuchs A, Schäffler T, Heym RG, Frishman D, Langosch D. Phenylalanine Promotes Interaction of Transmembrane Domains via GxxxG Motifs. *J Mol Biol* 2007;374:705–18. doi:10.1016/j.jmb.2007.09.056.
- [77] Johnson RM, Hecht K, Deber CM. Aromatic and cation- π interactions enhance helix-helix association in a membrane environment. *Biochemistry* 2007;46:9208–14. doi:10.1021/bi7008773.
- [78] Adamian L, Nanda V, DeGrado WF, Liang J. Empirical lipid propensities of amino acid residues in multispans alpha helical membrane proteins. *Proteins Struct Funct Genet* 2005;59:496–509. doi:10.1002/prot.20456.
- [79] Schiffer M, Chang CH, Stevens FJ. The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng Des Sel* 1992;5:213–4. doi:10.1093/protein/5.3.213.
- [80] Ridder A, Skupjen P, Unterreitmeier S, Langosch D. Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. *J Mol Biol* 2005;354:894–902. doi:10.1016/j.jmb.2005.09.084.
- [81] Killian J a, de Jong a M, Bijvelt J, Verkleij a J, de Kruijff B. Induction of non-bilayer lipid structures by functional signal peptides. *Embo J* 1990;9:815–9.
- [82] Ridder ANJA, Van de Hoef W, Stam J, Kuhn A, De Kruijff B, Killian JA. Importance of hydrophobic matching for spontaneous insertion of a single-spanning membrane protein. *Biochemistry* 2002;41:4946–52. doi:10.1021/bi0158674.
- [83] Braun P, Von Heijne G. The aromatic residues Trp and phe have different effects on the positioning of a transmembrane helix in the microsomal membrane. *Biochemistry* 1999;38:9778–82. doi:10.1021/bi990923a.
- [84] De Planque MRR, Kruijtzter JAW, Liskamp RMJ, Marsh D, Greathouse D V., Koeppe RE, et al. Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane α -helical peptides. *J Biol Chem* 1999;274:20839–46.

- doi:10.1074/jbc.274.30.20839.
- [85] De Jesus AJ, Allen TW. The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2013;1828:864–76. doi:10.1016/j.bbamem.2012.09.009.
- [86] Granseth E, Von Heijne G, Elofsson A. A study of the membrane-water interface region of membrane proteins. *J Mol Biol* 2005;346:377–85. doi:10.1016/j.jmb.2004.11.036.
- [87] Nilsson J, Persson B, von Heijne G. Comparative analysis of amino acid distributions in integral membrane proteins from 107 genomes. *Proteins* 2005;60:606–16. doi:10.1002/prot.20583.
- [88] Goodsell DS, Olson AJ. Structural Symmetry and Protein Function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000;29:105–53. doi:10.1146/annurev.biophys.29.1.105.
- [89] Engelman DM, Chen Y, Chin CN, Curran AR, Dixon AM, Dupuy AD, et al. Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett* 2003;555:122–5. doi:10.1016/S0014-5793(03)01106-2.
- [90] Liu Y, Gerstein M, Engelman DM. Transmembrane protein domains rarely use covalent domain recombination as an evolutionary mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:3495–7. doi:10.1073/pnas.0307330101.
- [91] Cymer F, Schneider D. Oligomerization of polytopic α -helical membrane proteins: Causes and consequences. *Biol Chem* 2012;393:1215–30. doi:10.1515/hsz-2012-0231.
- [92] Ali MH, Imperiali B. Protein oligomerization: How and why. *Bioorganic Med Chem* 2005;13:5013–20. doi:10.1016/j.bmc.2005.05.037.
- [93] Duarte JM, Biyani N, Baskaran K, Capitani G. An analysis of oligomerization interfaces in transmembrane proteins. *BMC Struct Biol* 2013. doi:10.1186/1472-6807-13-21.
- [94] Stangl M, Schneider D. Functional competition within a membrane: Lipid recognition vs. transmembrane helix oligomerization. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2015. doi:10.1016/j.bbamem.2015.03.011.
- [95] Roman E, González Flecha F. Kinetics and Thermodynamics of Membrane Protein Folding. *Biomolecules* 2014. doi:10.3390/biom4010354.
- [96] Karplus M, Weaver DL. Protein-folding dynamics. *Nature* 1976. doi:10.1038/260404a0.
- [97] Klostermeier D, Rudolph MG. Biophysical chemistry. CRC press; 2018. doi:10.1201/9781315156910.
- [98] Dobson CM. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 15, 2004, p. 3–16. doi:10.1016/j.semcdb.2003.12.008.
- [99] Fersht AR, Daggett V. Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* 2002. doi:10.1016/S0092-8674(02)00620-7.
- [100] Brändén C-I, Tooze J. Introduction to Protein Structure. Garland Science; 1999.
- [101] Tanford C. Protein Denaturation. Part A. Characterization of the Denatured State. *Adv Protein Chem* 1968. doi:10.1016/S0065-3233(08)60401-5.
- [102] Tanford C. Protein Denaturation: Part B. The Transition from Native to Denatured State. *Adv. Protein Chem.*, 1968. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60401-5.
- [103] Gomes CM, Faisca PFN. Protein Folding: An Introduction, Springer; 2019. doi:10.1007/978-

- 3-319-00882-0_1.
- [104] González Flecha FL. Kinetic stability of membrane proteins. *Biophys Rev* 2017. doi:10.1007/s12551-017-0324-0.
- [105] Pace CN, Shaw KL. Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins* 2000.
- [106] Shaw KL, Scholtz JM, Pace CN, Grimsley RG. Determining the Conformational Stability of a Protein Using Urea Denaturation Curves, 2008. doi:10.1007/978-1-59745-367-7_2.
- [107] Fersht A. Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding. 1999. doi:10.1016/S0307-4412(99)00114-4.
- [108] Barrick D. What have we learned from the studies of two-state folders, and what are the unanswered questions about two-state protein folding? *Phys Biol* 2009. doi:10.1088/1478-3975/6/1/015001.
- [109] Paslawski W, Lillelund OK, Kristensen JV, Schafer NP, Baker RP, Urban S, et al. Cooperative folding of a polytopic α -helical membrane protein involves a compact N-terminal nucleus and nonnative loops. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112:7978–83. doi:10.1073/pnas.1424751112.
- [110] Booth PJ, Curnow P. Folding scene investigation: membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2009. doi:10.1016/j.sbi.2008.12.005.
- [111] Baldwin RL. The nature of protein folding pathways: The classical versus the new view. *J Biomol NMR* 1995. doi:10.1007/BF00208801.
- [112] Kim PS, Baldwin RL. Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins. *Annu Rev Biochem* 1990. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.003215.
- [113] Anfinsen CB, Haber E, Sela M, White FH. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci* 1961. doi:10.1073/pnas.47.9.1309.
- [114] Levinthal C. Are there pathways for protein folding. *J Chim Phys* 1968.
- [115] Levinthal C. How to fold graciously. *Mossbauer Spectrosc ...* 1969;24:22–4.
- [116] Karplus M. The Levinthal paradox: Yesterday and today. *Fold Des* 1997;2. doi:10.1016/S1359-0278(97)00067-9.
- [117] Dill KA, Chan HS. From levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol* 1997. doi:10.1038/nsb0197-10.
- [118] Bashford D, Cohen FE, Karplus M, Kuntz ID, Weaver DL. Diffusion-collision model for the folding kinetics of myoglobin. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 1988. doi:10.1002/prot.340040308.
- [119] Ptitsyn OB. How the molten globule became. *Trends Biochem Sci* 1995. doi:10.1016/S0968-0004(00)89081-7.
- [120] Fersht AR. Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc Natl Acad Sci* 2006. doi:10.1073/pnas.92.24.10869.
- [121] Wetlaufer DB. Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins. *Proc Natl Acad Sci* 2006. doi:10.1073/pnas.70.3.697.
- [122] Ben-Tal N, Ben-Shaul A, Nicholls A, Honig B. Free-energy determinants of α -helix insertion

- into lipid bilayers. *Biophys J* 1996. doi:10.1016/S0006-3495(96)79744-8.
- [123] White SH, von Heijne G. How Translocons Select Transmembrane Helices. *Annu Rev Biophys* 2008. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125904.
- [124] Gelamo EL, Itri R, Alonso A, Da Silva JV, Tabak M. Small-angle X-ray scattering and electron paramagnetic resonance study of the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants. *J Colloid Interface Sci* 2004. doi:10.1016/j.jcis.2004.04.065.
- [125] Turro NJ, Lei XG, Ananthapadmanabhan KP, Aronson M. Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant Interactions: The BSA/SDS System. *Langmuir* 1995. doi:10.1021/la00007a035.
- [126] Reynolds JA, Tanford C. The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J Biol Chem* 1970;245:5161–5.
- [127] Lau FW, Bowie JU. A method for assessing the stability of a membrane protein. *Biochemistry* 1997;36:5884–92. doi:10.1021/bi963095j.
- [128] Renthal R. An unfolding story of helical transmembrane proteins. *Biochemistry* 2006;45:14559–66. doi:10.1021/bi0620454.
- [129] Curnow P, Booth PJ. The transition state for integral membrane protein folding. *Proc Natl Acad Sci* 2009. doi:10.1073/pnas.0806953106.
- [130] Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Physiol* 2017. doi:10.1152/ajprenal.2000.278.1.f13.
- [131] Gonen T, Walz T. The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys* 2006. doi:10.1017/S0033583506004458.
- [132] Mukhopadhyay R, Bhattacharjee H, Rosen BP. Aquaglyceroporins: Generalized metalloid channels. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2014. doi:10.1016/j.bbagen.2013.11.021.
- [133] Thomas D, Bron P, Ranchy G, Duchesne L, Cavalier A, Rolland JP, et al. Aquaglyceroporins, one channel for two molecules. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2002. doi:10.1016/S0005-2728(02)00275-X.
- [134] Duran AM, Meiler J. Inverted topologies in membrane proteins: a mini-review. *Comput Struct Biotechnol J* 2013. doi:10.5936/csbj.201308004.
- [135] Fu D, Libson A, Miercke LJW, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, et al. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science (80-)* 2000;290:481–6. doi:10.1126/science.290.5491.481.
- [136] Lu D, Grayson P, Schulten K. Glycerol Conductance and Physical Asymmetry of the *Escherichia coli* Glycerol Facilitator GlpF. *Biophys J* 2003;85:2977–87. doi:10.1016/S0006-3495(03)74718-3.
- [137] Wang Y, Schulten K, Tajkhorshid E. What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure* 2005;13:1107–18. doi:10.1016/j.str.2005.05.005.
- [138] Jensen M, Tajkhorshid E, Schulten K. The mechanism of glycerol conduction in aquaglyceroporins. *Structure* 2001;9:1083–93. doi:10.1016/S0969-2126(01)00668-2.
- [139] De Groot BL, Grubmüller H. Water permeation across biological membranes: Mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science (80-)* 2001. doi:10.1126/science.1062459.
- [140] Engel A, Stahlberg H. Aquaglyceroporins: Channel proteins with a conserved core, multiple

- functions, and variable surfaces. *Int Rev Cytol* 2002. doi:10.1016/S0074-7696(02)15006-6.
- [141] Hayashi S, Lin ECC. Capture of glycerol by cells of *Escherichia coli*. *BBA - Biophys Incl Photosynth* 1965. doi:10.1016/0926-6585(65)90056-7.
- [142] Verkman AS. Aquaporins at a glance. *J Cell Sci* 2011. doi:10.1242/jcs.079467.
- [143] Chou CL, Knepper MA, Van Hoek AN, Brown D, Yang B, Ma T, et al. Reduced water permeability and altered ultrastructure in thin descending limb of Henle in aquaporin-1 null mice. *J Clin Invest* 1999. doi:10.1172/JCI5704.
- [144] Lei L, Wang W, Jia Y, Su L, Zhou H, Verkman AS, et al. Aquaporin-3 deletion in mice results in renal collecting duct abnormalities and worsens ischemia-reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2017. doi:10.1016/j.bbadis.2017.03.012.
- [145] Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001. doi:10.1165/ajrcmb.24.3.4367.
- [146] Oklinski MK, Skowronski MT, Skowronska A, Rützler M, Nørgaard K, Nieland JD, et al. Aquaporins in the spinal cord. *Int J Mol Sci* 2016. doi:10.3390/ijms17122050.
- [147] Chu H, Huang C, Ding H, Dong J, Gao Z, Yang X, et al. Aquaporin-4 and cerebrovascular diseases. *Int J Mol Sci* 2016. doi:10.3390/ijms17081249.
- [148] Saadoun S, Papadopoulos MC. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience* 2010. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.019.
- [149] Francis P, Berry V, Bhattacharya S, Moore A. Congenital progressive polymorphic cataract caused by a mutation in the major intrinsic protein of the lens, MIP (AQP0). *Br J Ophthalmol* 2000. doi:10.1136/bjo.84.12.1376.
- [150] Loonen AJM, Knoers NVAM, van Os CH, Deen PMT. Aquaporin 2 Mutations in Nephrogenic Diabetes Insipidus. *Semin Nephrol* 2008. doi:10.1016/j.semnephrol.2008.03.006.
- [151] Tamarappoo BK, Yang B, Verkman AS. Misfolding of mutant aquaporin-2 water channels in nephrogenic diabetes insipidus. *J Biol Chem* 1999. doi:10.1074/jbc.274.49.34825.
- [152] Lagrée V, Froger A, Deschamps S, Pellerin I, Delamarche C, Bonnec G, et al. Oligomerization state of water channels and glycerol facilitators: Involvement of loop E. *J Biol Chem* 1998;273:33949–53. doi:10.1074/jbc.273.51.33949.
- [153] Smith BL, Agre P. Erythrocyte M(r) 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J Biol Chem* 1991.
- [154] Klein N, Trefz M, Schneider D. Covalently Linking Oligomerization-Impaired GlpF Protomers Does Not Completely Re-establish Wild-Type Channel Activity. *Int J Mol Sci* 2019. doi:10.3390/ijms20040927.
- [155] Horsefield R, Nordén K, Fellert M, Backmark A, Törnroth-Horsefield S, Terwisscha van Scheltinga AC, et al. High-resolution x-ray structure of human aquaporin 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008. doi:10.1073/pnas.0801466105.
- [156] Herrera M, Garvin JL. Aquaporins as gas channels. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2011. doi:10.1007/s00424-011-1002-x.
- [157] Uehlein N, Lovisollo C, Siefritz F, Kaldenhoff R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 2003;425:734–7. doi:10.1038/nature02027.

- [158] Fang X, Yang B, Matthay M a, Verkman a S. Evidence against aquaporin-1-dependent CO₂ permeability in lung and kidney. *J Physiol* 2002. doi:10.1113/jphysiol.2001.013813.
- [159] Cymer F, Schneider D. A single glutamate residue controls the oligomerization, function, and stability of the aquaglyceroporin GlpF. *Biochemistry* 2010;49:279–86. doi:10.1021/bi901660t.
- [160] Otto B, Uehlein N, Sdorra S, Fischer M, Ayaz M, Belastegui-Macadam X, et al. Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins. *J Biol Chem* 2010. doi:10.1074/jbc.M110.115881.
- [161] Németh-Cahalan KL, Clemens DM, Hall JE. Regulation of AQP0 water permeability is enhanced by cooperativity. *J Gen Physiol* 2013. doi:10.1085/jgp.201210884.
- [162] Németh-Cahalan KL, Kalman K, Froger A, Hall JE. Zinc Modulation of Water Permeability Reveals that Aquaporin 0 Functions as a Cooperative Tetramer. *J Gen Physiol* 2007. doi:10.1085/jgp.200709826.
- [163] Reichow SL, Gonen T. Noncanonical Binding of Calmodulin to Aquaporin-0: Implications for Channel Regulation. *Structure* 2008. doi:10.1016/j.str.2008.06.011.
- [164] Galka JJ, Baturin SJ, Manley DM, Kehler AJ, O’Neil JD. Stability of the glycerol facilitator in detergent solutions. *Biochemistry* 2008;47:3513–24. doi:10.1021/bi7021409.
- [165] Braun T, Philippsen A, Wirtz S, Borgnia MJ, Agre P, Kühlbrandt W, et al. The 3.7 Å projection map of the glycerol facilitator GlpF: A variant of the aquaporin tetramer. *EMBO Rep* 2000;1:183–9. doi:10.1093/embo-reports/kvd022.
- [166] Baturin S, Galka JJ, Piyadasa H, Gajjaraman S, O’Neil JD. The effects of a protein osmolyte on the stability of the integral membrane protein glycerol facilitator. *Biochem Cell Biol* 2014. doi:10.1139/bcb-2014-0076.
- [167] Veerappan A, Cymer F, Klein N, Schneider D. The tetrameric α -helical membrane protein GlpF unfolds via a dimeric folding intermediate. *Biochemistry* 2011;50:10223–30. doi:10.1021/bi201266m.
- [168] Klein N, Hellmann N, Schneider D. Anionic Lipids Modulate the Activity of the Aquaglyceroporin GlpF. *Biophys J* 2015;109:722–31. doi:10.1016/j.bpj.2015.06.063.
- [169] Neumann J, Klein N, Otzen DE, Schneider D. Folding energetics and oligomerization of polytopic α -helical transmembrane proteins. *Arch Biochem Biophys* 2014;564:281–96. doi:10.1016/j.abb.2014.07.017.
- [170] Klein N. Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen beeinflussen die Oligomerisierung und Funktion des E. coli Aquaglyceroporins GlpF. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2015.
- [171] Gallagher SR, Desjardins PR. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence. *Curr Protoc Mol Biol* 2006;A3:1–21.
- [172] Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:2172–5. doi:10.1073/pnas.86.7.2172.
- [173] Donovan RS, Robinson CW, Click BR. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol* 1996;16:145–54. doi:10.1007/BF01569997.
- [174] Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new

- approach to protein fractionation. *Nature* 1975;258:598–9. doi:10.1038/258598a0.
- [175] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Biol Chem* 1970;227:1–6. doi:10.1038/227680a0.
- [176] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671–5. doi:10.1038/nmeth.2089.
- [177] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc Handb* 2005:571–607. doi:10.1385/1-59259-890-0:571.
- [178] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [179] Kim JE, Arjara G, Richards JH, Gray HB, Winkler JR. Probing folded and unfolded states of outer membrane protein A with steady-state and time-resolved tryptophan fluorescence. *J Phys Chem B* 2006;110:17656–62. doi:10.1021/jp061991r.
- [180] Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer; 2006. doi:10.1007/978-0-387-46312-4.
- [181] Royer CA. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chem Rev* 2006;106:1769–84. doi:10.1021/cr0404390.
- [182] Silva JL, Miles EW, Weber G. Pressure dissociation and conformational drift of the β dimer of tryptophan synthase. *Biochemistry* 1986;25:5780–6. doi:10.1021/bi00367a065.
- [183] Jameson DM. Spectral Center of Mass. *Introd. to Fluoresc.*, Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, LLC; 2014, p. 67.
- [184] Royer CA, Mann CJ, Matthews CR. Resolution of the fluorescence equilibrium unfolding profile of trp aporepressor using single tryptophan mutants. *Protein Sci* 1993;2:1844–52. doi:10.1002/pro.5560021106.
- [185] Paslawski W, Lillielund OK, Kristensen JV, Schafer NP, Baker RP, Urban S, et al. Cooperative folding of a polytopic α -helical membrane protein involves a compact N-terminal nucleus and nonnative loops. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112:7978–83. doi:10.1073/pnas.1424751112.
- [186] Huysmans GHM, Baldwin SA, Brockwell DJ, Radford SE. The transition state for folding of an outer membrane protein. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:4099–104. doi:10.1073/pnas.0911904107.
- [187] Hong H, Tamm LK. Elastic coupling of integral membrane protein stability to lipid bilayer forces. *Proc Natl Acad Sci* 2004. doi:10.1073/pnas.0400358101.
- [188] Kelly SMMM, Price NCCC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* 2000;1:349–84. doi:10.2174/1389203003381315.
- [189] Eccleston JF, Martin SR, Schilstra MJ. Rapid Kinetic Techniques. *Methods Cell Biol* 2008;84:445–77. doi:10.1016/S0091-679X(07)84015-5.
- [190] Eccleston JF, Hutchinson JP, White HD. Stopped-flow Techniques. In: Harding SE, Chowdry BZ, editors. *Protein-Ligand Interact. Spectrosc.*, Oxford, U.K.: Oxford University Press; 2001, p. 201–37.

- [191] Koch AL. Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic challenge. *J Bacteriol* 1984;159:919–24.
- [192] Linke D, Frank J, Pope MS, Soll J, Ilkavets I, Fromme P, et al. Folding Kinetics and Structure of OEP16. *Biophys J* 2004;86:1479–87. doi:10.1016/S0006-3495(04)74216-2.
- [193] Stansfeld PJ, Goose JE, Caffrey M, Carpenter EP, Parker JL, Newstead S, et al. MemProtMD: Automated Insertion of Membrane Protein Structures into Explicit Lipid Membranes. *Structure* 2015. doi:10.1016/j.str.2015.05.006.
- [194] Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci* 2009. doi:10.1073/pnas.0813167106.
- [195] Ulmschneider MB, Sansom MSP. Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2001. doi:10.1016/S0005-2736(01)00299-1.
- [196] Hong H, Park S, Jiménez RHF, Rinehart D, Tamm LK. Role of aromatic side chains in the folding and thermodynamic stability of integral membrane proteins. *J Am Chem Soc* 2007;129:8320–7. doi:10.1021/ja068849o.
- [197] Anjana R, Vaishnavi MK, Sherlin D, Kumar SP, Naveen K, Kanth PS, et al. Aromatic-aromatic interactions in structures of proteins and protein-DNA complexes: a study based on orientation and distance. *Bioinformatics* 2012;8:1220–4. doi:10.6026/97320630081220.
- [198] McGaughey GB, Gagné M, Rappé AK. π -Stacking interactions. Alive and well in proteins. *J Biol Chem* 1998;273:15458–63. doi:10.1074/jbc.273.25.15458.
- [199] Bhuyan AK. On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. *Biopolymers* 2010. doi:10.1002/bip.21318.
- [200] Mortimer CE, Müller U. *Chemie - Das Basiswissen der Chemie*. Thieme; 2003. doi:10.1055/b-002-54081.
- [201] Moon CP, Kwon S, Fleming KG. Overcoming hysteresis to attain reversible equilibrium folding for outer membrane phospholipase A in phospholipid bilayers. *J Mol Biol* 2011;413:484–94. doi:10.1016/j.jmb.2011.08.041.
- [202] Street TO, Courtemanche N, Barrick D. Protein Folding and Stability Using Denaturants. *Methods Cell Biol* 2008;84:295–325. doi:10.1016/S0091-679X(07)84011-8.
- [203] Baldwin RL. On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Fold Des* 1996. doi:10.1016/S1359-0278(96)00003-X.
- [204] Kaya H, Chan HS. Origins of Chevron Rollovers in Non-Two-State Protein Folding Kinetics. *Phys Rev Lett* 2003. doi:10.1103/PhysRevLett.90.258104.
- [205] Wright CF, Lindorff-Larsen K, Randles LG, Clarke J. Parallel protein-unfolding pathways revealed and mapped. *Nat Struct Biol* 2003;10:658–62. doi:10.1038/nsb947.
- [206] Aghera N, Udgaonkar JB. Kinetic studies of the folding of heterodimeric monellin: Evidence for switching between alternative parallel pathways. *J Mol Biol* 2012. doi:10.1016/j.jmb.2012.04.019.
- [207] Klein N, Neumann J, O’Neil JD, Schneider D. Folding and stability of the aquaglyceroporin GlpF: Implications for human aqua(glycero)porin diseases. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2015;1848:622–33. doi:10.1016/j.bbamem.2014.11.015.
- [208] Neumann J, Klein N, Schneider D. Membranproteinfaltung: Wie falten Membranproteine?

- Schritt für schritt? *BioSpektrum* 2012;18:146–8. doi:10.1007/s12268-012-0154-3.
- [209] Plasencia I, Survery S, Ibragimova S, Hansen JS, Kjellbom P, Helix-Nielsen C, et al. Structure and stability of the spinach aquaporin SoPIP2;1 in detergent micelles and lipid membranes. *PLoS One* 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0014674.
- [210] Garavito RM, Ferguson-Miller S. Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *J Biol Chem* 2001;276:32403–6. doi:10.1074/jbc.R100031200.
- [211] Ridder ANJA, Morein S, Stam JG, Kühn A, De Kruijff B, Killian JA. Analysis of the role of interfacial tryptophan residues in controlling the topology of membrane proteins. *Biochemistry* 2000;39:6521–8. doi:10.1021/bi000073v.
- [212] Killian JA, Von Heijne G. How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem Sci* 2000;25:429–34. doi:10.1016/S0968-0004(00)01626-1.
- [213] Domene C, Vemparala S, Klein ML, Vénien-Bryan C, Doyle DA. Role of aromatic localization in the gating process of a potassium channel. *Biophys J* 2006;90. doi:10.1529/biophysj.105.072116.
- [214] Wang Y, Cohen J, Boron WF, Schulten K, Tajkhorshid E. Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics. *J Struct Biol* 2007;157:534–44. doi:10.1016/j.jsb.2006.11.008.
- [215] Fischer G, Kosinska-Eriksson U, Aponte-Santamaría C, Palmgren M, Geijer C, Hedfalk K, et al. Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 angstrom reveals a novel gating mechanism. *PLoS Biol* 2009;7:e1000130. doi:10.1371/journal.pbio.1000130.
- [216] Nollert P, Harries WEC, Fu D, Miercke LJW, Stroud RM. Atomic structure of a glycerol channel and implications for substrate permeation in aqua(glycero)porins. *FEBS Lett* 2001;504:112–7. doi:10.1016/S0014-5793(01)02710-7.
- [217] Walther D, Eisenhaber F, Argos P. Principles of helix-helix packing in proteins: The helical lattice superposition model. *J Mol Biol* 1996;255:536–53. doi:10.1006/jmbi.1996.0044.
- [218] Duchesne L, Pellerin I, Delamarche C, Deschamps S, Lagrée V, Froger A, et al. Role of C-terminal domain and transmembrane helices 5 and 6 in function and quaternary structure of major intrinsic proteins: Analysis of aquaporin/glycerol facilitator chimeric proteins. *J Biol Chem* 2002;277:20598–604. doi:10.1074/jbc.M201179200.
- [219] Buck TM, Wagner J, Grund S, Skach WR. A novel tripartite motif involved in aquaporin topogenesis, monomer folding and tetramerization. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:762–9. doi:10.1038/nsmb1275.
- [220] Kitchen P, Conner MT, Bill RM, Conner AC. Structural determinants of oligomerization of the aquaporin-4 channel. *J Biol Chem* 2016;291:6858–71. doi:10.1074/jbc.M115.694729.
- [221] Mathai JC, Agre P. Hourglass pore-forming domains restrict aquaporin-1 tetramer assembly. *Biochemistry* 1999;38:923–8. doi:10.1021/bi9823683.
- [222] Beitz E. Aquaporins from pathogenic protozoan parasites: structure, function and potential for chemotherapy. *Biol Cell* 2005;97:373–83. doi:10.1042/BC20040095.
- [223] Bogan AA, Thorn KS. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* 1998;280:1–9. doi:10.1006/jmbi.1998.1843.
- [224] Rasmussen A, Rasmussen T, Edwards MD, Schauer D, Schumann U, Miller S, et al. The role of tryptophan residues in the function and stability of the mechanosensitive channel MscS from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 2007;46:10899–908. doi:10.1021/bi701056k.

- [225] Trefz M, Keller R, Vogt M, Schneider D. The GlpF residue Trp219 is part of an amino-acid cluster crucial for aquaglyceroporin oligomerization and function. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2018;1860. doi:10.1016/j.bbamem.2017.10.018.
- [226] Verma RK, Prabh ND, Sankararamkrishnan R. Intra-helical salt-bridge and helix destabilizing residues within the same helical turn: Role of functionally important loop e half-helix in channel regulation of major intrinsic proteins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2015;1848:1436–49. doi:10.1016/j.bbamem.2015.03.013.
- [227] Jensen MO, Park S, Tajkhorshid E, Schulten K. Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin GlpF. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:6731–6. doi:10.1073/pnas.102649299.
- [228] Newby ZER, O'Connell III J, Robles-Colmenares Y, Khademi S, Miercke LJ, Stroud RM. Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Struct & Mol Biol* 2008. doi:10.1038/nsmb.1431.
- [229] Jozefkowicz C, Rosi P, Sigaut L, Soto G, Pietrasanta LI, Amodeo G, et al. Loop A Is Critical for the Functional Interaction of Two Beta vulgaris PIP Aquaporins. *PLoS One* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0057993.
- [230] Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, et al. Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 2006;439:688–94. doi:10.1038/nature04316.
- [231] Uzcategui NL, Zhou Y, Figarella K, Ye J, Mukhopadhyay R, Bhattacharjee H. Alteration in glycerol and metalloid permeability by a single mutation in the extracellular C-loop of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1. *Mol Microbiol* 2008;70:1477–86. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06494.x.
- [232] Beitz E, Pavlovic-Djuranovic S, Yasui M, Agre P, Schultz JE. Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* by mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. doi:10.1073/pnas.0307295101.
- [233] Espinoza-Fonseca LM. Aromatic residues link binding and function of intrinsically disordered proteins. *Mol Biosyst* 2012. doi:10.1039/c1mb05239j.
- [234] Gromiha MM, Suwa M. Structural analysis of residues involving cation- π interactions in different folding types of membrane proteins. *Int J Biol Macromol* 2005. doi:10.1016/j.ijbiomac.2004.12.001.
- [235] Savage DF, O'Connell JD, Miercke LJW, Finer-Moore J, Stroud RM. Structural context shapes the aquaporin selectivity filter. *Proc Natl Acad Sci* 2010. doi:10.1073/pnas.1009864107.
- [236] Walters J, Milam SL, Clark AC. Practical Approaches to Protein Folding and Assembly. *Methods Enzym* 2009. doi:10.1016/S0076-6879(08)04201-8.Practical.
- [237] Street TO, Courtemanche N, Barrick D. Protein Folding and Stability Using Denaturants. *Methods Cell Biol* 2008. doi:10.1016/S0091-679X(07)84011-8.
- [238] Popot JL. Folding membrane proteins in vitro: A table and some comments. *Arch Biochem Biophys* 2014. doi:10.1016/j.abb.2014.06.029.
- [239] Di Bartolo N, Compton ELR, Warne T, Edwards PC, Tate CG, Schertler GFX, et al. Complete reversible refolding of a G-protein coupled receptor on a solid support. *PLoS One* 2016. doi:10.1371/journal.pone.0151582.
- [240] Harris NJ, Reading E, Ataka K, Grzegorzewski L, Charalambous K, Liu X, et al. Structure

- formation during translocon-unassisted co-translational membrane protein folding. *Sci Rep* 2017. doi:10.1038/s41598-017-08522-9.
- [241] Foster W, Helm A, Turnbull I, Gulati H, Yang B, Verkman AS, et al. Identification of sequence determinants that direct different intracellular folding pathways for aquaporin-1 and aquaporin-4. *J Biol Chem* 2000. doi:10.1074/jbc.M000165200.
- [242] Virkki MT, Agrawal N, Edsbäcker E, Cristobal S, Elofsson A, Kauko A. Folding of aquaporin 1: Multiple evidence that helix 3 can shift out of the membrane core. *Protein Sci* 2014. doi:10.1002/pro.2483.
- [243] Mukhopadhyay R, Mandal G, Atluri VSR, Figarella K, Uzcategui NL, Zhou Y, et al. The role of alanine 163 in solute permeability of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1. *Mol Biochem Parasitol* 2011. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.09.007.
- [244] Zhou Y, Mandal G, Atluri VSR, Beitz E, Mukhopadhyay R. Alanine 163 in loop C of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1 resides near the pore mouth of the channel. *Int J Infect Dis* 2010. doi:10.1016/j.ijid.2010.02.601.
- [245] Aponte-Santamaría C, Hub JS, De Groot BL. Dynamics and energetics of solute permeation through the *Plasmodium falciparum* aquaglyceroporin. *Phys Chem Chem Phys* 2010. doi:10.1039/c004384m.
- [246] Pan Y, Piyadasa H, O'Neil JD, Konermann L. Conformational dynamics of a membrane transport protein probed by H/D exchange and covalent labeling: The glycerol facilitator. *J Mol Biol* 2012. doi:10.1016/j.jmb.2011.12.052.
- [247] Karshikoff A, Nilsson L, Ladenstein R. Rigidity versus flexibility: The dilemma of understanding protein thermal stability. *FEBS J* 2015. doi:10.1111/febs.13343.
- [248] Mattice WL, Riser JM, Clark DS. Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry* 1976;15:4264–72. doi:10.1021/bi00664a020.
- [249] Barrera FN, Renart ML, Molina ML, Poveda JA, Encinar JA, Fernández AM, et al. Unfolding and refolding in vitro of a tetrameric, α -helical membrane protein: The prokaryotic potassium channel KcsA. *Biochemistry* 2005;44:14344–52. doi:10.1021/bi050845t.
- [250] Robinson JM, Deutsch C. Coupled tertiary folding and oligomerization of the T1 domain of Kv channels. *Neuron* 2005. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.043.
- [251] Smith CJ, Clarke AR, Chia WN, John Holbrook J, Irons LI, Atkinson T. Detection and Characterization of Intermediates in the Folding of Large Proteins by the Use of Genetically Inserted Tryptophan Probes. *Biochemistry* 1991. doi:10.1021/bi00218a021.
- [252] Hansen JS, Vararattanavech A, Plasencia I, Greisen P, Bomholt J, Torres J, et al. Interaction between sodium dodecyl sulfate and membrane reconstituted aquaporins: A comparative study of spinach SoPIP2;1 and *E. coli* AqpZ. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2011;1808:2600–7. doi:10.1016/j.bbamem.2011.05.021.
- [253] Ye C, Wang Z, Lu W, Wei Y. Unfolding study of a trimeric membrane protein AcrB. *Protein Sci* 2014;23:897–905. doi:10.1002/pro.2471.
- [254] Booth PJ, Curnow P. Membrane proteins shape up: understanding in vitro folding. *Curr Opin Struct Biol* 2006. doi:10.1016/j.sbi.2006.06.004.
- [255] Booth PJ, Templer RH, Meijberg W, Allen SJ, Curran AR, Lorch M. In vitro studies of membrane protein folding. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2001.

- doi:10.1080/20014091074246.
- [256] Marti T. Refolding of bacteriorhodopsin from expressed polypeptide fragments. *J Biol Chem* 1998. doi:10.1074/jbc.273.15.9312.
- [257] Di Bartolo ND, Hvorup RN, Locher KP, Booth PJ. In vitro folding and assembly of the *Escherichia coli* ATP-binding cassette transporter, BtuCD. *J Biol Chem* 2011. doi:10.1074/jbc.M110.176891.
- [258] Klein-Seetharaman J. Dual role of interactions between membranous and soluble portions of helical membrane receptors for folding and signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2005. doi:10.1016/j.tips.2005.02.009.
- [259] Oikawa K, Lieberman DM, Reithmeier RAF. Conformation and Stability of the Anion Transport Protein of Human Erythrocyte Membranes. *Biochemistry* 1985. doi:10.1021/bi00333a005.
- [260] Tong Y, Hughes D, Placanica L, Buck M. When monomers are preferred: A strategy for the identification and disruption of weakly oligomerized proteins. *Structure* 2005. doi:10.1016/j.str.2004.10.018.
- [261] Otzen DE, Oliveberg M. Burst-phase expansion of native protein prior to global unfolding in SDS. *J Mol Biol* 2002. doi:10.1006/jmbi.2001.5300.
- [262] Roder H, Maki K, Latypov RF, Cheng H, Shastry MCR. Early Events in Protein Folding Explored by Rapid Mixing Methods. *Protein Fold. Handb.*, 2008. doi:10.1002/9783527619498.ch15.
- [263] Takano K. Slow Unfolding Pathway of the Hyperthermophilic Tk-RNase H2 Examined by Pulse Proteolysis Using Mutant Proteins. *Biochem Anal Biochem* 2015. doi:10.4172/2161-1009.1000213.
- [264] Okada J, Okamoto T, Mukaiyama A, Tadokoro T, You DJ, Chon H, et al. Evolution and thermodynamics of the slow unfolding of hyperstable monomeric proteins. *BMC Evol Biol* 2010. doi:10.1186/1471-2148-10-207.
- [265] Trefz M, Keller R, Vogt M, Schneider D. The GlpF residue Trp219 is part of an amino-acid cluster crucial for aquaglyceroporin oligomerization and function. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2017:0–1. doi:10.1016/j.bbamem.2017.10.018.
- [266] Sánchez IE, Kiefhaber T. Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding. *J Mol Biol* 2003. doi:10.1016/S0022-2836(02)01230-5.
- [267] Matouschek A, Kellis JT, Serrano L, Bycroft M, Fersht AR. Transient folding intermediates characterized by protein engineering. *Nature* 1990. doi:10.1038/346440a0.
- [268] Haezebrouck P, Noyelle K, Joniau M, Van Dael H. Kinetic and equilibrium intermediate states are different in LYLA1, a chimera of lysozyme and α -lactalbumin. *J Mol Biol* 1999. doi:10.1006/jmbi.1999.3186.
- [269] Bai Y. Kinetic evidence for an on-pathway intermediate in the folding of cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci* 2002. doi:10.1073/pnas.96.2.477.
- [270] Rimratchada S, McLeish TCB, Radford SE, Paci E. The role of high-dimensional diffusive search, stabilization, and frustration in protein folding. *Biophys J* 2014;106:1729–40. doi:10.1016/j.bpj.2014.01.051.
- [271] Brockwell DJ, Radford SE. Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr Opin Struct Biol* 2007. doi:10.1016/j.sbi.2007.01.003.

- [272] Capaldi AP, Kleanthous C, Radford SE. Im7 folding mechanism: Misfolding on a path to the native state. *Nat Struct Biol* 2002. doi:10.1038/nsb757.
- [273] Religa TL, Markson JS, Mayor U, Freund SMV, Fersht AR. Solution structure of a protein denatured state and folding intermediate. *Nature* 2005. doi:10.1038/nature04054.
- [274] Feng H, Zhou Z, Bai Y. A protein folding pathway with multiple folding intermediates at atomic resolution. *Proc Natl Acad Sci* 2005. doi:10.1073/pnas.0501372102.
- [275] Fersht a R, Itzhaki LS, elMasry NF, Matthews JM, Otzen DE. Single versus parallel pathways of protein folding and fractional formation of structure in the transition state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10426–9.
- [276] Myers JK, Oas TG. Mechanisms of Fast Protein Folding. *Annu Rev Biochem* 2002. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135346.
- [277] McCallister EL, Alm E, Baker D. Critical role of β -hairpin formation in protein G folding. *Nat Struct Biol* 2000. doi:10.1038/77971.
- [278] Nauli S, Kuhlman B, Baker D. Computer-based redesign of a protein folding pathway. *Nat Struct Biol* 2001. doi:10.1038/89638.
- [279] Gianni S, Ivarsson Y, Jemth P, Brunori M, Travaglini-Allocatelli C. Identification and characterization of protein folding intermediates. *Biophys Chem* 2007. doi:10.1016/j.bpc.2007.04.008.
- [280] Wright CF, Steward A, Clarke J. Thermodynamic characterisation of two transition states along parallel protein folding pathways. *J Mol Biol* 2004;338:445–51. doi:10.1016/j.jmb.2004.02.062.

7 Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
$\langle \lambda \rangle$	mittlere Wellenlänge
χ	Stoffmengenanteil, Molenbruch
Å	Ångström
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
BCA	Bicinchoninsäure (engl. <i>bicinchoninic acid</i>)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C-	Carboxy-
CD	Zirkulardichroismus (engl. <i>circular dichroism</i>)
CMC	Kritische Mizellenkonzentration (engl. <i>critical micellar concentration</i>)
CPS	Einheiten pro Sekunde (engl. <i>counts per second</i>)
D	Dimer
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
DLPC	1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPPC	1,2-dipalmytoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
Fa.	Firma
for	Vorwärts (engl. <i>forward</i>)
g	Fallbeschleunigung
GdCl	Guanidiniumchlorid
His6x-tag	Polyhexahistidin-tag
I	Intensität
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

k	Geschwindigkeitskonstante bzw. Flussrate
k,g,norm	Gewichtete, normierte Flussrate
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kcal	Kilokalorien
LB	Luria-Bertani
LMPC	1-myristoyl-2-hydroxy-d27-sn-glycero-3-phosphocholin
M	Monomer
MD	Molekulardynamik (engl. <i>molecular dynamics</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
n	Anzahl der Proben
<i>n.s.</i>	nicht signifikant (engl. <i>not significant</i>)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
norm.	normiert
NPA-Motiv	Asparagin-Prolin-Alanin-Motiv
o.g.	oben genannte
ODx	Optische Dichte bei Wellenlänge x
OG	Octyl- β -D-glucopyranosid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB-ID	Proteindatenbank-Identifikationsnummer (engl. <i>protein data bank identifier</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PSI	Einheit für Druck (engl. <i>pounds per square inch</i>) 1 PSI = 0,07 bar
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	relativ
rel.	relativ
rev	Rückwärts (engl. <i>reverse</i>)
RT	Raumtemperatur (engl. <i>room temperature</i>)
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SFG	Summenfrequenz
sog.	sogenannte
T	Tetramer
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TM	Transmembran
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vis	Sichtbarer (engl. <i>visible</i>) Spektralbereich
wt	Wildtyp
X-ray	Röntgenstrahlung
z.B.	zum Beispiel

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Glycerophospholipids am Beispiel des Phosphatidylcholins.	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lipiddoppelschicht mit integralen Membranproteinen.	6
Abbildung 3: Das Drei-Stufen-Modell der Faltung α -helikaler Membranproteine.	10
Abbildung 4: Beispiel der Energielandschaft einer Entfaltung entsprechend dem Zweizustandsmodell.	16
Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Entfaltungskurve unter Gleichgewichtsbedingungen und eines Chevronplots einer (Ent)faltung nach dem Zweizustandsmodell.	19
Abbildung 6: Faltungstrichter-Modell zur Beschreibung der graduellen Faltung von Proteinen.	21
Abbildung 7: Schematische Darstellung der möglichen SDS-induzierten Denaturierung löslicher Proteine.	23
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Ausbildung gemischter DDM/SDS-Mizellen am Beispiel der Entfaltung eines tetrameren Proteins.	24
Abbildung 9: Topologiemodell des Aquaglyceroporins GlpF als Beispiel für die Topologie von Aqua(glycero)porinen.	26
Abbildung 10: Das Aquaglyceroporin GlpF.	27
Abbildung 11: Funktionale Bestandteile von GlpF.	29
Abbildung 12: Die Monomerisierung des GlpF-Tetramers erfolgt über ein dimeres Intermediat.	31
Abbildung 13: Emissionsspektren von freiem Tryptophan in Wasser und Methanol.	51
Abbildung 14: Schematischer Aufbau einer <i>Stopped-Flow</i> -Apparatur mit UV/Vis-Spektrometer.	54
Abbildung 15: Anordnung der Tryptophane im Mono- und Tetramer von GlpF.	59
Abbildung 16: Methoden zur Bestimmung der Tetramerstabilität einzelner Tryptophanvarianten von GlpF.	61
Abbildung 17: Position der lipidzugewandten Tryptophane 76 und 215 in GlpF.	62
Abbildung 18: Tetramerstabilität der GlpF-Varianten, deren lipidzugewandte Tryptophane 76 und 215 jeweils durch Alanin ersetzt sind.	63
Abbildung 19: Position des Tryptophan 42 in GlpF.	64
Abbildung 20: Tetramerstabilität von GlpF W42A.	64
Abbildung 21: Position des Tryptophan 48 in GlpF.	65
Abbildung 22: Tetramerstabilität der GlpF-Varianten W48A, W48F und W48Y im Vergleich zum GlpF Wildtyp.	66

Abbildung 23: Position des Tryptophan 219 in GlpF.	68
Abbildung 24: Vergleich der Tetramerstabilität der GlpF-Varianten W219A, W219F und W219Y mit der Stabilität des GlpF-Wildtyps.	69
Abbildung 25: Charakteristische Loopregionen des Vestibüls von GlpF.	71
Abbildung 26: Vergleich der Aminosäuresequenz der GlpF-Loopregion WLAGW mit der aus Aquaglyceroporinen und Aquaporinen unterschiedlicher Organismen.	73
Abbildung 27: Untersuchung der Umgebung von Trp 219.	75
Abbildung 28: Änderung der Tryptophanfluoreszenz von GlpF nach Zugabe ansteigender χ_{SDS}	78
Abbildung 29: Untersuchung der Entfaltung von GlpF über Änderungen der mittleren Wellenlänge $\langle\lambda\rangle$	80
Abbildung 30: Einfluss von SDS auf die Sekundärstruktur von GlpF.	82
Abbildung 31: Messung der Änderung der Tertiär- und Quartärstruktur von GlpF wt zu unterschiedlichen Zeitpunkten.	83
Abbildung 32: Verlauf von $\langle\lambda\rangle$ der Variante GlpF W48A und GlpF W48F bei ansteigenden χ_{SDS}	84
Abbildung 33: Änderung der mittleren Wellenlänge unter Einfluss ansteigender χ_{SDS} aller GlpF-Varianten, deren Tryptophan zu Alanin mutiert wurde.	86
Abbildung 34: Untersuchung der Entfaltung um Trp 219.	87
Abbildung 35: Untersuchung der Stabilität verschiedener Bereiche des GlpF-Tetramers.	90
Abbildung 36: Ent- und Rückfaltung des GlpF-Tetramers.	92
Abbildung 37: Untersuchung der Ent- und Rückfaltung der Quartär- und Tertiärstruktur von GlpF.	94
Abbildung 38: Änderung der Fluoreszenzintensität nach Vermischen von GlpF mit SDS.	98
Abbildung 39: Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 aufgetragen gegen χ_{SDS}	99
Abbildung 40: Chevronplot des Verlaufs der Geschwindigkeitskonstante k_2 des GlpF Wildtyps und der Variante GlpF Y105A.	100
Abbildung 41: Relaxationen von GlpF W48F und GlpF W219F im Vergleich zum GlpF wt nach Vermischen mit SDS.	102
Abbildung 42: Radiale Anordnung der lipidzugewandten Tryptophane in GlpF.	107
Abbildung 43: Potenzieller Einfluss von Trp 219 auf die Stabilität des GlpF-Tetramers.	112
Abbildung 44: Mögliche Rolle von Trp 219 als Verbindung von loop E zu loop C.	114
Abbildung 45: Mögliche Interaktionspartner von Trp 219.	116
Abbildung 46: Entfaltung löslicher Bereiche um Trp 219 in der periplasmatischen Vestibülregion von GlpF.	122
Abbildung 47: Resultate zur Entfaltung von GlpF unter „quasi“-Gleichgewichtsbedingungen zusammengefasst in einem Diagramm.	124

Abbildung 48: Schematische Darstellung der Destabilisierung und Entfaltung von GlpF unter dem Einfluss von SDS.....	129
Abbildung 49: Schematische Darstellung der zeitlichen Trennung detergent- und konformationsbedingter Änderungen der Fluoreszenzintensität nach Vermischen von GlpF und SDS mittels des <i>Stopped-Flow</i> -Verfahrens.....	132
Abbildung 50: Einteilung der Entfaltungskinetik von GlpF in drei Phasen.....	133
Abbildung 51: Chevronplot des Verlaufs der Geschwindigkeitskonstante k_2 des GlpF Wildtyps mit charakteristischen Punkten.	135
Abbildung 52: Vorschlag für die Änderung der Energielandschaft der SDS-induzierten Entfaltung von GlpF.....	139
Abbildung 53: pRSet GlpF-Plasmid.	167
Abbildung 54: pMal-p2 GlpF-Plasmid.	167
Abbildung 55: Western Blot des GlpF Wildtyps sowie der in dieser Arbeit verwendeten Tryptophanvarianten von GlpF.	171
Abbildung 56: Repräsentatives Polyacrylamidgel der SDS-Titration von GlpF W48F.....	171
Abbildung 57: Repräsentative Polyacrylamidgele der SDS-Titration von GlpF-Varianten, die kein stabiles Tetramer aufweisen.....	172
Abbildung 58: Abbildung 33 mit Fehlerbalken.	173
Abbildung 59: Abbildung 35 mit Fehlerbalken.	173
Abbildung 60: Graphische Darstellung der verwendeten Parameter des Boltzmann-Fits am Beispiel einer sigmoidalen Kurve.	174
Abbildung 61: Graphen der nach (XV) erstellten Fitfunktionen für die in Abbildung 35 gezeigten Entfaltungskurven.	174
Abbildung 62: Unabhängigkeit des GlpF-Tetramerstabilität von der Proteinkonzentration.	175
Abbildung 63: Vergleich ausgewählter Aquaglyceroporin-Sequenzen.....	177
Abbildung 64: Emissionsspektren des GlpF-Wildtyps sowie seiner Varianten, deren Tryptophan jeweils einzeln gegen Alanin ersetzt wurde.	178

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte.....	35
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	36
Tabelle 3: Verwendete Computerprogramme.....	36
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.	36
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Kulturmedien.	37
Tabelle 6: Verwendete Kits.	39
Tabelle 7: Verwendete Marker und Größenstandards.....	39
Tabelle 8: Verwendete Antikörper.	40
Tabelle 9: Verwendete Enzyme.	40
Tabelle 10: Verwendete Plasmide.	40
Tabelle 11: Verwendete Primer.....	40
Tabelle 12: Verwendete Bakterienstämme.	41
Tabelle 13: Zusammensetzung eines 50 μ L PCR-Reaktionsansatzes.	42
Tabelle 14: Verwendetes PCR-Programm.	43
Tabelle 15: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele nach Laemmli.....	47
Tabelle 16: Eingesetzte Extinktionskoeffizienten für die erstellten GlpF-Varianten.	49
Tabelle 17: Verwendete Parameter für die CD-Spektroskopie.	53
Tabelle 18: Parameter der <i>Stopped-Flow</i> -Apparatur für die Aktivitätsmessung von GlpF.	55
Tabelle 19: Parameter der <i>Stopped-Flow</i> -Apparatur für die Entfaltungsmessung von GlpF.....	57
Tabelle 20: Parameter der kinetischen Entfaltung des GlpF-Wildtyps und von GlpF Y105A.....	101
Tabelle 21: Zusammenfassung der relevanten Parameter der erstellten GlpF-Varianten hinsichtlich ihrer Tetramerstabilität.	105
Tabelle 22: Pipettierschema für 200 μ L-Titrationsansätze der SDS-Titration.	168
Tabelle 23: Molenbruch und SDS-Konzentration der Proben bei SDS-PAGE-Analyse der SDS-Titrationsansätze.....	168
Tabelle 24: Molenbrüche und SDS-Konzentrationen der verwendeten Titrationsansätze und der entsprechenden Werte der SDS-PAGE für die Rückfaltungsmessung.	169
Tabelle 25: Eingesetzte SDS-Konzentrationen für die Entfaltungsmessung mittels <i>Stopped-Flow</i> -Apparatur sowie der in der jeweiligen Messküvette enthaltene SDS-Molenbruch χ_{SDS}	170
Tabelle 26: Wendepunkte c_m der in Abbildung 61 gezeigten Graphen.....	175



10 Anhang

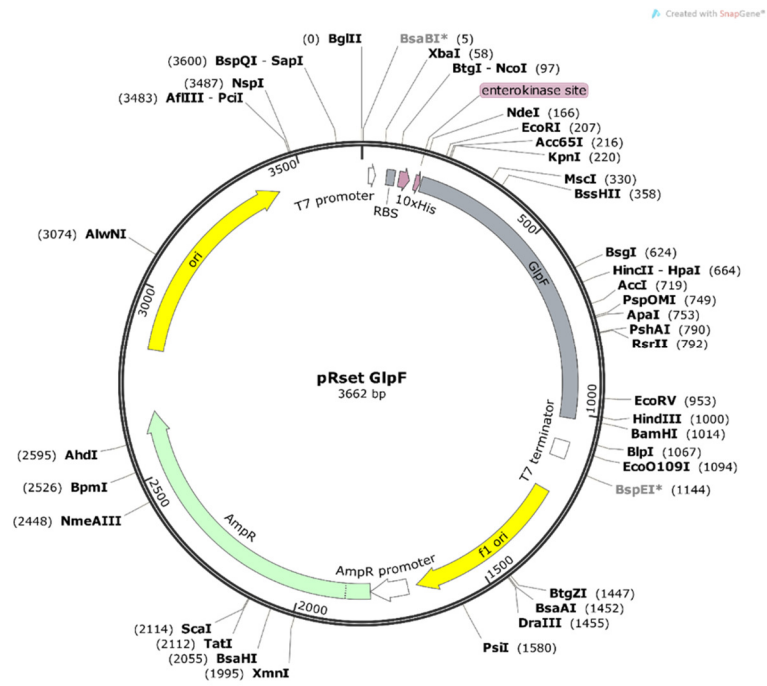


Abbildung 53: pRset GlpF-Plasmid.

Angegeben sind die inserierten Sequenzen, als auch die Schnittstellen, die einmalig im Plasmid vorkommen. GlpF wurde über die Schnittstellen NdeI und BamHI inseriert.

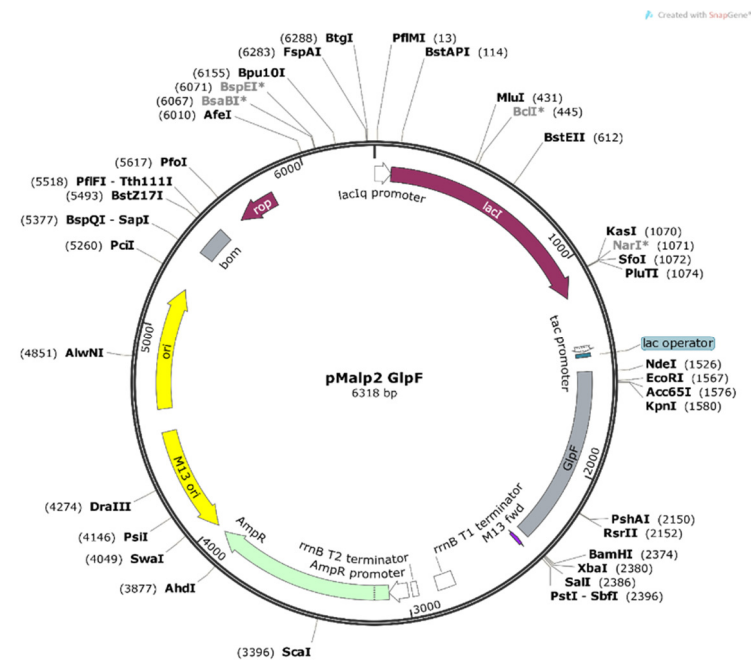


Abbildung 54: pMal-p2 GlpF-Plasmid.

Angegeben sind die inserierten Sequenzen, als auch die Schnittstellen, die einmalig im Plasmid vorkommen. GlpF wurde über die Schnittstellen NdeI und BamHI inseriert.

Tabelle 22: Pipettierschema für 200 μL -Titrationsansätze der SDS-Titration.

Die Volumina der SDS-Lösungen wurden aus unterschiedlichen Stammlösungen mit jeweils 500 mM (dunkelgrau), 50 mM (hellgrau) und 5 mM (weiß) SDS (in Phosphatpuffer gelöst) entnommen.

χ_{SDS} Titrationsansatz	c_{SDS} Titrationsansatz, mM	$V_{\text{SDS-Stammlösung}}$, μL	$V_{\text{Phosphatpuffer}}$, μL
0,000	0,00	0,00	38,00
0,040	0,21	8,33	29,67
0,080	0,43	17,39	20,61
0,120	0,68	27,27	10,73
0,160	0,95	38,10	0
0,200	1,25	5,00	33,00
0,240	1,58	6,32	31,68
0,280	1,94	7,78	30,22
0,320	2,35	9,41	28,59
0,360	2,81	11,25	26,75
0,400	3,33	13,33	24,67
0,440	3,93	15,71	22,29
0,480	4,62	18,46	19,54
0,520	5,42	21,67	16,33
0,560	6,36	25,45	12,55
0,600	7,50	30,00	8,00
0,640	8,89	35,56	2,44
0,680	10,63	4,25	33,75
0,720	12,86	5,14	32,86
0,760	15,83	6,33	31,67
0,800	20,00	8,00	30,00
0,840	26,25	10,50	27,50
0,880	36,67	14,67	23,33
0,920	57,50	23,00	15,00
0,950	95,00	38,00	0,00

Tabelle 23: Molenbruch und SDS-Konzentration der Proben bei SDS-PAGE-Analyse der SDS-Titrationsansätze.

χ_{SDS} Titrationsansatz	χ_{SDS} (Titrationsansatz und SDS-Laufpuffer)	c_{SDS} (Titrationsansatz und SDS-Laufpuffer), mM
0,000	0,412	3,50
0,240	0,504	5,08
0,440	0,619	8,12
0,520	0,664	9,86
0,560	0,688	11,00
0,600	0,712	12,39
0,640	0,739	14,13
0,680	0,766	16,36

χ_{SDS} Titrationsansatz	χ_{SDS} (Titrationsansatz und SDS-Laufpuffer)	c_{SDS} (Titrationsansatz und SDS-Laufpuffer), mM
0,720	0,795	19,33
0,760	0,825	23,50
0,800	0,856	29,75
0,840	0,889	40,17
0,880	0,924	61,00
0,920	0,951	98,50

Tabelle 24: Molenbrüche und SDS-Konzentrationen der verwendeten Titrationsansätze und der entsprechenden Werte der SDS-PAGE für die Rückfaltungsmessung.

χ_{SDS} Titrationsansatz,	c_{SDS} Titrationsansatz, mM	χ_{SDS} (Titrationsansatz im SDS-Laufpuffer)	c_{SDS} (Titrationsansatz im SDS-Laufpuffer), mM
0,000	0,00	0,412	3,50
0,020	0,10	0,419	3,60
0,042	0,22	0,426	3,72
0,064	0,34	0,434	3,84
0,087	0,48	0,443	3,98
0,111	0,63	0,452	4,13
0,136	0,79	0,462	4,29
0,163	0,97	0,472	4,47
0,190	1,18	0,483	4,68
0,220	1,41	0,495	4,91
0,250	1,67	0,508	5,17
0,282	1,96	0,522	5,46
0,316	2,31	0,537	5,81
0,351	2,71	0,554	6,21
0,389	3,18	0,572	6,68
0,429	3,75	0,592	7,25
0,471	4,44	0,614	7,94
0,515	5,31	0,638	8,81
0,563	6,43	0,665	9,93
0,613	7,92	0,695	11,42
0,667	10,00	0,730	13,50
0,724	13,13	0,769	16,63
0,786	18,33	0,814	21,83
0,852	28,75	0,866	32,25
0,905	47,50	0,911	51,00

Tabelle 25: Eingesetzte SDS-Konzentrationen für die Entfaltungsmessung mittels *Stopped-Flow*-Apparatur sowie der in der jeweiligen Messküvette enthaltene SDS-Molenbruch χ_{SDS} .

χ_{SDS} final (nach Vermischung)	c_{SDS} eingesetzt, mM
0	0
0,04	0,42
0,08	0,87
0,12	1,36
0,16	1,9
0,2	2,5
0,24	3,16
0,28	3,89
0,32	4,71
0,36	5,63
0,4	6,66
0,44	7,86
0,48	9,24
0,52	10,84
0,56	12,72
0,6	15
0,64	17,78
0,68	21,26
0,72	25,72
0,76	31,66
0,8	40
0,84	52,5
0,88	73,34
0,92	115
0,95	190

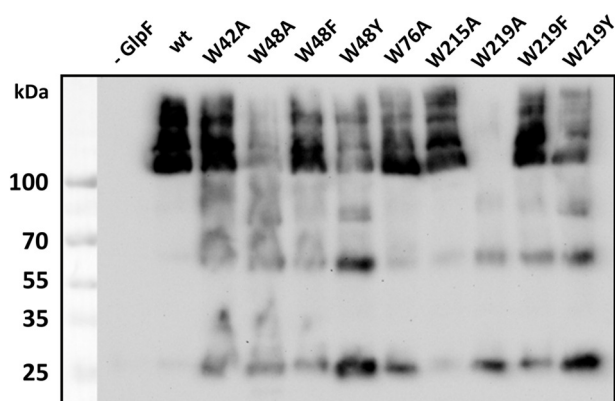


Abbildung 55: Western Blot des GlpF Wildtyps sowie der in dieser Arbeit verwendeten Tryptophanvarianten von GlpF.

Die präparierten Membranfraktionen der für die Aktivitätsmessungen verwendeten SK46-Zellen wurden mittels seminativer SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Western Blot-Apparatur auf einer PVDF-Membran immobilisiert. GlpF wurde mithilfe eines proteinspezifischen Antikörpers immunochemisch nachgewiesen. Die Bande bei 100 kDa entspricht dem GlpF-Tetramer, wohingegen die darunter liegenden Banden jeweils einem potenziellen Trimer sowie dem Di- und dem Monomer zuzuordnen sind. Banden über 100 kDa sind auf reinigungsbedingte oligomere Strukturen höherer Ordnung zurückzuführen.

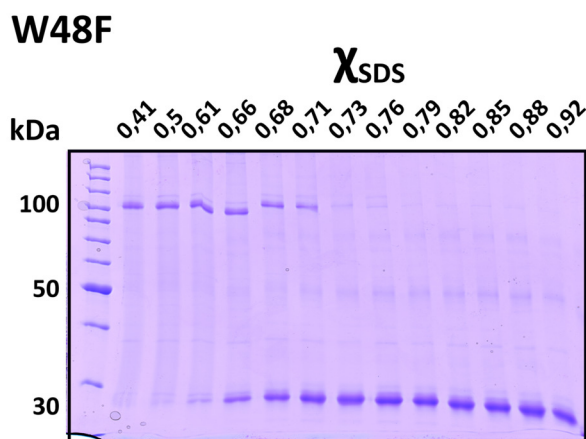


Abbildung 56: Repräsentatives Polyacrylamidgel der SDS-Titration von GlpF W48F.

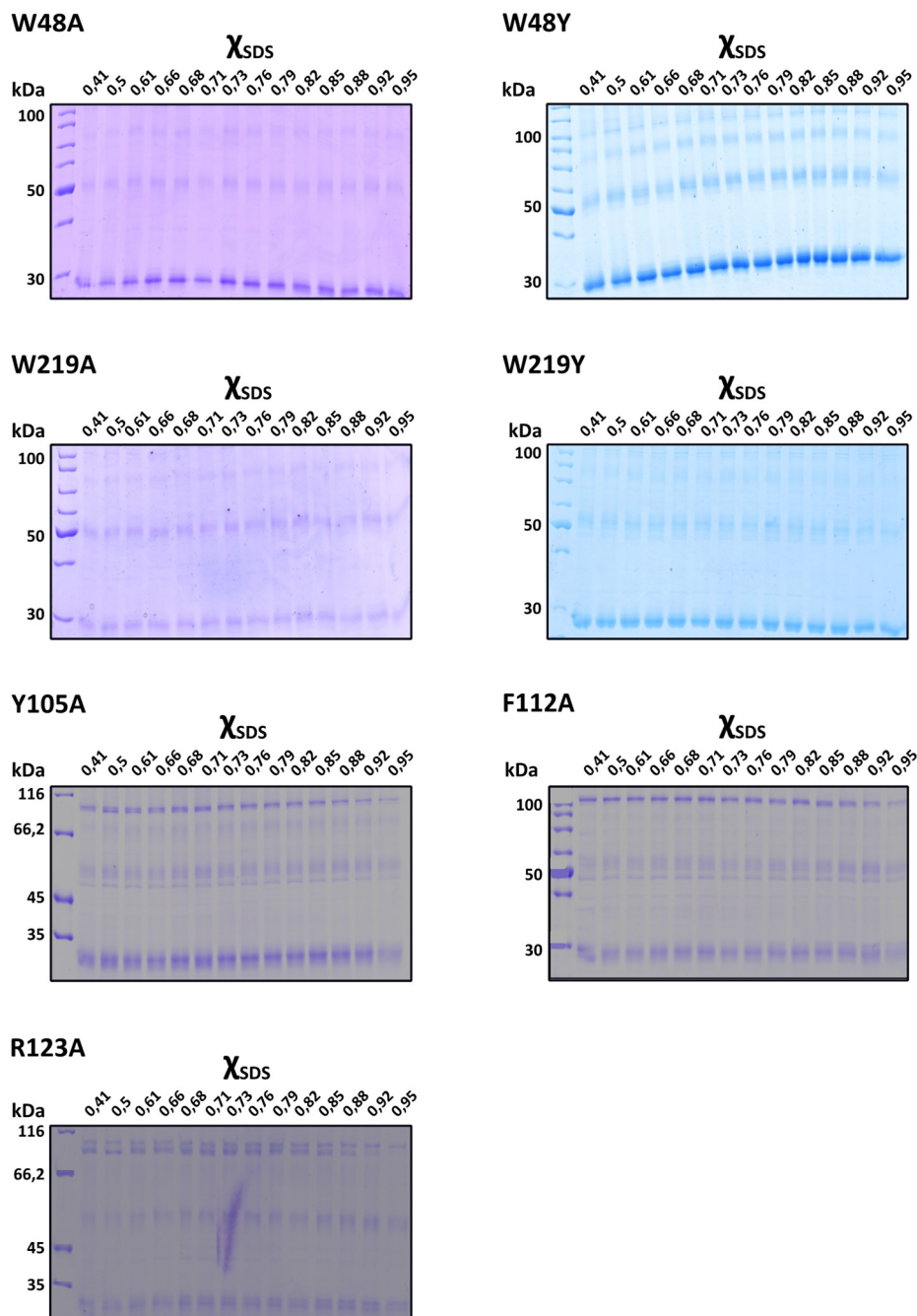


Abbildung 57: Repräsentative Polyacrylamidgele der SDS-Titration von GlpF-Varianten, die kein stabiles Tetramer aufweisen.

Eine Bande bei 100 kDa, die dem Tetramer entspricht, wird bei diesen Varianten nicht detektiert. Die Bande auf Höhe von ~ 100 kDa, die im Polyacrylamidgel der SDS-Titration von GlpF Y105A, F112A und R123A zu erkennen ist, lässt sich mittels Western Blot-Analyse nicht GlpF zuordnen. Die Polyacrylamidgel-Analyse der gezeigten Varianten zeigt eine Verteilung der Banden, die hauptsächlich dem Dimer und Monomer von GlpF zugeordnet werden können. Auch unter Zugabe ansteigenden χ_{SDS} ändert sich die Bandenverteilung nicht.

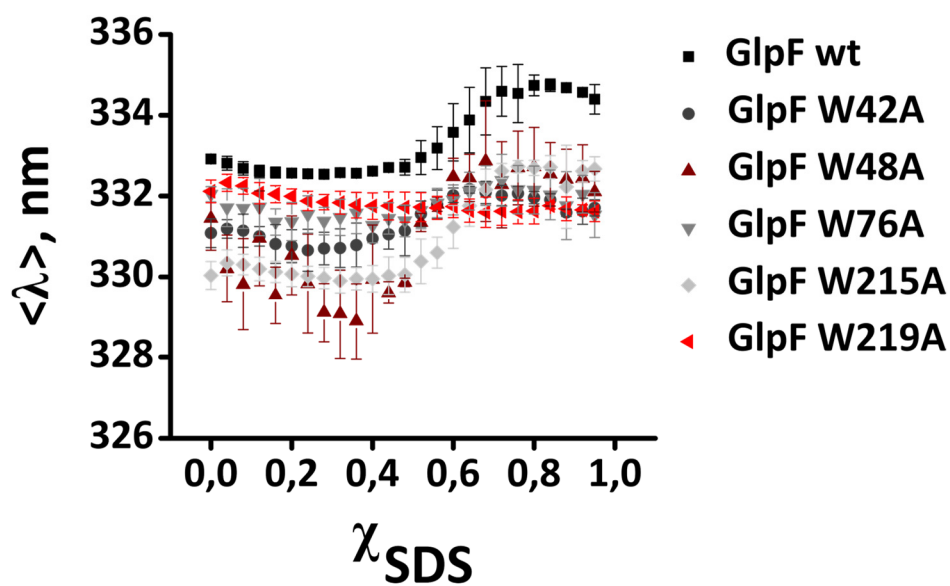


Abbildung 58: Abbildung 33 mit Fehlerbalken.

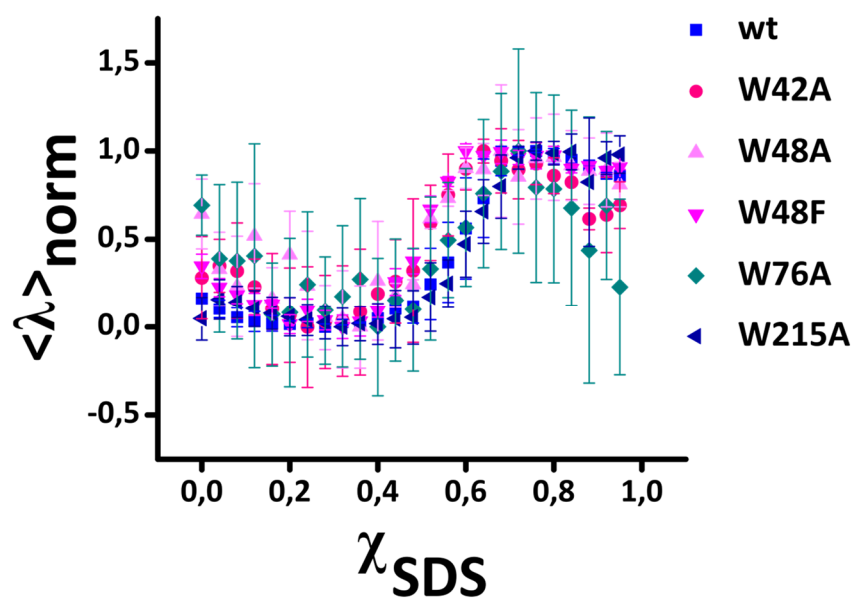
n = 3 \pm SD.

Abbildung 59: Abbildung 35 mit Fehlerbalken.

n = 3 \pm SD.

Boltzmann-Fit

Zur Charakterisierung und Bestimmung relevanter Parameter der in dieser Arbeit erstellten sigmoidalen Kurven, wurde der Boltzmann-Fit entsprechend folgender Gleichung verwendet:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (XIV)$$

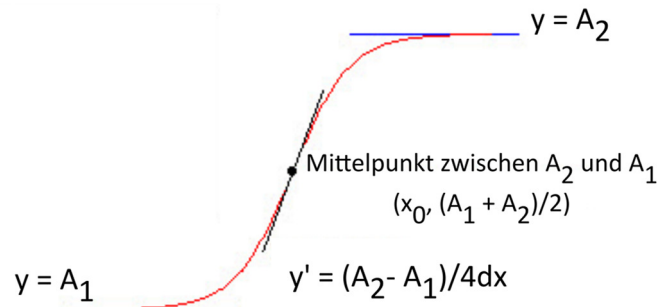


Abbildung 60: Graphische Darstellung der verwendeten Parameter des Boltzmann-Fits am Beispiel einer sigmoidalen Kurve.
Entnommen und verändert aus <https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/Boltzmann-FitFunc> (Stand: 13.01.19).

Aufgrund der häufig nicht horizontal verlaufenden flankierenden Bereiche A_1 und A_2 wurde der Boltzmann-Fit an den abweichenden Verlauf angepasst. Die eingesetzten Terme bezeichnen hierbei lineare Fitfunktionen.

$$y = \frac{((y_1 + m_1x) - (y_2 + m_2x))}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + (y_2 + m_2x) \quad (XV)$$

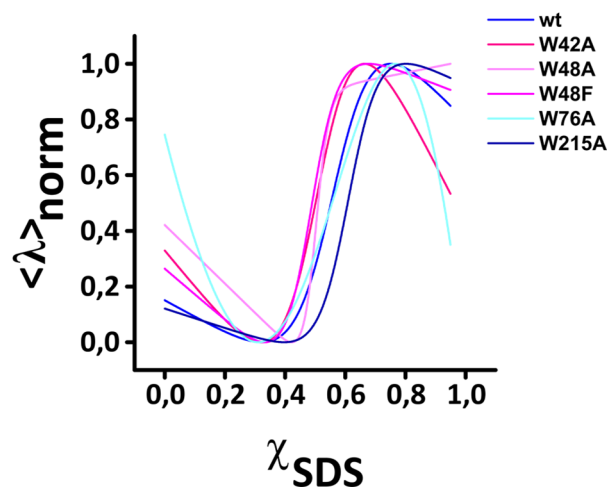


Abbildung 61: Graphen der nach (XV) erstellten Fitfunktionen für die in Abbildung 35 gezeigten Entfaltungskurven.

GIpF wt: $R^2 = 0,99984$; W42A: $R^2 = 0,94664$; W48A: $R^2 = 0,94952$; W48F: $R^2 = 0,99479$; W76A: $R^2 = 0,83942$; W215A: $R^2 = 0,99631$.

Tabelle 26: Wendepunkte c_m der in Abbildung 61 gezeigten Graphen

GlpF - Variante	c_m, χ_{SDS}
wt	0,55
W42A	0,50
W48A	0,51
W48F	0,49
W76A	0,56
W215A	0,60

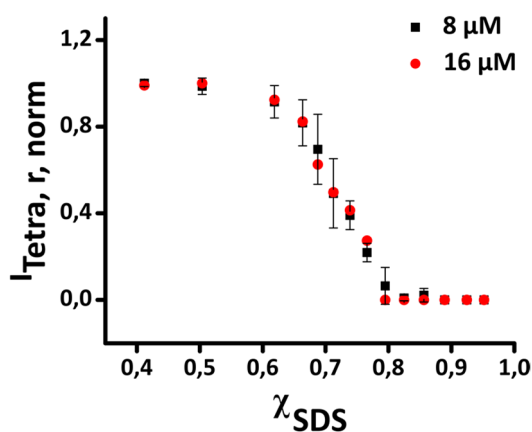


Abbildung 62: Unabhängigkeit des GlpF-Tetramerstabilität von der Proteinkonzentration. Normierte Tetramerbandenintensität der seminativen SDS-PAGE von GlpF verschiedener Konzentrationen unter Zugabe ansteigender χ_{SDS} . Die normierte relative Tetramerbandenintensität von 8 μM sowie 16 μM GlpF nimmt unter Zugabe von SDS in gleichem Maße ab. Auf dieser Grundlage lässt sich die Stabilität des GlpF-Tetramers beider Konzentrationen unter Einfluss von SDS miteinander vergleichen ($n = 3 \pm \text{SD}$).

Anhang

SP|P0AER1|GLPF_ECOL6 -----MS 2
TR|Q4Q6R2|Q4Q6R2_LEIMA MNSPTTmplQCHDAETQLYVDKESPEGLPIGNQMHEEEEDQ---HESKRNFMSQNRWPLY 57
TR|Q7YW71|Q7YW71_LEITA -----MNEEDPQE---KESKWNWMSQSKWPLY 24
SP|P56403|AQP7_RAT -----MAGSVLENI--QSV 12
SP|O54794|AQP7_MOUSE -----MAPRSVLETI--QSV 13
SP|P56627|AQP9_RAT -----KSL--MQ--RLA 17
SP|Q9JJJ3|AQP9_MOUSE -----MPSEKDRAK-----KNL--VQ--RLA 17
SP|P47862|AQP3_RAT -----MGRQKELM-----NRC--GE--MLH 16
SP|Q08DE6|AQP3_BOVIN -----MGRQKELV-----NRC--GE--MLH 16
SP|A9Y006|AQP3_PIG -----MGRQKELV-----TRC--GE--MLH 16
SP|Q4R691|AQP7_MACFA -----MVQTSRHRSTRGSKMVSWSVMAKI--QEI 28
SP|Q92482|AQP3_HUMAN -----MGRQKELV-----SRC--GE--MLH 16
SP|O14520|AQP7_HUMAN -----MVQASGHRSTRGSKMVSWSVLAKI--QEI 28
SP|O43315|AQP9_HUMAN -----MQPEGAEGK-----KSF--KQ--RLV 17
SP|Q96PS8|AQP10_HUMAN -----MVFTQAPAEI-----MG--HLR 15

SP|P0AER1|GLPF_ECOL6 QTSTLKGQCIAEFLGTGLLIFFVGVCAALKVAGASF-----GQ-WEISVIWGLGVAMA 55
TR|Q4Q6R2|Q4Q6R2_LEIMA RYRWRLREYVAEFFGTFVFTGTVVATTVFHGGTAMYSQSNSSYLAIITFGWAFGLAIS 117
TR|Q7YW71|Q7YW71_LEITA EFRWQLREYFSEFFGTFFLIAFGTGVVATTVFNAGATGAGQSNPSYLAINFGWGLGLTIS 84
SP|P56403|AQP7_RAT LQKTWVREFLAFLSTYVLMVFGLSVAHMLVG-ERL-----GSYLGVNLFGFGVMTG 65
SP|O54794|AQP7_MOUSE LQKNMVREFLAFLSTYVMMVFGLSVAHMLVG-ENS-----GSYLGVNLFGFGVMTG 66
SP|P56627|AQP9_RAT LKSRLAKETLSEFLGTFLILVFCGCSIAQAVLSRERF-----GGITINIGFASAVVMA 71
SP|Q9JJJ3|AQP9_MOUSE LKSLAKETLSEFLGTFLIMVFCGCSIAQAVLSREKA-----GGITINIGFATAVMA 71
SP|P47862|AQP3_RAT IRYRLLRQALAECLGTLLVFMFGCSVAQVLSRGTH-----GGFLTINLAFGFAVTLA 70
SP|Q08DE6|AQP3_BOVIN IRYRLLRQALAECLGTLLVFMFGCSVAQVLSRGTH-----GGFLTINLAFGFAVTLG 70
SP|A9Y006|AQP3_PIG IRYRLLRQALAECLGTLLVFMFGCSVAQVLSRGTH-----GGFLTINLAFGFAVTLG 70
SP|Q4R691|AQP7_MACFA LQKKMVREFLAFLSTYVMMVFGLSVAHMLVN-KKY-----GSYLGVNLFGFGVMTG 81
SP|Q92482|AQP3_HUMAN IRYRLLRQALAECLGTLLVFMFGCSVAQVLSRGTH-----GGFLTINLAFGFAVTLG 70
SP|O14520|AQP7_HUMAN LQRKMVREFLAFLSTYVMMVFGLSVAHMLVN-KKY-----GSYLGVNLFGFGVMTG 81
SP|O43315|AQP9_HUMAN LKSSLAKETLSEFLGTFLILVFCGCSVAQVLSRGTH-----GGVITINIGFASAVVMA 71
SP|Q96PS8|AQP10_HUMAN IRSLLARQCLAEFLGVFLMLLTQGAQAQAVTSGETK-----GNFTMFLAGSLAVTIA 69
: .:* . . . : : . :*

SP|P0AER1|GLPF_ECOL6 IYLTAGVSGAHLNPAVTIALWLFACFKRKVIPFIVSQVAGAFCAALVYGLYLNLFDF 115
TR|Q4Q6R2|Q4Q6R2_LEIMA LFLSMAVSGGHLNPAVTLANCVFGTFPWKLPYGFYLAQFLGGFVGAANTYVLFKSHFDEA 177
TR|Q7YW71|Q7YW71_LEITA LFLTMGVSGGHLNPAVTLANCVFAGFPWKKLPYGFYLAQFLGASVGAANTYGLFKSHFDEG 144
SP|P56403|AQP7_RAT IHVAGGISGAHMNAAVTFTNCALGRMAWKKFPIYVVGQFLGSLAAATYLIIFYGAINHY 125
SP|O54794|AQP7_MOUSE VHVAGGISGAHMNAAVTFTNCALGRMTWKKFPVYVVGQFLGSLAAATYLIIFYGAINHF 126
SP|P56627|AQP9_RAT LYVTFGISGGHINPAVFSFAMCAFGRMEWFKFPFYVGAQFLGAFVGAATVFGIYYDGLMAF 131
SP|Q9JJJ3|AQP9_MOUSE LYATFGVSGGHLNPAVFSFAMCAFGRMEWFKFPFYVGAQFLGAFVGAATVFGIYYDGLMAF 131
SP|P47862|AQP3_RAT ILVAGQVSGAHLNPAVTFAMCFLAREFPWIKLPIYTLAQTLAGAFLGAGIVFGLYYDAIWF 130
SP|Q08DE6|AQP3_BOVIN ILIAGQVSGAHLNPAVTFAMCFLAREFPWIKLPIYTLAQTLAGAFLGAGIIFGLYYDAIWF 130
SP|A9Y006|AQP3_PIG ILVAGQVSGAHLNPAVTFAMCFLAREFPWIKLPIYTLAQTLAGAFLGAGIIFGLYYDAIWF 130
SP|Q4R691|AQP7_MACFA VHVAGHISGAHMNAAVTFANCALGRVFWKFPVYVVGQFLGSLAAATYITLIFYTAI LHF 141
SP|Q92482|AQP3_HUMAN ILIAGQVSGAHLNPAVTFAMCFLAREFPWIKLPIYTLAQTLAGAFLGAGIVFGLYYDAIWHF 130
SP|O14520|AQP7_HUMAN VHVAGRISGAHMNAAVTFANCALGRVFWKFPVYVVGQFLGSLAAATYISLFYTAI LHF 141
SP|O43315|AQP9_HUMAN IYVAGGVSGGHLNPAVSLAMCFLGRMKWFKLPIYVVGQFLGAFVGAATVFGIYYDGLMSF 131
SP|Q96PS8|AQP10_HUMAN IYVGNVSGAHLNPAVSLAMCIVGRLPWVKLPIYIIVQLLSAFCSAGATVLYLHDALQNY 129
: : **.*.* * . : : . . * . : * . . : : : :

SP|P0AER1|GLPF_ECOL6 EQTHHIVRGSVESVDLAGTFSTYPNPHINVFQAFVEMVITAILMGLILALTDGNGVPR 175
TR|Q4Q6R2|Q4Q6R2_LEIMA EK-RL-LLNETMASKYGGIFATYPNVANT--YAVWSEVFNTMALMMGILAITDARMTPA- 232
TR|Q7YW71|Q7YW71_LEITA ER-NL-LPTETMASKYGGIFVITYPKVATG--YAVWSEVFNTMALMMGILAITDDRMTPA- 199
SP|P56403|AQP7_RAT AGGELLVTPGPKS---TANIFATYLPHEHMTLWRGFVDFVFTGMLQCLFAITDKLNSPAL 182
SP|O54794|AQP7_MOUSE AGDDLVTGSKA---TANIFATYLPHEYMTLWRGFLEAFVFTGMLQCLFAITDKKNSPAL 183
SP|P56627|AQP9_RAT AGGKLLVGENA---TAFIFATYPAPFISTPGAFVDQVSTMFLLLVFAMFDSRNLGVP 188
SP|Q9JJJ3|AQP9_MOUSE ADGKLLITGENG---TAFIFATYPKFVSVPGAFVDQVSTMFLLLVFAIFDSRNLGVP 188
SP|P47862|AQP3_RAT AGNELVVS GPNG---TAGIFATYPSGHLDMVNGFFDQFIGTASLIVCVLAIVDPYNNPVP 187
SP|Q08DE6|AQP3_BOVIN ANNQLIVS GPNG---TAGIFATYPSGHLDMVNGFFDQFIGTASLIVCVLAIVDPYNNPVP 187
SP|A9Y006|AQP3_PIG ANNQLIVS GPNG---TAGIFATYPSGHLDMVNGFFDQFIGTASLIVCVLAIVDPNNPVP 187
SP|Q4R691|AQP7_MACFA SGGQLMVTGPVA---TAGIFATYLPDHMTLWRGFLEAWLTGMLQCLFAITDQENNAAL 198
SP|Q92482|AQP3_HUMAN ADNQLFVSGPNG---TAGIFATYPSGHLDMINGFFDQFIGTASLIVCVLAIVDPYNNPVP 187
SP|O14520|AQP7_HUMAN SGGQLMVTGPVA---TAGIFATYLPDHMTLWRGFLEAWLTGMLQCLFAITDQENNAAL 198
SP|O43315|AQP9_HUMAN AGGKLLIVGENA---TAHIFATYPAPYLSLANAFADQVATMILLIIVFAIFDSRNLGAP 188
SP|Q96PS8|AQP10_HUMAN TGGNLTVTGPKE---TASIFATYPAPYLSLNNGLDQVLTGMLIVGLLAILDRNRKGV 186
: : * * * . . : * * : : : *

SP|P0AER1|GLPF_ECOL6 GPLAPLLIGLLIAVIGASMGPLTGFAMNPARDFGPKVFAWLAGWGNVAFVGGRDIPYFLV 235
TR|Q4Q6R2|Q4Q6R2_LEIMA VDYKPAVIGLLLVFVIGIASGNSSYGLNPARDLSPRILSAM-LWGEFPTLHSY--YFWI 289

TR Q7YW71 Q7YW71_LEITA	TNYKPKVAIGLLLVVIGATTGINSYCLNPARDFAPRVLSAM-LWGSEPFTHLHDH--YFWL	256
SP P56403 AQP7_RAT	QGTEPLMIGILVCLVGLVSLGMNTGYAINPSRDLPFRFFTFIAGWGKKVFSAGNN--WWWV	240
SP O54794 AQP7_MOUSE	QGTEPLVIGILVTVLGLVSLGMNSGYAINPSRDLPRLFTFIAGWGKQVFRAGNN--WWWV	241
SP P56627 AQP9_RAT	RGLEPVVIGLLIIVLSCSLGLNSGCAMNPARDLSPRLFTALAGWGFVEFTVGN--FWWI	246
SP Q9JJJ3 AQP9_MOUSE	RGLEPIVIGLLIIVIISCSLGLNSGCAMNPARDLSPRLFTALAGWGFVEFTFGNN--FWWI	246
SP P47862 AQP3_RAT	RGLEAFTVGLVVLVIGTSMGFNSGYAVNPARDFGPRLFTALAGWGSEVFTTGQN--WWWV	245
SP Q08DE6 AQP3_BOVIN	RGLEAFTVGLVVLVIGTSMGFNSGYAVNPARDFGPRLFTAIAGWGSEVFTTGRH--WWWV	245
SP A9Y006 AQP3_PIG	RGLEAFTVGLVVLVIGTSMGFNSGYAVNPARDFGPRLFTAIAGWGSEVFTTGRH--WWWV	245
SP Q4R691 AQP7_MACFA	PGTQALVIGILVVIIGVSLGMNTGYAINPSRDLPFRVFTFIAGWGKEVFSEGEN--WWWV	256
SP Q92482 AQP3_HUMAN	RGLEAFTVGLVVLVIGTSMGFNSGYAVNPARDFGPRLFTALAGWGSVAVFTTGQH--WWWV	245
SP O14520 AQP7_HUMAN	PGTEALVIGILVVIIGVSLGMNTGYAINPSRDLPRIFTFIAGWGKQVFSNGEN--WWWV	256
SP O43315 AQP9_HUMAN	RGLEPIAIGLLIIVIASLGLNSGCAMNPARDLSPRLFTALAGWGFVEVFRAGNN--FWWI	246
SP Q96PS8 AQP10_HUMAN	AGLEPVVGMILLALGLSMGANCIGIPLNPARDLGPRLFTYVAGWGPEVFSAGNG--WWWV	244
	. : * : : . : * . : ** : ** : * : : : * * * : : :	
SP P0AER1 GLPF_ECOL6	PLFGPIVGAIVGAFAYRKLIGRHLPCDICVVEEKETTTTPSEQKAS-L-----	281
TR Q4Q6R2 Q4Q6R2_LEIMA	PLVVPFVGALFGMFLYVFFIIPPSC-----	314
TR Q7YW71 Q7YW71_LEITA	PLIVPFVGALLGMFLYVFFIIPRPL-----	281
SP P56403 AQP7_RAT	PVVAPLLGAYLGGIVYLGLIHAGIIPPQGS-----	269
SP O54794 AQP7_MOUSE	PVVAPLLGAYLGGIVYLGLIHPSIPQDPQRLENFTAR---DQKVTASYKNAAS--AN---	293
SP P56627 AQP9_RAT	PVVGPMIGAFGLGLIYILFIQMHHSKLDPDMKAEPSENNLEKHEL SVIM-----	295
SP Q9JJJ3 AQP9_MOUSE	PVVGPMIGAVLGLLIYVLFIQMHHSNPDPVKAEPANNNLEKHEL SVIM-----	295
SP P47862 AQP3_RAT	PIVSPLLSIGGVFVYQLMIGCHLEQPPSTEENVKLAHMKHKEQI-----	292
SP Q08DE6 AQP3_BOVIN	PIVSPLLSIAGVFVYQLMIGCHLEPPPSTDEENVKLSHVKKHKEQM-----	292
SP A9Y006 AQP3_PIG	PIASPLLSIGFAGVYQLMIGCHLEPPPSTDEENVKLSQVKHKE-----	290
SP Q4R691 AQP7_MACFA	PVVAPLLGACLGGIYLVFIGSTTPREPLKLEDSVAY---EDHGITVLPKMG SHEPTISP	313
SP Q92482 AQP3_HUMAN	PIVSPLLSIAGVFVYQLMIGCHLEQPPSNEEENVKLAHVKHKEQI-----	292
SP O14520 AQP7_HUMAN	PVVAPLLGAYLGGIYLVFIGSTIPREPLKLEDSVAY---EDHGITVLPKMG SHEPTISP	313
SP O43315 AQP9_HUMAN	PVVGPLVGAVIGGLIYVLFVIEIHHPEPDSVFKTEQSEDKPEKYEL SVIM-----	295
SP Q96PS8 AQP10_HUMAN	PVVAPLVGATVGTATYQLLVALHHPEGPEPAQD--L--VSAQHKASELETPASAQMLECK	300
	*: *: *: * * .:	
SP P0AER1 GLPF_ECOL6	-----	
TR Q4Q6R2 Q4Q6R2_LEIMA	-----	
TR Q7YW71 Q7YW71_LEITA	-----	
SP P56403 AQP7_RAT	-----	
SP O54794 AQP7_MOUSE	-----ISGVSVPLEHF	303
SP P56627 AQP9_RAT	-----	
SP Q9JJJ3 AQP9_MOUSE	-----	
SP P47862 AQP3_RAT	-----	
SP Q08DE6 AQP3_BOVIN	-----	
SP A9Y006 AQP3_PIG	-----	
SP Q4R691 AQP7_MACFA	LTPVSVSPANRSSVRPAPPLHESMALGHF	342
SP Q92482 AQP3_HUMAN	-----	
SP O14520 AQP7_HUMAN	LTPVSVSPANRSSVHPAPPLHESMALEHF	342
SP O43315 AQP9_HUMAN	-----	
SP Q96PS8 AQP10_HUMAN	L-----	301

Abbildung 63: Vergleich ausgewählter Aquaglyceroprin-Sequenzen.

Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen der Aquaglyceroprine aus *Escherichia coli* (ECOL6, GIpF), *Leishmania major* (LEIMA), *Leishmania tarentolae* (LEITA), *Rattus norvegicus* (RAT), *Mus musculus* (MOUSE), *Bos taurus* (BOVIN), *Sus scrofa* (PIG), *Macaca fascicularis* (MACFA) und *Homo sapiens* (HUMAN). Trp 219 (rot, dick) ist in allen Aquaglyceroporinen hoch konserviert. Alle weiteren vier in GIpF auftretenden Tryptophane (rot) weisen keine Konservierung dieses Ausmaßes auf. Aminosäuren, die Teil des aromatischen Clusters von GIpF sind (grün), sind zum Teil in den Sequenzen anderer Organismen vorzufinden. Die erweiterten Loop-Regionen des GIpF-Vestibüls (siehe Kap.4.2.1) ist in Gelb markiert. Die Sequenzen wurden der Datenbank UniprotKB/TrEMBL entnommen und mit dem Programm Clustal Omega erstellt.

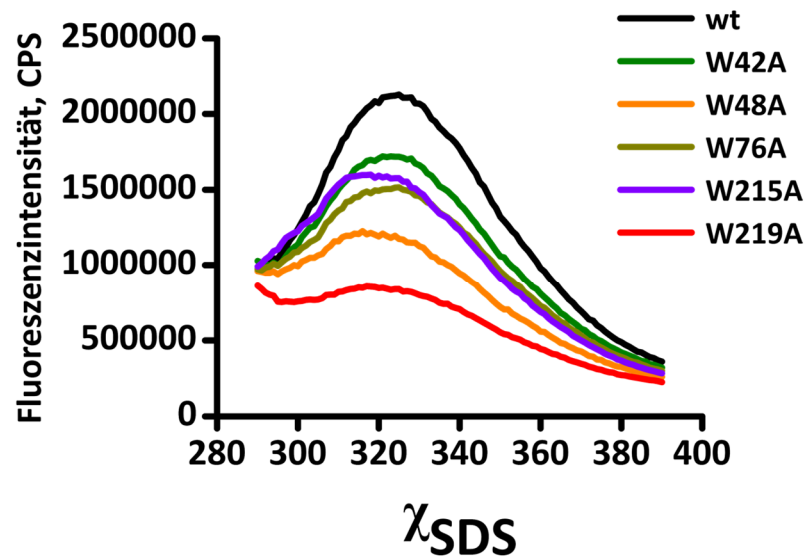


Abbildung 64: Emissionsspektren des GlpF-Wildtyps sowie seiner Varianten, deren Tryptophan jeweils einzeln gegen Alanin ersetzt wurde.

8 μM des GlpF-Wildtyps sowie seiner Varianten wurden in separaten Messungen bei 280 nm angeregt. Aufgrund von Streuung konnte das Trp-Fluoreszenzspektrum erst ab einer Wellenlänge von 290 nm aufgenommen werden. Die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Spektren zeigt an, inwieweit die einzelnen Tryptophane an der Gesamtfluoreszenz von GlpF beteiligt sind. Die einzelnen Tryptophane sind zu unterschiedlichen Anteilen an der Gesamtfluoreszenz von GlpF beteiligt. Die Variante GlpF W219A weist die geringste Emission auf. Demnach ist Trp 219 maßgeblich an der Gesamtfluoreszenz von GlpF beteiligt. Die Differenzen der Intensitäten der einzelnen Spektren lassen sich nicht zur Gesamtintensität des GlpF-Wildtyps aufsummieren, da sich die Fluoreszenzintensität der übrigen Tryptophane aus komplexen Interaktionen mit der Proteinumgebung ergibt.

Danksagung



Lebenslauf

