

Institut für Organische Chemie und Biochemie

Lehrstuhl für Biotechnologie

**Struktur, Stabilität und Faltung
von Antikörperdomänen**

Michael J.W. Thies

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender	Univ.-Prof. Dr. Steffen J. Glaser
Prüfer der Dissertation	1. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
	2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf

Die Dissertation wurde am 12.01.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 14.02.2002 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Die Faltung von Proteinen	1
1.1.1.	Die Proteinfaltung <i>in vivo</i>	1
1.1.1.1.	<i>Proteinbiosynthese und Faltung.....</i>	<i>1</i>
1.1.1.2.	<i>Chaperone und Faltungskatalysatoren.....</i>	<i>3</i>
1.1.2.	Die Proteinfaltung <i>in vitro</i>	5
1.1.2.1.	<i>Theorie und Experiment.....</i>	<i>5</i>
1.1.2.2.	<i>Faltungskatalysatoren – Effekte in vitro.....</i>	<i>14</i>
1.2.	Die Struktur und Faltung von Antikörpern.....	16
1.2.1.	Antikörper und der <i>immunoglobulin fold</i>	16
1.2.2.	Die Faltung von Antikörpern <i>in vivo</i>	21
1.2.3.	Antikörperfaltung und -stabilität <i>in vitro</i>	22
1.3.	Problemstellung	26
2.	Material und Methoden.....	27
2.1.	Verwendetes Material	
2.1.1.	Bakterienstämme	27
2.1.2.	Plasmide.....	27
2.1.3.	Proteine	27
2.1.4.	Standards und Kits	28
2.1.5.	Chemikalien	28
2.1.6.	Antibiotika und Nährmedien (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	29
2.1.6.1.	<i>Antibiotika.....</i>	<i>29</i>
2.1.6.2.	<i>Nährmedien für die Anzucht von E.coli.....</i>	<i>30</i>
2.1.7.	Puffer und Lösungen.....	30
2.1.7.1.	<i>Lösungen für gentechnische Methoden.....</i>	<i>30</i>
2.1.7.2.	<i>Puffer für proteinchemische und präparative Methoden.....</i>	<i>31</i>
2.1.8.	Materialien für die Chromatographie	31
2.1.9.	Weitere Materialien	32
2.1.10.	Geräte.....	32
2.1.10.1.	<i>Absorptionsspektrophotometer</i>	<i>32</i>

2.1.10.2.	<i>Circulardichroismus-Spektropolarimeter</i>	32
2.1.10.3.	<i>Spektrofluorimeter</i>	33
2.1.10.4.	<i>Massenspektrometer</i>	33
2.1.10.5.	<i>Dynamische Lichtstreuung</i>	33
2.1.10.6.	<i>Chromatographie-Anlagen</i>	33
2.1.10.7.	<i>Gelelektrophorese-Apparaturen</i>	34
2.1.10.8.	<i>Waagen</i>	34
2.1.10.9.	<i>Zentrifugen</i>	34
2.1.10.10.	<i>Weitere Geräte</i>	35
2.1.11.	<i>Computerprogramme</i>	35
2.2.	Molekularbiologische Methoden	35
2.2.1.	Kultivierung und Konservierung von <i>E.coli</i> -Stämmen (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) ...	36
2.2.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	36
2.2.3.	PCR-Amplifikation (Mullis & Faloona, 1987).....	36
2.2.4.	Enzymatische Modifizierung von DNA	38
2.2.4.1.	<i>Schneiden von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen</i>	38
2.2.4.2.	<i>Dephosphorylierung von DNA-Enden</i>	38
2.2.4.3.	<i>Ligation von DNA-Enden</i>	38
2.2.5.	Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	49
2.2.6.	Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen.....	49
2.3.	Präparative Methoden	40
2.4.	Proteinchemische Methoden	41
2.4.1.	Titration von freien Thiolgruppen mit DTNB (Ellman's Assay)	41
2.4.2.	Quervernetzung von Proteinen über Lysinseitenketten	42
2.4.3.	Derivatisierung von Cysteinen mit Iodacetamid	43
2.4.4.	Natriumdesoxycholat-Trichloressigsäure-Fällung.....	43
2.4.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	44
2.4.6.	Protein-Färbemethoden.....	46
2.4.6.1.	<i>Silberfärbung</i>	46
2.4.6.2.	<i>Färbung nach Fairbanks (Fairbanks et al., 1971)</i>	47
2.4.7.	Densitometrie.....	47
2.5.	Spektroskopische Methoden	47
2.5.1.	Absorptionsspektroskopie.....	47
2.5.2.	Fluoreszenzspektroskopie.....	50

2.5.2.1.	<i>Aufnahme von Fluoreszenzspektren</i>	50
2.5.2.2.	<i>Fluoreszenzkinetiken</i>	51
2.5.3.	ANS-Fluoreszenzspektroskopie.....	51
2.5.4.	Circulardichroismus (CD).....	51
2.5.4.1.	<i>Nah-UV-CD</i>	52
2.5.4.2.	<i>Fern-UV-CD</i>	53
2.5.5.	Dynamische Lichtstreuung	53
2.5.6.	Refraktometrie	54
2.6.	High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)	54
2.7.	Massenspektrometrie	55
2.8.	Mathematische Methoden	56
2.8.1.	Auswertung konformationeller Übergänge	56
2.8.2.	Entfaltung/Faltung	57
3.	Ergebnisse	59
3.1.	Physikalisch-chemische Eigenschaften der MAK33-Antikörperdomänen C_{H2} und C_{H3}	59
3.1.1.	Analyse der Primärstruktur: C _{H2} und C _{H3} im Vergleich.....	59
3.1.2.	Sequenz und Struktur.....	64
3.1.2.1.	<i>Die dreidimensionale Struktur von C_{H3}</i>	66
3.1.2.2.	<i>Die dreidimensionale Struktur von C_{H2}</i>	70
3.1.3.	Quartärstruktur.....	72
3.2.	Stabilität	75
3.2.1.	Stabilität der Domänen C _{H2} und C _{H3} im Vergleich	75
3.2.1.1.	<i>Stabilität der nicht glykosylierten C_{H2}-Domäne</i>	75
3.2.1.2.	<i>Stabilität der C_{H3}-Domäne</i>	77
.2.2.	Der Beitrag der intramolekularen Disulfidbrücke zur Stabilität von Antikörperdomänen	80
3.2.3.	Die C _{H2} - und die C _{H3} -Domäne im sauren pH-Bereich.....	81
3.2.3.1.	<i>C_{H2} bei pH 2</i>	81
3.2.3.2.	<i>C_{H3} bei pH 2</i>	86
3.3.	Vergleichende Faltungsuntersuchungen von C_{H2} und C_{H3}	93
3.3.1.	Entfaltung.....	93
3.3.1.1.	<i>GdmCl-induzierte Entfaltung</i>	93

3.3.1.2.	<i>Entfaltung bei pH 2</i>	96
3.3.2.	Faltung	97
3.3.2.1.	<i>Die Faltung der C_{H2}-Domäne</i>	97
3.3.2.2.	<i>Die Faltung von C_{H3}</i>	100
3.3.3.	Prolinomerisierung.....	103
3.3.4.	Intermediate in der Faltung von Antikörperdomänen.....	106
3.3.5.	Assoziation	110
3.3.6.	Faltung und Oxidation	112
4.	Diskussion	118
4.1.	Struktur	118
4.2.	Stabilität.....	120
4.3.	Faltung	124
5.	Zusammenfassung	135
6.	Literaturverzeichnis	138
7.	Abkürzungen	145
8.	Publikationsliste	147
	Publikationen	ab 148

1. Einleitung

1.1. Die Faltung von Proteinen

Jede Eigenschaft eines lebenden Organismus, jeder Vorgang in ihm wird beeinflusst und gesteuert von Proteinen. Proteine sind z. B. beteiligt an der Herstellung und dem Abbau anderer Proteine, sorgen für die strukturelle Integrität der Zelle, katalysieren die Reaktionen des Energiestoffwechsels oder transportieren und speichern eine Vielzahl von Partikeln, angefangen von Elektronen bis hin zu Makromolekülen. Proteine gibt es in einer großen Anzahl, optimal ausgerichtet auf ihre Funktion und angepasst an ihre Umgebung. Schätzungen im Rahmen des *human genome projects* ergaben, dass zwischen 30 000 und 120 000 Gene den Bauplan für mindestens ebensoviele Proteine codieren.

Allen Proteinen gemeinsam ist, dass sie agieren, indem sie interagieren, entweder mit anderen Proteinen oder mit DNA, RNA, Kohlenhydraten, Lipiden oder niedermolekularen Verbindungen. Die räumliche Struktur von Proteinen ist deshalb maßgeblich für deren Eigenschaften und Funktionen verantwortlich. Geht diese verloren, so kann das Protein seine Funktion nur noch eingeschränkt bzw. überhaupt nicht mehr erfüllen.

1.1.1. Die Proteinfaltung *in vivo*

1.1.1.1. *Proteinbiosynthese und Faltung*

Biologische Strukturen sind unter den richtigen Rahmenbedingungen zur Selbstorganisation fähig, das heißt, dass sie zur Erlangung ihrer dreidimensionalen Struktur nicht auf äußere Matrizen angewiesen sind. So ist auch Proteinfaltung unter physiologischen Bedingungen ein spontaner Prozess, der weder zusätzliche Informationen noch Energiezufuhr von außen benötigt. Die dreidimensionale Struktur eines nativ gefalteten Proteins ist ausschließlich durch

seine Primärstruktur, die Aminosäuresequenz der zugrundeliegenden Polypeptidkette, vorgegeben (Anfinsen, 1973).

In vivo findet die Proteinfaltung unter erschwerten Bedingungen statt. In der Zelle sind Gesamteproteinkonzentrationen von einigen 100 mg/ml nichts seltenes (Morimoto *et al.*, 1994), so dass das Medium, in dem die Faltung abläuft, eine hoch viskose Lösung ist, die besondere Anforderungen an die Proteinfaltung stellt. Im Verlauf der Faltung besteht eine erhöhte Gefahr der Aggregation, da nicht native Proteine verstärkt hydrophobe Oberflächen dem Lösungsmittel und somit auch anderen ungefalteten Proteinen präsentieren. Darüber hinaus führen langsame Prozesse während der Faltung, wie die Bildung von Disulfidbrücken oder die Isomerisierung von Prolinen, zur Anhäufung von intermediären Faltungszuständen des Proteins. Dieses beschleunigt unproduktive Wechselwirkungen und Aggregatbildung (Buchner, 1996).

Um diese Schwierigkeiten umgehen zu können, wird in vielen Fällen das Protein nicht erst als Ganzes am Ribosom synthetisiert, bevor es in die native Konformation faltet. Vielmehr laufen Synthese und Faltung parallel ab. Das Protein wird abschnittsweise am Ribosom vom N- zum C-Terminus hin gebildet, so dass eine Domäne schon falten kann, während sich der Rest der naszierenden Polypeptidkette noch am Ribosom befindet. Bei Proteinen, welche in ein bestimmtes Zellkompartiment transportiert werden sollen, findet die Translokation ebenfalls kotranslational statt. Um natives, aktives Protein zu erhalten, ist die *in vivo* bevorzugte Syntheserichtung im übrigen nicht zwingend. Wie Untersuchungen an Ribonuklease A und GroES gezeigt haben, falten diese auch nach Synthese vom C- zum N-Terminus gemäß der Merryfield-Methode zum aktiven Zustand (Gutte & Merryfield, 1971; Mascagni *et al.*, 1991). Chemische Modifikationen, wie z. B. die Disulfidverbrückung von Cysteinresten, können auch bereits an der naszierenden Polypeptidkette erfolgen. Das konnte im Falle von Immunglobulinen, Serumalbumin aus Ratte und Influenza-Hämagglutinin

nachgewiesen werden (Bergmann & Kuehl, 1979; Peters & Davidson, 1982; Braakman *et al.*, 1991). Jedoch ist durch Veränderung der Redoxbedingungen in Zellkulturen gezeigt worden, dass die Faltung zur korrekten Tertiärstruktur bei Hämagglutinin auch möglich ist, wenn die kotranslationale Disulfidverbrückung nicht stattfindet (Braakman *et al.*, 1992).

Es gibt aber auch Beispiele, bei denen Proteinsynthese und -faltung nicht gleichzeitig stattfinden. Bei Ribonuklease A muss sich die gesamte Polypeptidkette erst vom Ribosom gelöst haben, da der C-Terminus essentiell für die Ausbildung der nativen Konformation ist (Lin, 1970). Thornton und Sibanda konnten 1983 aus N- und C-terminalen Bereichen bestehende strukturelle Domänen nachweisen, was die Vermutung nahelegt, dass für die Faltung einiger Proteine die vollständig synthetisierte Polypeptidkette vorliegen muss.

In vivo wie auch *in vitro* stellt die Proteinfaltung keinen Prozess dar, der zu 100 % korrekt gefaltetes, natives Protein liefert. Auch unter physiologischen Bedingungen kommt es zu ausbeuteminimierender Aggregation, die durch Stressbedingungen, z. B. verursacht durch erhöhte Temperatur oder Überproduktion rekombinanter Proteine, noch gefördert wird (Haase-Pettingel & King, 1988; Hurlley & Helenius, 1989; Bowden & Georgiou, 1990). Bei der Überexpression können fehlgefaltete Polypeptidketten zu unlöslichen, sogenannten *inclusion bodies* führen (Marston, 1986).

1.1.1.2. Chaperone und Faltungskatalysatoren

Als Hilfe für die Proteinfaltung setzt die Zelle Faltungshelferproteine, sogenannte molekulare Chaperone (Ellis, 1987; Gething, M.-J., 1997) ein. Aufgrund der verstärkten Expression dieser Proteine unter Hitzestress ordnet man die meisten der Klasse der Hitzeschockproteine zu (Georgopoulos & Welch, 1993; Buchner 1996) und teilt sie anhand von Sequenzhomologien und ihres Molekulargewichtes in die Familien Hsp104, Hsp90, Hsp70, Hsp60 und die der kleinen Hitzeschockproteine ein. Sie stellen die größte Klasse an

faltungsassistierenden Proteinen dar (Gething & Sambrook, 1992; Hartl, 1996; Buchner, 1996; Reißinger & Buchner, 1998). Diese interagieren selektiv mit nichtnativen Proteinen über exponierte, hydrophobe Oberflächen, wodurch sie illegitime Wechselwirkungen zwischen den faltenden Polypeptidketten unterbinden und auf diese Weise der Aggregation als dominierender, unspezifischer Nebenreaktion entgegenwirken (Jaenicke & Buchner, 1993). Es werden dabei jedoch keine sterischen Informationen für die Faltung bereit gestellt (Buchner, 1996; Hartl, 1996; Jaenicke, 1996).

Zwei in allen Zellen vorkommende Faltungskatalysatoren unterstützen die *in vivo*-Proteinfaltung, indem sie die meist geschwindigkeitsbestimmenden Schritte beschleunigen. Unter dem Begriff Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPI) fasst man eine ganze Reihe von ubiquitären Enzymen zusammen, die die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolinen katalysieren (Schreiber, 1991; Fischer, 1994; Galat & Metcalfe, 1995). In der Literatur wurden drei strukturell unabhängige Familien von PPIasen beschrieben: Die Cyclophiline (Cyp), die FK506-Bindeproteine und die Parvuline (Fischer, 1994). Cyclophiline und FKBP's werden wegen ihrer zellulären Rezeptorfunktion für die Immunsuppressiva Cyclosporin A bzw. FK506 auch als Immunophiline bezeichnet (Fischer *et al.*, 1984; Schreiber, 1991; Fischer, 1994; Galat & Metcalfe, 1995). Darüber hinaus wurde der sogenannte Trigger-Faktor aus *E.coli* als effiziente, am Ribosom lokalisierte PPIase identifiziert, welche während der Translation mit den naszierenden Polypeptidketten interagiert (Stoller *et al.*, 1995; Valent *et al.*, 1995; Hesterkamp *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu den Immunophilinen sind die Parvuline weder durch Cyclosporin A noch durch FK506 inhibierbar (Rahfeld *et al.*, 1994). Obwohl der Trigger-Faktor eine FKBP-ähnliche Domäne besitzt, sind die vorgenannten Inhibitoren auch bei ihm wirkungslos (Fischer *et al.*, 1984). PPIs kommen *in vivo* häufig in größeren Proteinkomplexen vor, die der Faltung und Aktivierung von Substraten dienen.

Die Klasse der Proteindisulfidisomerasen (PDI) (Freedman, 1984) – die prokaryontischen Vertreter werden als DsbA und DsbC bezeichnet (Bardwell *et al.*, 1991; Shevchik *et al.*, 1994) – katalysiert die Thiol/Disulfidaustauschreaktion in Polypeptiden (Wunderlich & Glockshuber, 1993; Freedman *et al.*, 1994; Bardwell, 1997). Anhand von Mutationsstudien und PDI-defizienten Mikrosomen konnte die Isomerase-Aktivität dieses Proteins *in vivo* nachgewiesen werden (Tachibana & Stevens, 1992; Bulleid & Freedman, 1988).

1.1.2. Die Proteinfaltung *in vitro*

1.1.2.1. Theorie und Experiment

In vitro-Proteinfaltungsexperimente ergaben bereits um 1920, dass die Denaturierung eines Proteins durchaus nicht irreversibel, sondern unter geeigneten Bedingungen umkehrbar ist (Anson & Mirsky, 1925; Anson & Mirsky, 1939). Wie Anfinsen Ende der 60er Jahre des vorigen Jahrhunderts zeigen konnte, erfolgt die Renaturierung eines Proteins *in vitro* spontan, sobald das Denaturierungsmittel durch Verdünnung oder Dialyse entfernt wird (Anfinsen, 1973). Daraus wurde gefolgert, dass die native Struktur eines Proteins unter diesen Bedingungen thermodynamisch stabiler ist als der denaturierte Zustand und sich in einem globalen Energieminimum befindet (Anfinsen, 1973). Levinthal (1968) jedoch brachte den Einwand, dass Proteinfaltung, würde sie in Form einer statistischen Suche nach der nativen Konformation ablaufen, in biologisch relevanten Zeiträumen nicht möglich sei („*Levinthal's paradox*“). Daraus schloss man, dass Faltung entlang genau definierter Pfade erfolgen müsse (Levinthal, 1968). Da außer den in der Primärstruktur des Proteins enthaltenen Informationen keine äußeren Matrizen oder Energiezufuhr für den Vorgang der Faltung von Nöten sind (Anfinsen, 1973), wurde für die Faltung die sequentielle Abfolge von zunehmend strukturierten Zuständen des Proteins angenommen, wobei die native Konformation eines

Proteins nicht nur über einen Faltungsweg erreicht werden kann (Kim & Baldwin, 1982; Kim & Baldwin, 1990).

Die Aufklärung des Faltungsweges eines Proteins setzt bei der kinetischen und thermodynamischen Charakterisierung der intermediär vorkommenden Zustände des Proteins an. Durch das Sammeln von Faltungsdaten über strukturell verwandte Proteine hoffte man, den Stukturbildungsprozess und damit die „zweite Hälfte des genetischen Codes“ (Goldberg, 1985) aufzuklären. Dieses ist bis heute jedoch noch nicht vollständig gelungen.

Die Proteinfaltung ist, wie oben schon angesprochen, ein spontaner Prozess (Anfinsen, 1973). Reaktionen laufen spontan ab, wenn die freie Reaktionsenthalpie $\Delta_r G < 0$ ist. $\Delta_r G$ wird für eine einfache Faltungsreaktion von U (denaturierter Zustand) nach N (natives Protein) wie folgt berechnet:

$$\Delta_r G = \Delta_b G_N - \Delta_b G_U$$

Gl. 1.1.1: Berechnung der freien Enthalpie einer Faltungsreaktion

aus den freien Bildungsenthalpien des nativen (N) und des denaturierten Zustandes (U).

Mit $\Delta_b G_N$ ist die freie Bildungsenthalpie des nativen, mit $\Delta_b G_U$ die des denaturierten Zustandes bezeichnet. Folglich sind der denaturierte Zustand, der *compact denatured state* (*molten globule*) und der *a state* (*molten globule* unter sauren pH-Bedingungen; siehe weiter unten) Konformationen, die eine hohe freie Enthalpie besitzen. Korrekt gefaltete Proteine befinden sich dagegen in einem Zustand minimaler freier Enthalpie. Um dieses Stadium zu erreichen, spielen jene Wechselwirkungen eine Rolle, die einem Protein auch seine Stabilität verleihen: Elektrostatische und van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen sowie das Bestreben, eine optimale Packungsdichte zu erlangen, was zur Minimierung hydrophober Innenräume führt.

$$\Delta_r G = \Delta_r H - T\Delta_r S$$

Gl. 1.1.2.: Berechnung der freien Reaktionsenthalpie, Thermodynamik.

Dieser Vorgang beeinflusst die Entropie des Systems in dem Sinne, dass einerseits die Bewegungsfreiheitsgrade der Polypeptidkette drastisch eingeschränkt werden. Andererseits wird durch die Wasserverdrängung während der Kompaktierung des Proteins die Entropie der Umgebung entscheidend erhöht. Dieses stellt die treibende Kraft bei der Faltung dar (Jaenicke, 1996).

In der Regel ist das native Protein durch hohe Energiebarrieren auch kinetisch gegenüber Faltungsintermediaten stabilisiert. Dementsprechend ist der letzte, zum nativen Protein führende Faltungsschritt meist auch der geschwindigkeitsbestimmende (Jaenicke, 1991; Matthews, 1993). Wie die hohen Aktivierungsenergien vermuten lassen, finden beim Durchlaufen des Übergangszustandes zahlreiche strukturelle, zum Teil sehr weitreichende Änderungen gleichzeitig statt. Mutationsstudien zeigten, dass z. B. in T4-Lysozym sich die α -Helix der α -helikalen Domäne im Übergangszustand ausbildet (Chen *et al.*, 1992; Lu & Dahlquist, 1992). Auch der Übergangszustand des Chymotrypsininhibitors konnte auf diese Weise genauer untersucht werden. Hier weisen die beiden Domänen bereits nativ-ähnliche Struktur auf und können miteinander interagieren (Otzen *et al.*, 1994). Der Faltungsschritt zum nativen Protein geht mit einer nicht unerheblichen Exposition hydrophober Oberflächen im Übergangszustand einher. Die Konformation des Proteins ist aber bereits sehr nativ-ähnlich (Chen & Shellmann, 1989; Jackson & Fersht, 1991; Chen *et al.*, 1992; Serrano *et al.*, 1992).

Die Faltung von Proteinen kann als hierarchischer Prozess angesehen werden, initiiert durch sich lokal ausbildende, nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen benachbarten Aminosäureresten. Diese führen zu Sekundärstrukturelementen, welche über weitere

Interaktionen die für jedes Protein einzigartige Tertiärstruktur ausbilden (Jaenicke, 1987; Baldwin & Rose, 1999). Am Ausgangspunkt der *in vitro*-Rückfaltung liegt das Protein im denaturierten Zustand vor. Im Gegensatz zum nativen Protein ist dieser nicht eindeutig definiert, sondern wird je nach Art der Denaturierung durch eine Vielzahl unterschiedlich stark vertretener Konformationen beschrieben. Der denaturierte Zustand zeichnet sich im Allgemeinen durch eine hohe Lösungsmittelzugänglichkeit hydrophober Reste und geringe Reststruktur aus (Shortle, 1996). Chemische Denaturierung mittels hoher Konzentrationen chaotroper Reagenzien, z. B. Guanidiniumhydrochlorid, bewirkt meist vollständigen Strukturverlust. Die Polypeptidkette nimmt die Konformation eines Zufallknäuels (*random coil*) an (Tanford, 1968). In wenigen Ausnahmen wurden aber auch Reststrukturen mit stabilen hydrophoben Bereichen beobachtet (Neri *et al.*, 1992).

Im Vergleich dazu werden häufig sogenannte *molten globules* gebildet (Ohgushi & Wada, 1983; Ptitsyn, 1992), wenn die Denaturierung durch Hitze- oder Säureeinwirkung erfolgt. Diese Faltungszustände eines Proteins werden dadurch gebildet, dass hydrophobe Aminosäurereste aus der wässrigen Lösungsumgebung ins Proteininnere verlagert werden. Eine kompakte denaturierte Konformation mit hydrophoben Kontakten zwischen benachbarten Aminosäureseitenketten entsteht (Kuwajima *et al.*, 1985; Goto *et al.*, 1990; Jeng & Englander, 1991; Ptitsyn, 1992). Diese können durchaus denen im nativen Protein entsprechen (Demarest *et al.*, 1999). *Molten globules* weisen Sekundärstrukturelemente auf. Ferner zeichnet sie eine fluktuierende Tertiärstruktur, lösungsmittlexponierte hydrophobe Oberflächen und eine unkooperative Entfaltung aus (Kuwajima, 1989; Goto & Fink, 1989; Ptitsyn, 1992; Redfield *et al.*, 1999). Verglichen mit dem entsprechenden nativen Zustand des Proteins besitzen *molten globules* nur eine geringe Stabilität von 4-12 kJ mol⁻¹ (Ikeguchi *et al.*, 1986; Mann & Matthews, 1993; Ptitsyn & Uversky, 1994). Diese relativ geringen Stabilisierungsenergien lassen es zu, dass sich die *molten globule*-Konformation in einem

raschen, direkten Gleichgewicht mit dem vollständig denaturierten Protein befindet (Mann & Matthews, 1993; Ptitsyn & Uversky, 1994).

Der *molten globule*-Zustand ist ebenso wie der denaturierte Zustand nicht einheitlich, sondern eine Ansammlung von ähnlichen Faltungskonformationen. Die Bezeichnung *molten globule* wird in der Literatur immer häufiger für jegliche teildenaturierte Zustände von Proteinen gebraucht, die noch Sekundärstruktur aufweisen und dazu tendieren, hydrophobe Reagenzien wie 8-Anilino-1-Naphthalensulfonsäure (ANS) zu binden. Daher ist man dazu übergegangen, in Anlehnung an den denaturierten Zustand von einem *compact denatured state* zu sprechen. Dieser sieht für jedes Protein anders aus (Fink, 1995). Ausgehend von diesem erfolgt die Faltung zum nativen Protein. Dazu werden stabile Netzwerke von Wasserstoffbrücken und elektrostatischen Interaktionen sowie definierte Tertiärkontakte ausgebildet. Sogenannte Subdomänen entstehen, welche nativ-ähnlichen Charakter haben, aber im Vergleich zum nativen Protein eine geringere Packungsdichte und mobile *loops* an der Oberfläche aufweisen (Udgaonkar & Baldwin, 1990; Oas & Kim, 1988; Matouschek *et al.*, 1992). Faltungsphasen dieser Art treten teilweise unabhängig voneinander in verschiedenen Domänen desselben Proteins auf. Dieses bewirkt, dass das Protein auf mehreren unterschiedlichen Faltungswegen zum nativen Zustand gelangen kann (Dobson *et al.*, 1994; Kiefhaber, 1995). Das konnte im Fall der Faltung der α - und der β -Domäne von Hühner-Lysozym nachgewiesen werden (Radford *et al.*, 1992).

Der *molten globule* wird als frühes Faltungsintermediat in verschiedenen Modellen zur Proteinfaltung beschrieben (Ikeguchi *et al.*, 1986; Kuwajima *et al.*, 1987; Roder *et al.*, 1988; Kuwajima, 1989). Im wesentlichen werden zwei Modelle diskutiert, die den *molten globule* in ihre Überlegungen mit einbeziehen:

Im sogenannten *framework model* steht am Anfang der Faltung die Bildung von Teilen der Proteinsekundärstruktur. Diese Bereiche sind noch keineswegs endgültig fixiert, sondern

fluktuieren in Größe und Position. Durch die Ausbildung von unspezifischen hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb dieser Sekundärstrukturelemente werden sie anschließend stabilisiert (Ptitsyn & Rashin, 1975; Kim & Baldwin, 1982). Die gebildeten Sekundär- und Supersekundärstrukturen legen den Faltungsweg fest. Sie sind die Voraussetzung für die Assemblierung der komplexeren Tertiärstruktur, die mit der Verdrängung von Wasser aus dem Proteininneren und der Entstehung des sogenannten *hydrophobic core* einhergeht. Nach diesem Modell könnte man vermuten, dass ähnliche Aminosäuresequenzen in verschiedenen Proteinen zu denselben Strukturen führen (Nath & Udgaonkar, 1997). Das ist jedoch nicht zwingend der Fall. Wie nachgewiesen werden konnte, sind gleiche Sequenzen in unterschiedlichen Proteinen durchaus in der Lage, vollkommen unterschiedliche Strukturen hervorzurufen (Kabsch & Sander, 1984).

Das zweite diskutierte Modell, das sogenannte *hydrophobic collapse model*, nimmt als ersten Faltungsschritt einen unspezifischen Kollaps der Polypeptidkette an. Hierbei wird durch Zusammenlagerung von hydrophoben Aminosäureresten der Kontakt mit dem wässrigen Lösungsmittel vermieden (Dill, 1990; Jaenicke, 1996). Es bilden sich dabei Sekundärstrukturelemente, wie Helices und *β -hairpin loops*, aus (Blanco *et al.*, 1994). Die entstandene Sekundärstruktur ist eine effiziente, wenn auch noch nicht-native Packung der hydrophoben Seitenketten (Matheson & Scheraga, 1978; Dill, 1990), welche anschließend durch Neuordnung in die native Struktur umgewandelt wird.

Das Ergebnis der von beiden Modellen beschriebenen Faltungsprozesse ist dasselbe. Der erste Schritt verläuft in beiden Fällen über einen sogenannten *pre molten globule*, im *framework model* als konformationeller Zustand mit nativ-ähnlichen, aber instabilen Sekundärstrukturelementen, im *hydrophobic collapse model* als Faltungszustand mit unspezifischen, nicht-nativen Wechselwirkungen beschrieben (Nath & Udgaonkar, 1997). Diese Konformation geht durch Kompaktierung (*framework model*) oder Ausbildung einer

nativ-ähnlichen Sekundärstruktur (*hydrophobic collapse model*) schließlich in den *molten globule* über. Trotz der Erhöhung der zeitlichen Auflösung der Messtechniken durch spezielle Laser-Puls-Techniken ist eine experimentelle Unterscheidung zwischen den beiden Modellen derzeit nicht möglich. Demgegenüber sind die nachfolgenden Prozesse der Faltung vergleichsweise langsam.

Die im sauren pH-Bereich auch als *a states* bezeichneten *molten globules* werden häufig als experimentelle Modellsysteme zur Untersuchung der molekularen Prinzipien der Proteinfaltung und -stabilität herangezogen (Ptitsyn, 1995a,b; Dobson, 1992; Dobson, 1994). Dabei lassen sich diese Intermediate in drei unterschiedliche Klassen einteilen (Fink *et al.*, 1994). Proteine wie Ubiquitin und T4-Lysozym verbleiben auch bei pH 2 in einer nativ-ähnlichen Struktur. Andere wie α -Lactalbumin nehmen dagegen schon zwischen pH 3 und pH 4 die *a state*-Konformation an. Darüber hinaus gibt es Proteine, die, wie im Fall von Cytochrom c nachgewiesen, beim pH-Übergang zunächst völlig entfalten, um anschließend in den *a state* zurückzukehren (Goto *et al.*, 1993; Fink *et al.*, 1994). In der Regel sind die beobachteten Intermediate wie die *molten globules* im Vergleich zum entsprechenden nativen Protein weit weniger stabil (Kuwajima, 1989; Ptitsyn, 1992; Yutani *et al.*, 1992; Saab-Rincon *et al.*, 1993). Es sind aber auch Säure-induzierte Strukturen bekannt, die sich als sehr stabil gegenüber thermischer Denaturierung erwiesen (Kolvenbach *et al.*, 1997; Buchner *et al.*, 1991).

Die Ursache der Entfaltung eines Proteins im sauren pH-Bereich sowie der möglichen Bildung von kompakten Intermediaten ist elektrostatischer Natur (Goto *et al.*, 1990; Goto *et al.*, 1993; Hagihara *et al.*, 1994a,b). Die Zugabe von Salzen kann einen enormen Effekt auf die Konformation haben. Proteine, welche bei niedrigen pH-Werten völlig denaturiert vorliegen, können in Gegenwart von Anionen in den *a state* überführt werden. Dabei unterscheiden sich die Anionen deutlich hinsichtlich ihrer Effektivität (siehe Gl. 1.1.3.) (Goto

et al., 1990; Fink *et al.*, 1994). Der Konformationsübergang wird durch Ionisationen an bestimmten Schlüsselstellen der Polypeptidkette ausgelöst, indem Salzbrücken ausgebildet werden und Wechselwirkungen zwischen Histidinresten zustandekommen (Barrick *et al.*, 1994).



Gl. 1.1.3.: Effektivität von Anionen bei der Überführung von säureentfalteten Proteinen in den *a state* (Goto *et al.*, 1990).

Neben den Faltungsmodellen, die auf dem *molten globule* als frühem Intermediat basieren, gibt es andere Diskussionsgrundlagen für die Proteinfaltung. Das *nucleation-condensation-growth model* formuliert als Startpunkt der Faltung einen sogenannten Faltungskern. Dieser wird in einem kleinen Sequenzbereich der Polypeptidkette z. B. als sogenannter *β-hairpin* schnell ausgebildet (Muñoz *et al.*, 1997; Schönbrunner *et al.*, 1997b; Ramirez-Alvarado *et al.*, 1999) und ermöglicht somit die Faltung in biologisch relevanten Zeiträumen. Von dort aus breitet sich der Faltungsprozess über die ganze Kette aus. Da „der“ denaturierte Zustand eine Ansammlung von fluktuierenden Konformationen des Proteins ist, ist der Nukleationskern sehr instabil und deshalb nur vorübergehend vorhanden. In der Faltung von Proteinen nach dem Zwei-Zustands-Modell ist die Bildung des Nukleationskernes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die nachfolgende Faltung zum nativen Zustand erfolgt ohne detektierbare Intermediate (Wetlaufer, 1973; Matheson & Scheraga, 1978; Fersht, 1995; Schönbrunner *et al.*, 1997a,b). Für den Faltungsprozess von Proteinen wie dem Chymotrypsin-Inhibitor 2 und Tendamistat scheint das *nucleation-condensation-growth model* eine angemessene Beschreibung zu sein (Fersht, 1995; Neira *et al.*, 1996; Schönbrunner *et al.*, 1997a,b).

In den letzten Jahren hat man verstärkt versucht, sich wieder von der Vorstellung, Proteinfaltung verlaufe entlang genau definierter Pfade, zu lösen und von zweidimensionalen

Energieprofilen zu dreidimensionalen Energieoberflächen (*energy landscapes*) überzugehen. Erstere wurden in Anlehnung an chemische Reaktionen auf die Proteinfaltung übertragen und entstammen der Annahme, dass sich der Reaktionsverlauf durch Auftragen des Energieverlaufes gegen eine Reaktionskoordinate, wie z. B. dem Abstand zweier an der Reaktion beteiligter Atome, darstellen lässt. Bei der Proteinfaltung ist diese Vereinfachung nicht mehr ohne weiteres möglich, da man es hier mit Interaktionen zwischen tausenden von Atomen zu tun haben kann und es „eine“ Reaktionskoordinate nicht mehr gibt. Die Komplexität der Faltung zeigt sich auch darin, dass der sogenannte präexponentielle Faktor der oft zur Faltungsanalyse angewendeten Arrhenius Gleichung eine starke Temperaturabhängigkeit besitzt (Oliveberg & Fersht, 1995). Außerdem stellte sich schon früh bei der Aufklärung der Faltung einzelner Proteine eine wichtige Frage: Sind die gefundenen Intermediate tatsächlich Bestandteile des Faltungsweges (*on-pathway*) (Tsong *et al.*, 1971) oder unproduktive Sackgassen (*off-pathway*) (Ikai & Tanford, 1971)? So wurde auch das sogenannte *jig-saw puzzle model* (Harrison & Durbin, 1985) wieder aktuell. Ähnlich einem Puzzle gibt es hier mehrere Startpunkte, von wo aus die Faltung beginnen kann.

Der *new view of protein folding* (Baldwin, 1995, 1997; Dill & Chan, 1997) hat seine Grundlagen in den verbesserten theoretischen und experimentellen Techniken. In ihm werden die von Levinthal vorgeschlagenen Faltungswege (Levinthal, 1968) als nicht korrekte Lösung des Faltungsproblems angesehen. Vielmehr beschreibt ein zu einem Faltungstrichter geformtes Energieprofil (*funnel*) den Prozess der Proteinfaltung besser. Auf der einen Seite führt die Faltung zum globalen Energieminimum, welches eine Bestätigung von Anfinsens Experimenten ist (Anfinsen, 1973). Andererseits wird durch die Annahme von vielen parallelen Faltungsrouten auf einem derartigen Energieprofil die Faltung in biologisch relevanten Zeiträumen ermöglicht (Karplus & Šali, 1995; Dill & Chan, 1997; Chan & Dill, 1998). Statt Proteinfaltung als Prozess zu betrachten, in welchem alle Polypeptidketten die

gleiche Abfolge von Reaktionen durchlaufen, veranschaulicht der *new view*, dass die makroskopische Faltung eine Überlagerung von mikroskopisch sehr heterogenen Vorgängen sein kann. Der denaturierte Zustand ist dabei eine Ansammlung von energetisch unterschiedlichen Konformationen, von denen jede für sich der Startpunkt einer Faltungsrouten ist. Das gemeinsame Ziel ist der Zustand minimalster Energie, der native Zustand. Faltungsintermediate sind dabei missgefaltete, kinetisch gefangene Moleküle, die sich in lokalen Energieminima anhäufen, diese aber durch das Erreichen des Übergangszustandes wieder verlassen können. Reaktionen mit hohen Aktivierungsenergien, die dadurch zu kinetischen Fallen werden können, sind z. B. Prolinisomerisierungen und das Knüpfen bzw. Lösen von Disulfidbrücken (Baldwin, 1995; Wolynes *et al.*, 1995; Dill & Chan, 1997). Der *new view of protein folding* stellt an die Aufklärung der Faltung mit theoretischen und experimentellen Mitteln besondere Anforderungen. Nach diesem Modell ist unter anderem die Änderung in den Freiheitsgraden der Polypeptidkette ein wichtiger Parameter, um den Fortgang des Faltungsprozesses zu beschreiben. Dazu versucht man, Strukturänderungen im Milli- und Nanosekundenbereich sowie Strukturfluktuationen auf atomarer Ebene zu verfolgen. Eine Herangehensweise ist, während der Faltung die Bindungswinkel im Protein zu messen (Dill & Chan, 1997). Darüber hinaus versucht man, mittels Triplet-Triplet-Energietransfer in mit Chromophoren modifizierten Peptiden die Geschwindigkeit der Ausbildung von Seitenkettenkontakten zu messen (Bieri *et al.*, 1999). Messtechnische Probleme sowie bisher nicht ausreichende Rechenleistung zur Simulation und Analyse der Faltungsmodelle erschweren momentan noch den Fortschritt auf diesem Forschungsgebiet.

1.1.2.2. Faltungskatalysatoren – Effekte in vitro

Seit den Arbeiten von Anson und Mirsky (1925) ist man davon ausgegangen, dass die dreidimensionale Struktur nativer Proteine allein durch die Aminosäuresequenz bestimmt wird (Anfinsen, 1973). Dennoch sind seit mehreren Jahren Proteine bekannt, welche langsame,

d. h. mit hohen Aktivierungsenergien verbundene Faltungsreaktionen beschleunigen können (Fischer & Schmid, 1990; Gething & Sambrook, 1992; Hendrik & Hartl, 1993). Diese werden als Faltungskatalysatoren bezeichnet. Im Gegensatz zu den sogenannten Chaperonen, die über gezieltes Binden und Loslassen der faltenden Polypeptidkette im Stande sind, das Gleichgewicht zu Gunsten einer Spezies zu verschieben, beeinflussen Faltungskatalysatoren den Übergangszustand bestimmter Prozesse. Zu diesen, die für den Ablauf der Proteinfaltung geschwindigkeitsbestimmend sein können, zählt man die Ausbildung von Disulfidbrücken (Creighton, 1986; Huppa & Ploegh, 1998) und *cis/trans*-Isomerisierungen von Xaa-Pro-Peptidbindungen (Fischer & Schmid, 1990; Kiefhaber & Schmid, 1992). Man teilt die Faltungskatalysatoren aufgrund ihrer Funktion in zwei Klassen ein, in Proteindisulfidisomerasen (PDI) bzw. DsbA (Freedman, 1984; Bardwell *et al.*, 1991; Wunderlich & Glockshuber, 1993) und Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPI) (Fischer & Schmid, 1990).

In Abhängigkeit von den Redoxbedingungen *in vitro* katalysieren PDI und DsbA in Peptiden und Proteinen Redoxreaktionen von Cysteinen und Disulfiden (Freedman, 1991; Lyles & Gilbert, 1991; Wunderlich & Glockshuber, 1993; Gilbert, 1998). Dabei fungiert ein in allen Oxidoreduktasen vorkommendes -CXXC- Sequenzmotiv als aktives Zentrum (Bardwell *et al.*, 1991). Eines der Cysteine weist einen stark herabgesetzten pK-Wert auf (Hawkins *et al.*, 1991; Hawkins & Freedman, 1991). In der katalytischen Reaktion wird ein gemischtes Disulfid zwischen der Oxidoreduktase und dem Substratprotein ausgebildet. Eine sequenz- oder strukturbezogene Substratspezifität ist darüber hinaus nicht nachgewiesen worden. Dennoch lässt die Interaktion mit disulfidfreien Peptiden und Proteinen wie GAPDH vermuten, dass eine gewisse Chaperon-Aktivität vorhanden ist (Noiva *et al.*, 1991; Cai *et al.*, 1994; Noiva & Lennarz, 1992; Wang & Tsou, 1993; Wang, 1998). Beide Funktionen der PDI sind für die Reaktivierung der reduzierten und denaturierten sauren Phospholipase A₂

essentiell (Yao *et al.*, 1997). Es konnte in wenigen Fällen gezeigt werden, dass mit der Katalyse der Disulfidbrückenbildung auch eine Erhöhung der Renaturierungsausbeute des Substrates einhergeht (Weissmann & Kim, 1993; Lilie *et al.*, 1994). PDI ist kein sehr effektives Enzym ($1,5 \times 10^{-2}$ - $2,9 \times 10^{-2}$ s⁻¹; Darby *et al.*, 1996), was sich schon aufgrund seiner hohen Konzentration im ER vermuten lässt. Hohe Konzentrationen sind oft eine Voraussetzung, um eine Katalyse *in vivo* wie auch *in vitro* beobachten zu können (Lyles & Gilbert, 1991).

PPIs aus den Familien der Cyclophiline und der FKBP's unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Außerdem wird die jeweilige Spezifitätskonstante k_{cat}/K_m unterschiedlich stark von den Prolin-flankierenden Aminosäuren beeinflusst. Während Cyclophiline unempfindlich gegenüber dem Austausch dieser Reste sind, kann sich der k_{cat}/K_m -Wert der FKBP's um den Faktor 1000 ändern, wenn die Aminosäure vor dem Prolin verändert wird (Stein, 1993; Fischer, 1994; Harrison & Stein, 1990). Alle PPIs beschleunigen aber auf die gleiche Art und Weise die *cis/trans*-Isomerisierung von Xaa-Pro-Bindungen. Dieser Mechanismus wird als *catalysis by distortion* bezeichnet (Park *et al.*, 1992). Die Faltung von Proteinen wird in den meisten Fällen in Anwesenheit einer Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase signifikant beschleunigt. Allerdings ist dieser Effekt von der Zugänglichkeit der betreffenden Xaa-Pro-Bindungen durch das Enzym abhängig (Kiefhaber *et al.*, 1990).

1.2. Die Struktur und Faltung von Antikörpern

1.2.1. Antikörper und der *immunoglobulin fold*

Antikörper oder Immunoglobuline (Ig) sind die Träger der humoralen Immunität, die sich vor allem gegen Bakterien und die extrazelluläre Phase von Virusinfektionen richtet (Janeway & Travers, 1997). Sie stellen eine Klasse von strukturell hoch konservierten Proteinen dar, die

sich dennoch durch eine enorme biologische Flexibilität auszeichnen (Alzari *et al.*, 1988). Das Immunglobulin G setzt sich aus zwei leichten (L) Ketten vom κ - oder λ -Typ und zwei schweren (H) Ketten vom γ -Typ zusammen (Amzel & Poljak, 1979). Diese Untereinheiten lagern sich über Disulfidbrücken und zusätzliche nichtkovalente Wechselwirkungen zusammen und ergeben ein T- bzw. Y-förmiges (L-H)₂-Dimer, dessen Quartärstruktur eine zweizählige Symmetrieachse aufweist (Alzari *et al.*, 1988) (Abb. 1.2.1.).

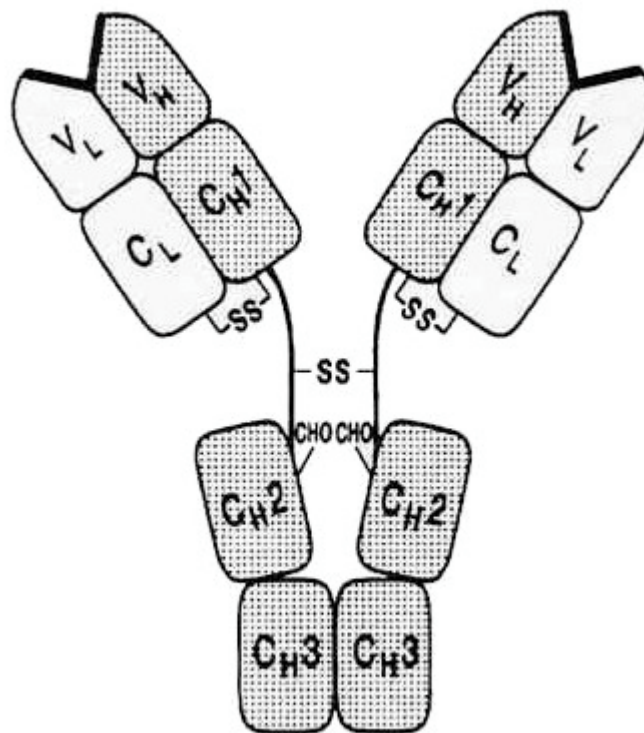


Abb. 1.2.1.: Die Darstellung eines Antikörpers vom Typ IgG.

Schematisiert nach Huston *et al.*, 1993; CHO: Glykoanteil; SS: Disulfidbrücken.

Die schwere Kette mit einem relativen Molekulargewicht von 50 000 besteht aus vier Domänen, die als V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} bezeichnet werden. Diese sind jeweils über sogenannte Ellenbogenregionen miteinander verbunden. Zwischen C_{H1} und C_{H2} liegt die *hinge*-Region, deren gering ausgebildete Sekundärstruktur dem bivalenten Antikörpermolekül eine gewisse Flexibilität verleiht. Außerdem werden durch Disulfidbrücken in diesem Bereich

kovalente Verbindungen zwischen den beiden schweren Polypeptidketten hergestellt (Davies & Metzger, 1983). Der Glykoanteil der Immunoglobuline ist über einen konservierten Asparaginrest der C_{H2}-Domäne N-glykosidisch an die H-Kette gebunden (Edelmann & Gall, 1969; Deisenhofer, 1981). Dieses hexosereiche Oligosaccharid ist zwischen den beiden C_{H2}-Domänen eingelagert und vermittelt so den gegenseitigen Kontakt in diesem Bereich der beiden schweren Antikörperketten. Dieser Bereich stellt zudem die Bindungsstelle für das Komplementsystem des Immunsystems dar (Mizuochi *et al.*, 1987). Die leichte Kette besitzt ein relatives Molekulargewicht von etwa 25 000. Sie lässt sich in die N-terminale, variable V_L- und die konstante C_L-Domäne unterteilen. Die Assoziation mit den beiden N-terminalen Domänen der schweren Kette, dem sogenannten Fd-Fragment (V_{H1} und C_{H1}), findet über nicht-kovalente Wechselwirkungen statt. Das C-terminale Ende der leichten Kette ist zusätzlich über eine Disulfidbrücke kovalent mit der schweren Kette verbunden. Die Antigenbindungsstelle wird aus den beiden variablen Domänen V_{H1} und V_L gebildet. Zusammen werden sie als Fv-Fragment bezeichnet.

Durch eine mit Papain durchgeführte unvollständige Proteolyse des IgG-Proteins wird das Molekül in drei Bruchstücke gespalten. Man erhält ein Fc-Fragment, das die C-terminalen Domänen der beiden schweren Ketten enthält, sowie zwei Fab-Fragmente, bestehend jeweils aus der leichten Kette und den beiden N-terminalen Domänen der schweren Kette (Johnstone & Thorpe, 1987). Das Fab-Fragment ist, wie der gesamte Antikörper, in der Lage, Antigen zu binden.

Die einzelnen Polypeptidketten der Antikörper können in homologe Regionen unterteilt werden, die unabhängig voneinander in kompakte Domänen (z. B. C_{H1}, C_{H2}; siehe oben) falten. Das charakteristische Faltungsmuster dieser Domänen wird als *immunoglobulin fold* bezeichnet (Amzel & Poljak, 1979). In der Literatur wird diese Topologie oft auch als *greek key β barrel* bezeichnet (Richardson, 1981). Dieses Faltungsmotiv (Abb. 1.2.2.) setzt sich aus

zwei leicht gegeneinander verdrehten β -Faltblättern (ABED und GFC bzw. GFCC'C'' bei den variablen Domänen) zusammen (Amzel & Poljak, 1979). Charakteristisch für den *immunoglobulin fold* ist ein hydrophober Bereich zwischen den beiden β -Faltblättern (Amzel & Poljak, 1979), die in den β -Strängen ABE und GFC hoch konservierte Sequenzbereiche besitzen (Lesk & Chothia, 1982). Die Verbindungsabschnitte weisen im Vergleich dazu in Bezug auf Sequenz und Struktur die größte Variabilität auf (Phizackerley *et al.*, 1979). Hypervariable Regionen, die drei sogenannten *complementary determining regions* (CDR) in den variablen Domänen V_H und V_L , bilden die Antigenbindungstelle (Abb. 1.2.1; Kehoe & Capra, 1971). Diese, die Faltblattstränge verbindenden *loop*-Strukturen werden von hochkonservierten sogenannten *framework regions* begrenzt (Amzel & Poljak, 1979).

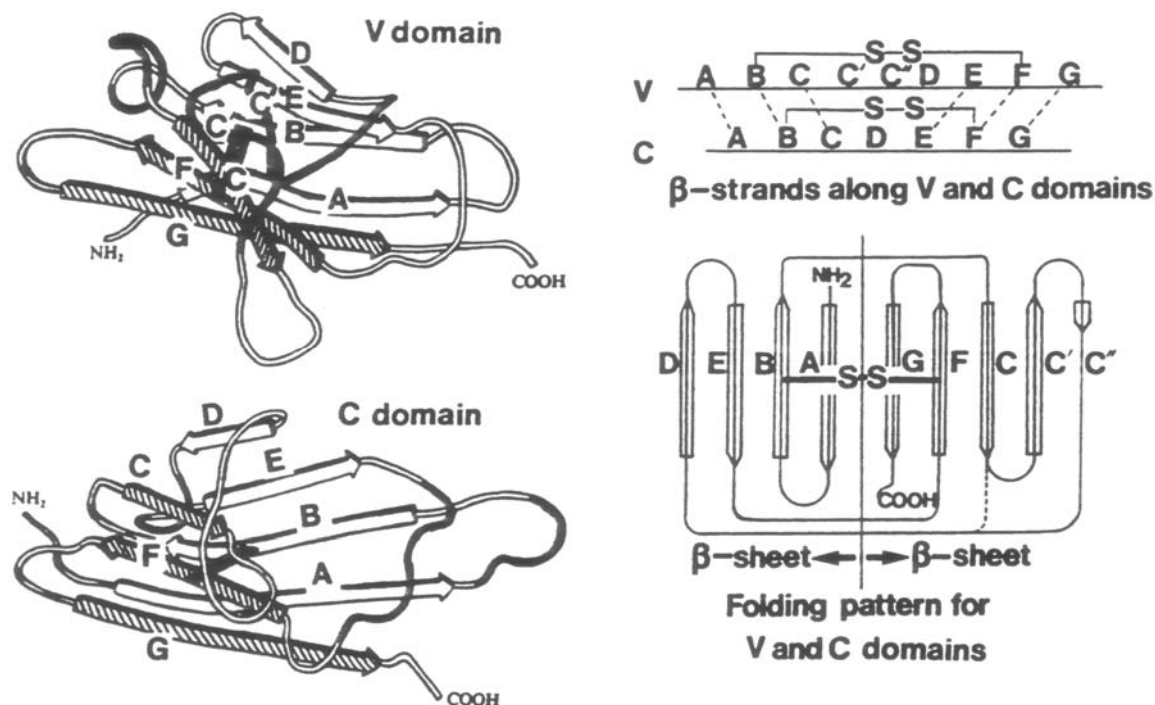


Abb. 1.2.2.: Die Darstellung des *immunoglobulin fold* der V- und C-Domäne (aus Williams & Barclay, 1988). Links: Strukturbilder der Immunoglobulin- V_L und C_L -Domänen. Rechts: Schematische Darstellung des Faltungsmusters (gleiche Beschriftung wie links).

Zwischen den β -Strängen B und F verbindet eine interne, senkrecht zur Faltblattebene liegende Disulfidbrücke die beiden Faltblätter miteinander (Williams & Barclay, 1988). Diese

kovalente Verbindung ist hoch konserviert und trägt maßgeblich zur Stabilität der Antikörperdomänen bei (Goto & Hamaguchi, 1979; Rudikoff & Pumphrey, 1986). Dieses zeigten Untersuchungen an einzelnen Antikörperdomänen, bei denen nach der Entfernung der Disulfidbrücke die Struktur weitgehend unbeeinflusst blieb, die Proteine jedoch deutlich an Stabilität einbüßten (Goto & Hamaguchi, 1979; Rudikoff & Pumphrey, 1986; Frisch *et al.*, 1996; Bell, 1997; Proba *et al.*, 1997; Wörn & Plückthun, 1998). Umgekehrt kann durch das Einführen von Disulfidbrücken im *core* des Proteins die Stabilität von Antikörperfragmenten erhöht werden (Proba *et al.*, 1997).

Die Assoziation zum IgG-Tetramer wird, neben der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den beiden schweren sowie zwischen schwerer und leichter Kette, im wesentlichen durch hydrophobe Wechselwirkungen gewährleistet. Diese werden durch konservierte Aminosäurenreste auf den viersträngigen Faltblättern der Immunoglobulin-Domänen verursacht (Padlan *et al.*, 1987). So liegen auch isolierte C_{H3}-Domänen im nativen Zustand als Dimer vor (Phizackerley *et al.*, 1979; Isenmann *et al.*, 1979; Sumi & Hamaguchi, 1982; Mayer, 1993; Dall'Acqua *et al.*, 1998). Durch die Ausbildung einer dreischichtigen Kontaktfläche wechselwirken die variablen Domänen miteinander. Diese setzt sich aus den beiden viersträngigen Faltblattstrukturen sowie einer dazwischenliegenden Schicht verdrehter Faltblattstränge zusammen (Chothia *et al.*, 1985).

Neben den Antikörpern sind eine ganze Reihe von Proteinen bekannt, deren Domänen ebenfalls, trotz erheblicher Sequenzunterschiede, eine *immunoglobulin fold*-ähnliche Topologie aufweisen. Für all diese Proteine wurde der Begriff der Immunoglobulin-Superfamilie geprägt (Bork *et al.*, 1994). Dass die Zuordnung zur Ig-Superfamilie aufgrund dieses Faltungsmotives gerechtfertigt ist, zeigt die Beobachtung, dass ein Großteil dieser Proteine an Wechselwirkungen mit Zellen bzw. mit Proteinen beteiligt ist (Williams & Barclay, 1988). Zu nennen sind hier der Rezeptor für Wachstumshormone (de Vos *et al.*,

1992), aber auch Neuroglian (Huber *et al.*, 1994), der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Ghosh *et al.*, 1995), Matrixproteine wie Tenascin (Leahy *et al.*, 1992) und Fibronectin (Main *et al.*, 1992), Enzyme wie Cyclodextringlycosyltransferase (Klein & Schulz, 1991) und Regulationsproteine wie das bakterielle Chaperon PapD (Holmgren & Bränden, 1989).

1.2.2. Die Faltung von Antikörpern *in vivo*

Antikörper sind sekretorische Proteine, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und assembliert werden. Faltung und Assoziation der H- und L-Ketten erfolgt bereits während der Translation (Bergmann & Kuehl, 1979; Melnick *et al.*, 1992). Freie translatierte L-Ketten haben nur für wenige Minuten die Fähigkeit, sich an passende H-Ketten anzulagern. Nach durchschnittlich zwei Stunden werden sie als Monomere aus den Zellen sezerniert. Die Ausbildung aller weiteren kovalenten Bindungen zum nativen (L-H)₂-Molekül erfolgt, nachdem die Polypeptidketten vollständig am Ribosom synthetisiert wurden (Bergmann & Kuehl, 1979). Der überwiegende Teil der Disulfidverbrückungen zwischen den einzelnen Ketten bildet sich schon an den naszierenden H-Ketten, wobei dieser Prozess auch im ER von PDI katalysiert wird (Freedman, 1991). Dabei muss die H-Kette ein Molekulargewicht von 38 kDa (entspricht drei Domänen) und vermutlich Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen, bevor die leichte Kette kovalent mit der schweren Kette verknüpft werden kann. Dieses konnte mit Hilfe sogenannter MOPC 21-Zellen (*mouse myeloma*-Zellen für die Assemblierung von jeweils zwei H-Ketten) und MOPC 11-Zellen (*mouse myeloma*-Zellen für die Assemblierung von L- und H-Ketten) nachgewiesen werden (Bergmann & Kuehl, 1979). Freie H-Ketten kann die Zelle nicht sekretieren (Haas & Wabl, 1983). Sie werden von einem Chaperon der Hsp70-Familie namens BiP (*heavy chain binding protein*) gebunden. Diese Klasse von Proteinen bindet entfaltete Polypeptidketten, die in das ER transportiert werden. Potentielle Bindungsstellen befinden sich dabei auf den Domänen V_H, C_{H1} und C_{H3} (Hendershot *et al.* 1987; Knarr *et al.*, 1995). BiP wird durch Bindung der H-

Kette an die L-Kette verdrängt. Dieses ermöglicht den Export des Komplexes aus der Zelle (Cremer *et al.* 1993). Wenn die H-Kette nicht korrekt gefaltet und exportiert wird, löst sich BiP ab. Anschließend wird die Kette abgebaut (Cremer *et al.*, 1993). Darüber hinaus wird vermutet, dass noch ein weiteres Protein an Faltung und Assoziation von Antikörpern beteiligt ist. So wurde ein ternärer Komplex von Immunglobulinketten mit BiP und Grp94, einem ER-Mitglied der Hsp90-Familie, nachgewiesen (Melnick *et al.*, 1992).

1.2.3. Antikörperfaltung und -stabilität *in vitro*

Der Übergang von ungeordneten *coil*- zu β -Strukturen ist im Gegensatz zum *coil*/Helix-Übergang, bei dem sich Helices an verschiedenen Orten der Polypeptidkette unabhängig voneinander bilden und wieder auflösen, ein Phasenübergang erster Ordnung. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten „Alles-oder-Nichts-Prozess“, der die Umwandlung eines ganzen Moleküls mit sich zieht (Finkelstein, 1991). Für die Ausbildung von β -Strukturen wird ein *β -hairpin-loop*, ein zwei Faltblattstränge verbindender *loop*, als Faltungsnukleus angesehen (Blanco *et al.*, 1994; Holm *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 1997; Schönbrunner *et al.*, 1997b; Ramirez-Alvarado *et al.*, 1999). Dessen Bildung scheint früh in der Faltung aufzutreten und geschwindigkeitsbestimmend zu sein. Die Strukturbildung erfolgt, wenn das β -Faltblatt groß genug ist, um eine globale Reduktion der freien Energie zu ermöglichen (Finkelstein, 1991). Das bedeutet, dass die Bildung einzelner Sekundärstrukturelemente eng mit der Ausbildung der nativen Tertiärstruktur gekoppelt ist. Die aus der Nukleation entstandene Struktur wird anschließend durch langsame Umfaltungsreaktionen stabilisiert (Finkelstein, 1991).

Ein Modellsystem, an dem viele grundlegende *in vitro*-Untersuchungen zum *immunoglobulin fold* gemacht wurden, sind Antikörper bzw. deren Fragmente. Besonders die Arbeiten zur Faltung der leichten Kette und ihrer Fragmente C_L und V_L (Goto *et al.*, 1979;

Goto & Hamaguchi, 1982a & 1982b; Tsunenaga *et al.*, 1987), zur Faltung einer proteolytisch erzeugten C_{H3}-Domäne (Isenman *et al.*, 1979; Sumi & Hamaguchi, 1982) sowie zur Faltung des Antikörpers MAK33 und seiner Fragmente Fab, C_{H2} und C_{H3} (Buchner, 1987; Buchner *et al.*, 1991; Lilie *et al.*, 1993; Lilie & Buchner, 1995; Lilie *et al.*, 1995a & 1995b; Lilie, 1995; Pirkl, 1996; Mayer, 1993; Bell, 1997; Mayer, 1998; Kammermeier, 1999) sind hier zu nennen.

Antikörperdomänen enthalten viele Proline, von denen einige im nativen Zustand in der *cis*-Konfiguration vorliegen (Deisenhofer, 1981). Da Prolin-Isomerisierungen mit hohen Aktivierungsenergien verbunden sind (Schmid, 1993), ist dieser Prozess in der Antikörperfaltung meist geschwindigkeitsbestimmend. Aber auch auf die Entfaltung der Proteine kann die *cis/trans*-Isomerisierung Auswirkungen haben. Die Betrachtung der isolierten, proteolytisch erzeugten C_L-Domäne zeigte bei GdmCl-Konzentrationen jenseits des Überganges eine einphasige und reversible Entfaltung (Goto & Hamaguchi, 1982a). Mittels *stopped flow*-Messungen im Übergang fanden sich bei der Entfaltung jedoch zwei Phasen. Die Rückfaltung erwies sich ebenso als zweiphasig mit der Bildung eines frühen, nativähnlichen Faltungsintermediates. Daraus wurde gefolgert, dass die Domäne denaturiert in zwei Zuständen (U₁ und U₂) vorliegt. Die beiden Formen lassen sich durch *cis/trans*-Isomerisierung von Prolinen ineinander umwandeln. Dieses ist bei der Rückfaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Goto & Hamaguchi, 1982a). Bei kinetischen Untersuchungen der V_L-Domäne wurden ebenfalls beide Zustände nachgewiesen (Tsunenaga *et al.*, 1987). Für die Faltung dieser beiden Domänen konnte folgendes Schema aufgestellt werden: U₁ ⇌ U₂ ⇌ N. Weitere Faltungsuntersuchungen an C_{H3}-Domänen (Isenmann *et al.*, 1979; Sumi & Hamaguchi, 1982; Mayer, 1998) sowie der leichten Kette und dem Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers MAK33 konnten das Vorliegen von zwei, sich in der Konfiguration von Xaa-Pro-Bindungen unterscheidenden, denaturierten Zuständen

bestätigen (Lang *et al.*, 1987; Lilie *et al.*, 1993). Bei der leichten Kette vom κ -Typ verhalten sich C_L - und V_L -Domäne bei der Entfaltung unabhängig voneinander.

Disulfidbrücken spielen nicht nur eine stabilisierende Rolle für den *immunoglobulin fold* selbst, sondern beeinflussen auch dessen Faltungsprozess. Die reduzierte Form der C_L -Domäne ist gegenüber der oxidierten deutlich instabiler (Goto & Hamaguchi, 1979). Die Konformation jedoch ist kaum verändert. Das Fehlen der Disulfidbrücke verlangsamt aber die schnelle Faltungsphase etwa um den Faktor 100 (Goto & Hamaguchi, 1982b). Diese intramolekulare kovalente Verbindung spielt somit auch eine wichtige kinetische Rolle bei der Beschleunigung des Faltungsablaufes. Wird die Rückfaltung unter oxidierenden Bedingungen ausgehend vom denaturierten, reduzierten Protein durchgeführt, so tritt ein frühes Faltungsintermediat auf, bei dem die Disulfidbrücke noch nicht ausgebildet ist. Auch bei der reduzierten C_{H3} -Domäne bleibt die Konformation trotz des Fehlens der Disulfidbrücke weitgehend unberührt. Durch spektroskopische Messungen wurde nur eine leicht veränderte räumliche Struktur festgestellt. Die Domäne ist wie das reduzierte C_L -Fragment im Vergleich zur oxidierten Form deutlich instabiler und aggregationsempfindlicher (Bell, 1997).

Viele *in vitro*-Faltungsstudien wurden mit dem monoklonalen Antikörper MAK33 und dessen Fragmenten durchgeführt. Die rekombinant erzeugte C_{H3} -Domäne liegt als stabiles Dimer vor. Die spektroskopischen Untersuchungen weisen diese Untereinheit als β -Faltblatt-Protein aus. Der GdmCl-Übergang ist hoch kooperativ und reversibel. Die Denaturierung ist einphasig, während bei der Renaturierung drei Phasen nachzuweisen sind. Eine der langsamen Phasen läßt sich durch Zugabe von PPI beschleunigen und ist somit auf eine Prolyl-Isomerisierung zurückzuführen (Mayer, 1993; Mayer, 1998).

Die rekombinant erzeugte, monomere C_{H2} -Domäne ist im Vergleich zu C_{H3} instabiler gegenüber thermischer und chemischer Denaturierung. Da diese Domäne im Antikörper

vermutlich hauptsächlich über die Wechselwirkungen mit dem Kohlenhydratrest stabilisiert wird, ist die Instabilität des rekombinanten Proteins wahrscheinlich auf dessen Fehlen zurückzuführen. Faltung und Entfaltung sind reversibel. Die Denaturierungskinetiken weisen im Gegensatz zur C_{H3}-Domäne zwei Phasen auf. Eine davon wird höchstwahrscheinlich durch Prolinisomerisierungen verursacht. Wie bei allen bisher untersuchten Domänen verläuft die Renaturierung in mehreren Phasen, von denen eine aufgrund von *double-jump*-Messungen wiederum einer Prolinisomerisierung zugeordnet werden kann (Pirkel, 1996).

Faltungsintermediate und deren Bildung wurden anhand der Faltung des Fab-Fragmentes von MAK33 untersucht. Wie eine kinetische Analyse der Renaturierung der oxidierten Form zeigte, treten vier unterschiedliche Faltungsintermediate mit schon assoziierten Ketten auf (Lilie, 1995). Diese Intermediate deuten auf vier verschiedene Faltungswege zum nativen Protein hin. Sie unterscheiden sich in der Konfiguration ihrer Proline und der kovalenten Verbindung der beiden Polypeptidketten. Ausgangspunkt für die Rückfaltung ist entweder ein denaturiertes Protein, bei dem sich alle Proline in nativer Konfiguration befinden (U_c), oder eines, bei dem die Proline *trans*-Konfiguration aufweisen (U_t). Über einen schnellen Faltungsschritt werden die isoliert gefalteten Ketten (I_c und I_t) gebildet. Anschließend erfolgt eine schnelle Assoziationsreaktion zu den Intermediaten D_c und D_t und ein zusätzlicher schneller Schritt zum nativen Protein. Es liegt nahe anzunehmen, dass die Assoziation der leichten mit der Fd-Kette (V_H und C_{H1}) und somit die Ausbildung der Quartärstruktur die *cis*-Konfiguration des Prolins bestimmt (Lilie *et al.*, 1995a).

Bei pH 2 weist der monoklonale Antikörper MAK33 eine Struktur auf, die einen *molten globule*-ähnlichen Charakter besitzt und als *alternatively folded state* bezeichnet wird. Dieser Zustand besitzt sowohl Sekundär- als auch Tertiärstruktur. Die hohe Stabilität von MAK33 im *alternatively folded state* gegenüber Denaturierungsmitteln, die sonst für ein natives Protein charakteristisch ist, ist eine Eigenschaft, in der er sich vom *molten globule* unterscheidet

(Buchner *et al.*, 1991). Auch für das Fab-Fragment von MAK33 wurde dieser Zustand nachgewiesen (Lilie & Buchner, 1995). Da ein an den Cysteinen alkyliertes Fab-Fragment keinen *alternatively folded state* aufweist, nimmt man an, dass die kovalente Verknüpfung der leichten mit der Fd-Kette über Disulfidbrücken wichtig für die Stabilität dieses Zustandes ist (Lilie & Buchner, 1995). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die C_H3-Domäne von MAK33 den *alternatively folded state* annehmen kann, allerdings nur durch die Erhöhung der Ionenstärke (Kammermeier, 1999).

1.3. Problemstellung

Die Faltung von Antikörpern ist aufgrund ihres komplexen Aufbaus bis heute noch weitgehend unverstanden. Ihre Unterteilung in Fragmente und Domänen bietet die Möglichkeit, die Faltung und Stabilität der einzelnen Untereinheiten zu untersuchen. In dieser Arbeit stand der Vergleich zweier konstanter Domänen des monoklonalen Antikörpers MAK33 aus Maus (Typ γ /IgG1) im Mittelpunkt. Das rekombinant als Monomer auftretende C_H2 sowie die sich C-terminal anschließende C_H3-Domäne, die ein Homodimer bildet, sollten hinsichtlich Struktur, Stabilität und Faltung untersucht werden. Dabei sollte insbesondere der Einfluss der Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücke sowie die Absenkung des pH-Wertes auf die Konformation und Stabilität analysiert werden. Da die Domänen in ihrer nativen Struktur Peptidyl-Prolyl-Bindungen in *cis*-Konfiguration besitzen, war von Bedeutung, deren Isomerisierung mit der Art und Anzahl von Faltungswegen zu korrelieren sowie den Einfluss des Enzyms Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPI) auf diese Prozesse zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendetes Material

2.1.1. Bakterienstämme

<i>E.coli</i> HB101	<i>supE44 hsdS20 (r_R⁻m_R⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20xyl-5 mtl-1</i> (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969; Bolivar & Backmann, 1979)
<i>E.coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB) F'</i> [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15</i>] (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)

2.1.2. Plasmide

pSM21	Plasmid zur periplasmatischen Expression der C _H 3-Domäne (Mayer, 1993)
pAkf-T5/C _H 2	Expressionsplasmid für C _H 2 (Thies, 1997; Thies & Pirkl, 2000)
pAkf-T5/Fc	Expressionsplasmid mit dem Gen für das MAK33-Fc-Fragment

2.1.3. Proteine

Pwo DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
T4 DNA Ligase	Promega (Madison, USA)
Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
DNase I	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Restriktionsnukleasen	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Eichproteine für HPLC	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

2.1.4. Standards und Kits

DNA-Längenstandard λ /BstE II

New England Biolabs
(Schalbach)

EcoRI- und *HindIII*-verdaute λ -DNA als Größenstandard für die Agarosegelelektrophorese.

High Pure™ Plasmid Isolation Kit

Roche Diagnostics GmbH
(Mannheim)

Low-Range Molekulargewichtsstandard
(LMW, SDS-PAGE)

Biorad Laboratories
(München)

Für die Silberfärbung wurde die Stammlösung 1:100, für die Färbung nach *Fairbanks* 1:20 mit H₂O bidest. verdünnt.

2.1.5. Chemikalien

Acrylamidlösung (38% mit 2% Bisacrylamid, 19:1)

Roth GmbH & Co (Karlsruhe)

Agarose, ultra pure

Biozym (Oldendorf)

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Serva (Heidelberg)

Ampicillin

Sigma (St. Louis, USA)

Bacto Agar

Difco Laboratories
(Detroit, USA)

Bacto Trypton

Difco Laboratories
(Detroit, USA)

Bacto Yeast Extract

Difco Laboratories
(Detroit, USA)

Bromphenolblau S

Serva (Heidelberg)

Coomassie Blau R250

Serva (Heidelberg)

Coomassie Protein Assay Reagent

Pierce (Rockford, USA)

Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)

Pharmacia
(Uppsala, Schweden)

1,4-Dithiothreitol (DTT)

Roth GmbH & Co (Karlsruhe)

Ethidiumbromid

Fluka (Buchs, Schweiz)

Glutaraldehyd, 25% in Wasser

Serva (Heidelberg)

L-Glutathion, oxidiert (GSSG) und reduziert (GSH)

Roche Diagnostics GmbH
(Mannheim)

Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl), ultra pure	ICN (Aurora, USA)
Iodacetamid	Merck (Darmstadt)
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol (Hamburg)
Kanamycin	Sigma (St. Louis, USA)
2-Mercaptoethanol, reinst	Serva (Heidelberg)
3-[N-Morpholino-]propansulfonsäure (MOPS)	Sigma (St. Louis, USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Pefabloc	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Ponceau S	Sigma (St. Louis, USA)
Polymyxin B Sulfat	Sigma (St. Louis, USA)
Silbernitrat	Sigma (St. Louis, USA)
N,N,N',N'- Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma (St. Louis, USA)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	USB (Cleveland, USA)
Triton X-100	Merck (Darmstadt)

Weitere Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Sie besitzen, wenn nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad p.A. Lösungen und Puffer wurden mit quartzbidestilliertem Wasser, Medien mit Reinwasser hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte unter Beachtung des Temperaturkoeffizienten der entsprechenden Puffersubstanz bei der jeweiligen Temperatur.

2.1.6. Antibiotika und Nährmedien (Sambrook *et al.*, 1989)

Für die Arbeiten mit Bakterien wurden Lösungen und Medien nach ihrer Herstellung autoklaviert bzw. sterilfiltriert (Sambrook *et al.*, 1989). Die Lagerung erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur.

2.1.6.1. Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung: Lösung in Wasser; Konzentration 100 mg/ml; bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabil; wird dem Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

Kanamycin-Stammlösung: Lösung in Wasser; Konzentration 30 mg/ml; bei -20 °C stabil;
wird dem Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

2.1.6.2. Nährmedien für die Anzucht von *E.coli*

LB₀-Medium: Bacto Trypton 10 g/l
 Yeast Extract 5 g/l
 NaCl 5 g/l
mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt;
für LB₀-Platten: 15 g/l Bacto Agar zufügen.

SB₀-Medium: Bacto Trypton 20 g/l
 Yeast Extract 10 g/l
 NaCl 5 g/l
 K₂HPO₄ 2,5 g/l
 MgSO₄·7 H₂O 1 g/l
pH 7,5 mit NaOH eingestellt.

2.1.7. Puffer und Lösungen

2.1.7.1. Lösungen für gentechnische Methoden

Agarose-Lösung (1%): Agarose 1 g
 TAE (1x) 100 ml
 Ethidiumbromid-Lsg. 1 µl
(Zugabe nach Abkühlung auf ca. 60 °C)

DNA-Auftragspuffer: Glycerin 50 % (v/v)
 Xylencyanol 0,25 % (w/v)
 Bromphenolblau 0,25 % (w/v)

Ethidiumbromid-Lsg.: Ethidiumbromid 0,04 % (w/v)

TAE-Puffer (50x): Tris/Acetat 2 M
 EDTA 50 mM
pH 8,0 mit Eisessig eingestellt.

2.1.7.2. Puffer für proteinchemische und präparative Methoden

Periplasmaaufschluß:

Puffer A (Waschpuffer): 50 mM NaCl
20 mM MOPS
pH 7,5

Puffer B (Aufschlußpuffer): 10 mM MOPS
5 mM EDTA
1,5 mg/ml Polymyxin B Sulfat (frisch zugeben)
pH 7,0

Gesamtzellaufschluß:

Aufschlußpuffer: 100 mM Tris/HCl
0,1 % Triton X-100
1 mg/ml Lysozym
pH 7,5

Nativ-/Aufbewahrungspuffer:

100 mM Tris/HCl
pH 7,5

Lämmli-Puffer (5x):

5 % SDS (w/v)
100 mM Tris/HCl
0,001 % Bromphenolblau
pH 6,8

2.1.8. Materialien für die Chromatographie

BioSep-SEC-S2000	Phenomenex (Torrance, USA)
Butylsepharose <i>ff</i>	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Resource Q	Pharmacia (Uppsala, Schweden)

S-Sepharose	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Superdex 75 <i>pg</i>	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Superdex 75 <i>hr</i>	Pharmacia (Uppsala, Schweden)

2.1.9. Weitere Materialien

Amicon-Ultrafiltrationsmembran YM3 und YM10	Amicon (Lexington, USA)
Centricon Mikrokonzentratoren 3 und 10	Amicon (Lexington, USA)
Dialyseschläuche Spectra/Por (Ausschlussgröße 6-8 kDa)	Spectrum (Houston, USA)
Greiner-Röhrchen aus Polyethylen	Greiner & Söhne (Nürtingen)
Kulturröhrchen (17 x 100 mm)	Elkay Laboratory Products (Hampshire, Großbritannien)
Petrischalen aus Polystyrol (Ø 94 mm)	Schleicher & Schüll (Dassel)
pH-Indikatorstreifen	Merk (Darmstadt)
Sterilfilter 0,2 µm	Renner (Dannstadt)

2.1.10. Geräte

2.1.10.1. Absorptionsspektrophotometer

Jasco V-550 UV/VIS-Spektrophotometer	Jasco (Groß-Umstadt)
Biochrom 4060, UV/VIS-Spektrophotometer	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Ultrospec 3000, UV/VIS-Spektrophotometer	Pharmacia (Uppsala, Schweden)

2.1.10.2. Circular dichroismus-Spektropolarimeter

Jasco J-715 mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit	Jasco (Groß-Umstadt)
--	-------------------------

π^* -180 *stopped flow* CD-Spektropolarimeter
Applied Photophysics
(Leatherhead, Großbritannien)

2.1.10.3. *Spektrofluorimeter*

FluoroMax I Fluoreszenz-Spektrophotometer
Jobin Yvon (Grasbrunn)
FluoroMax II Fluoreszenz-Spektrophotometer
Jobin Yvon (Grasbrunn)
SX-18MV *Stopped flow* Spektrofluorimeter
Applied Photophysics
(Leatherhead, Großbritannien)

2.1.10.4. *Massenspektrometer*

BIO-Q Triple-Quadrupole Massenspektrometer
mit Elektrospray-Ionenquelle
Micromass (Eschborn)
Voyager DE *time of flight* Massenspektrometer
mit MALDI-Ionenquelle
PerSeptive Biosystems
(Boston, USA)

2.1.10.5. *Dynamische Lichtstreuung*

DynaPro MS200 DLS Spektrometer
Protein Solutions
(Charlottesville, USA)

2.1.10.6. *Chromatographie-Anlagen*

HighLoad-System
Pharmacia
(Uppsala, Schweden)
Gradientenprogrammierer GP-10
Pumpe P-50
Ventil V-7
UV-Monitor Uvicord SII
Einkanalschreiber REC 101
Fraktionskollektor RediFrac

Äkta Prime

Pharmacia
(Uppsala, Schweden)

HPLC-System

Pumpe PU-1580
Ternärer Gradientenmischer LG-980-02S
UV-Detektor UV-1575
Fluoreszenzdetektor FP-920
Degaser Gastorr 153
Borwin Chromatographie-Software

Jasco (Groß-Umstadt)

2.1.10.7. Gelelektrophorese-Apparaturen

LKB 2050 Midget-Elektrophorese-Einheit

Pharmacia
(Uppsala, Schweden)

EPS 600 und 3500 Spannungsquelle

Pharmacia
(Uppsala, Schweden)

LKB GNA-100 Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur

Pharmacia
(Uppsala, Schweden)

LKB 2301 Spannungsgerät MacroDrive 1

Pharmacia
(Uppsala, Schweden)

2.1.10.8. Waagen

Analysenwaage H 54 AR

Mettler Toledo (Gießen)

Halbmikrowaage L 160 D

Sartorius (Göttingen)

2.1.10.9. Zentrifugen

Avanti™ J-25

Beckmann
(Palo Alto, USA)

J2-HS

Beckmann
(Palo Alto, USA)
mit den Rotoren JA-10, JA-25.50
und JLA-16.250.

Kühlzentrifuge Rotina 46R

Hettich (Tuttlingen)

Tischzentrifuge 5415 C

Eppendorf (München)

2.1.10.10. Weitere Geräte

Amicon Ultrafiltrationszelle

Millipore

Brutschrank

Mytron

Geldokumentationsanlage BioDoc II

Biometra (Göttingen)

Thermomixer

Eppendorf (München)

2.1.11. Computerprogramme

ImageMaster 1D Prime

Pharmacia

(Uppsala, Schweden)

Microsoft Office 97

Microsoft (Redmond, USA)

PovRay™ 3.1

POV-Team

(Williamstown, Australia)

PrimerDesign 1.02

Scientific & Educational Software,
1990

Rasmol 2.6

© R. Sayle, 1993-1995

Scientist

Micromath (Salt Lake City, USA)

SigmaPlot 5

SPSS (München)

SwissModel 3.5

GlaxoWellcome

Experimental Research

(Genf, Schweiz)

VMD 1.5

University of Illinois (USA)

2.2. Molekularbiologische Methoden

Die Anzucht der Bakterien sowie die molekularbiologischen Arbeiten wurden stets in sterilisierten Gefäßen mit sterilen Lösungen durchgeführt. Die Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.1. Kultivierung und Konservierung von *E.coli*-Stämmen

(Sambrook *et al.*, 1989)

E.coli-Stämme wurden als Flüssigkulturen in LB-Medium unter Zusatz entsprechender Antibiotika in Kulturröhrchen bzw. Erlenmeyerkolben angezogen. Die Animpfung erfolgte mit Einzelkolonien von LB-Agar-Platten oder aus Glycerin-Kulturen. Die Bakterien wuchsen bei 37 °C in einem Umluftkulturschüttler (200 rpm) bis zur gewünschten Zelldichte.

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch photometrische Ermittlung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀). Einem OD₆₀₀-Wert von 1 (Küvettenlänge = 1 cm) entspricht eine *E.coli*-Zelldichte von etwa 10⁹ Zellen pro ml Kultur (Sambrook *et al.*, 1989).

Zur Konservierung von *E.coli*-Stämmen für kürzere Zeiträume wurden diese auf LB-Agar-Platten bei 4 °C aufbewahrt. Die Lagerung über längere Zeiträume erforderte die Zugabe von 87 %igem (v/v) Glycerin zu einer Übernachtskultur, so dass entweder eine Endkonzentration von 15 % für das Einfrieren bei –80 °C oder von 55 % für die Lagerung bei –20 °C erreicht wurde.

2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Stämmen wurde der High Pure™ Plasmid Isolation Kit der Roche Diagnostics GmbH verwendet.

2.2.3. PCR-Amplifikation (Mullis & Faloona, 1987)

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ist in erster Linie eine Methode, um schnell und gezielt bestimmte DNA-Fragmente zu amplifizieren.

Die für die PCR benötigten Primer wurden so konstruiert, dass sie gleiche Schmelztemperaturen besaßen und keine selbstkomplementären Bereiche enthielten. Die

Auswahl der Primer und die Berechnung der Schmelztemperaturen wurde durch das Computerprogramm PrimerDesign (Version 1.02; Scientific & Educational Software, 1990) unterstützt.

Die PCR-Amplifikationen wurden in ultradünnen 0,5 ml PCR-Tubes (Biozym) mit folgendem Standardansatz durchgeführt:

Template-DNA	10-20 ng
Primer (100 pmol/ μ l)	jeweils 100 pmol
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 0,2 mM
Polymerase	2,5 Units
MgCl ₂	1,5 bzw. 2,5 mM
10x Reaktionspuffer und H ₂ O	ad 100 μ l

Die Reaktionen wurden nach der sogenannten *hot start*-Methode durchgeführt. Hiernach wurde der Ansatz zuerst bis auf 95 °C aufgeheizt, bevor die Polymerase zupipettiert wurde. Dieses verminderte die Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten und erhöhte die Ausbeute an PCR-Produkten.

Die PCR-Amplifikationen wurden nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	95 °C	5 min
<i>hot start:</i>	Zugabe der Polymerase	
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	65 °C	45 sec
Synthese	72 °C	1 min

Die Zahl der durchlaufenen Zyklen betrug 35. Danach wurde der Ansatz 4 min bei 72 °C belassen, um der Polymerase die Vervollständigung begonnener DNA-Stänge zu ermöglichen.

2.2.4. Enzymatische Modifizierung von DNA

2.2.4.1. *Schneiden von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen*

In analytischen und präparativen Restriktionshydrolysen von DNA wurden in der Regel 3 Units (U) der entsprechenden Restriktionsendonuklease pro 500 ng DNA eingesetzt. Der Verdau erfolgte innerhalb von 1 – 3 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C in 10 – 20 µl des von der Herstellerfirma empfohlenen Reaktionspuffers. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.4.2. *Dephosphorylierung von DNA-Enden*

Um ein Religieren der geschnittenen Vektoren zu vermeiden, wurde dem Restriktionsansatz nach beendeter Restriktionshydrolyse alkalische Phosphatase (SAP) zugefügt, welche die 5'-Phosphatgruppen abspaltet. Dafür wurden zum Reaktionsansatz pro µg Vektor-DNA 0,1 Einheiten alkalische Phosphatase und 0,1 Ansatzvolumina 10x Phosphatase-Puffer hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde nochmals Phosphatase zugegeben und weitere 30 min dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C und Auftragung auf ein Agarosegel gestoppt. Das geschnittene Fragment wurde anschließend einer *GeneClean*-Reinigung unterzogen.

2.2.4.3. *Ligation von DNA-Enden*

Das Enzym DNA-Ligase ist in der Lage, 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatgruppen von DNA-Fragmenten kovalent miteinander zu verbinden.

Der Ansatz für die Ligation enthielt in der Regel etwa 300 ng Vektor-DNA, einen drei- bis fünffachen molaren Überschuß an geschnittener Fragment-DNA und 1-2 U T4-DNA-Ligase. Das Volumen des Ansatzes variierte abhängig von der DNA-Menge zwischen 10 und 30 µl.

Es enthielt die entsprechende Menge an 10x T4-Ligasepuffer. Die Ligation erfolgte bei 4 °C über Nacht.

2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

Zur analytischen sowie zur präparativen Auftrennung von DNA wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele (Trennbereich: 0,5-10 kb) benutzt, die 0,4 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die Agarose wurde dafür in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C mit der Ethidiumbromidlösung versetzt. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x DNA-Auftragspuffer versetzt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE benutzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100-140 V für ungefähr 20 min durchgeführt. Die mit Ethidiumbromid inkubierte DNA wurde nach dem Lauf mit UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und das Ergebnis der Elektrophorese photographisch dokumentiert. Anhand des mitgelaufenen λ /BstEII-Standards erfolgte eine Zuordnung von Größe und Menge der aufgetragenen DNA-Fragmente.

2.2.6. Transformation von *E.coli*-Zellen

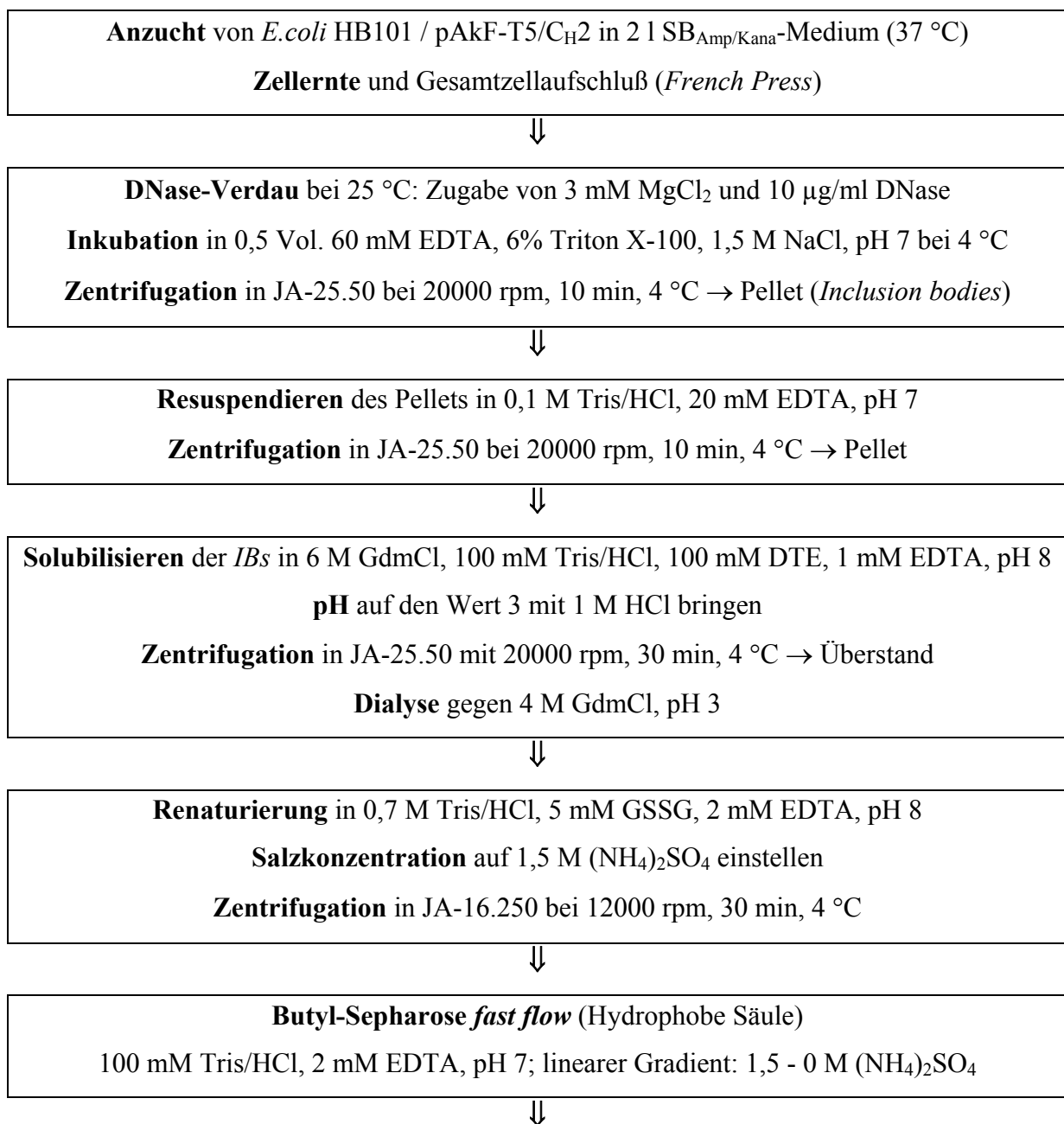
Zur Transformation wurden kompetente *E.coli*-Stämme benötigt (Sambrook *et al.*, 1989), die bei -70 °C gelagert werden können. Die Transformation erfolgte nach einer vereinfachten Form der Vorschrift nach Hanahan (Hanahan, 1983; Hanahan, 1985). Mit dieser Methode können hohe Transformationsausbeuten erzielt werden (10^7 - 10^8 Transformanden pro µg Plasmid-DNA).

Die kompetenten Zellen wurden in einem Eisbad aufgetaut. Anschließend wurden sie mit der zu transformierenden DNA des Ligationsansatzes vermischt und 25 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein 1-minütiger Hitzeschritt bei 42 °C. Der Ansatz wurde kurz auf Eis abgekühlt, bevor 1 ml LB₀-Medium zugegeben und 60 min bei 37 °C unter Schütteln

inkubiert wurde. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Bakteriensediment auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.3. Präparative Methoden

Die C_{H2}-Domäne des Antikörpers MAK33 wurde aus *E.coli* durch Überexpression in Form von *inclusion bodies* und anschließende oxidative Renaturierung gewonnen (Thies, 1997; Thies & Pirkl, 2000).



Dialyse der Fraktionen gegen 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 bei 4 °C

Ultrafiltration (Amicon mit Membran YM3, Centricon 3)

Die Reinigung der C_{H3}-Domäne der Antikörpers MAK33 erfolgte nach einer leicht modifizierten Reinigungsvorschrift von Mayer (1998).

Das Fc-Fragment (C_{H2} + C_{H3}) wurde entsprechend der Vorschrift für die C_{H2}-Domäne gewonnen (Thies, 1997; Thies & Pirkl, 2000).

2.4. Proteinchemische Methoden

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

Mit Hilfe des Ellman's Assay kann die Zahl an freien und/oder zugänglichen Thiolgruppen in Proteinen ermittelt werden. SH-Gruppen können Teil eines aktiven Zentrums von Enzymen sein oder verknüpft als Disulfidbrücken eine wichtige Funktion für die Stabilität von Proteinen erfüllen. Darum ist es von Interesse herauszufinden, wieviele der Cysteine in der Struktur des Proteins in reduziertem Zustand vorliegen bzw. wieviele an Disulfidbrücken beteiligt sind. Hier sollte ermittelt werden, ob bei der Renaturierung von C_{H2} die Disulfidbrücke der Domäne vollständig ausgebildet wurde oder ob Spezies mit freien SH-Gruppen vorlagen. Der Vergleich der Zahl der Cysteine im nativen und denaturierten Zustand erlaubt es außerdem, eine Aussage über das Vorhandensein von Cysteinen an der Oberfläche und über deren Zugänglichkeit zu machen (Ellman, 1958; Creighton, 1989).

Im Ellman's Assay reagiert das Reagenz 5,5'-Dithio-bis-Nitrobenzoesäure (DTNB) mit der SH-Gruppe zu einem gemischten Disulfid, das mit einer weiteren SH-Gruppe reagiert. Dabei wird das gelbe Nitrothiobenzoat in stöchiometrischen Mengen gebildet. Misst man die

Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm, so kann man mit dem Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei bekannter Proteinkonzentration die Zahl der SH-Gruppen berechnen.

Der Test wurde in 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 1 ml einschließlich 30 μl DTNB-Lösung (4 mg/ml in 100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 8,0) lag das Protein in einer Endkonzentration zwischen 40 und 100 $\mu\text{g/ml}$ vor. Die Extinktion wurde nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur gemessen. Zur Messung der Pufferkontrolle wurde an Stelle des Proteins die gleiche Menge Dialysepuffer hinzugegeben. Das Protein wurde für Messungen im denaturierten Zustand in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 mit 3 M GdmCl für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.4.2. Quervernetzung von Proteinen über Lysinseitenketten

Lysinseitenketten sind primäre Amine, welche mit Aldehyden und Ketonen unter Wasserabspaltung zu *Schiff*'schen Basen reagieren. Diese Reaktion macht man sich bei der Quervernetzung von Proteinen mit Hilfe von Glutardialdehyd zu Nutze.

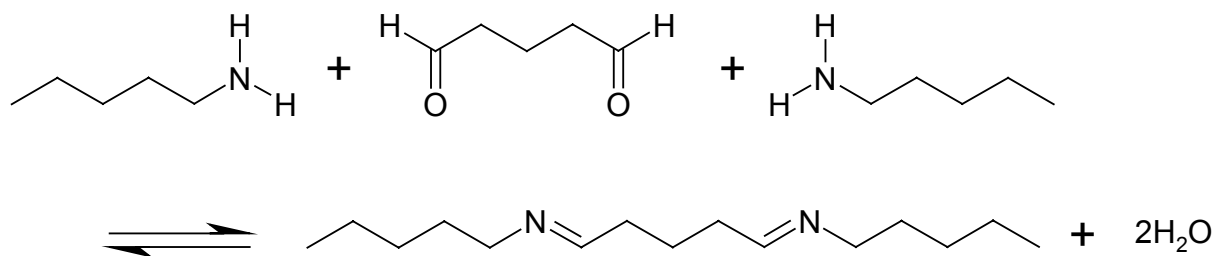


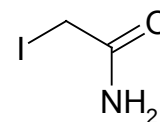
Abb. 2.4.1.: Reaktion von Glutardialdehyd mit zwei Lysinseitenketten.

Die Dimerisierung der $\text{C}_{\text{H}3}$ -Domäne während der Renaturierung wurde mittels Quervernetzung nach einer Vorschrift von Jaenicke & Rudolph (1989) verfolgt. Hierzu wurde $\text{C}_{\text{H}3}$ in 50 mM HEPES, pH 8 umdialysiert. 5 μg (= 0,4 nmol) Protein wurden mit 78 μmol Glutardialdehyd (2,6 M in H_2O = 25 %ig) bei 37 °C 2 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Reduktion des Aldehyds mit 80 μmol NaBH_4 (2 M Lösung in

0,1 M NaOH) gestoppt. Zur Analyse des Experimentes mit Hilfe von SDS-Page (siehe 2.4.5.) und densitometrischer Auswertung wurde das Protein gefällt (2.4.4.).

2.4.3. Derivatisierung von Cysteinen mit Iodacetamid

Iodacetamid (IAA) ist ein starkes Acylierungsmittel, mit dessen Hilfe reaktive Gruppen in Proteinen vor unerwünschten Reaktionen geschützt werden können. Der elektrophile Angriff - z. B. an die Thiolgruppen von Cysteinen - blockiert deren Oxidation zu Disulfidbrücken. Beschleunigend wirkt dabei die Ionisation zu Thiolat-Anionen durch Einstellen des entsprechenden pH-Wertes.



In dieser Arbeit wurde die oben beschriebene Reaktion dazu verwendet, die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke der C_{H3}-Domäne zu verfolgen. Dazu wurden Aliquots nach einer bereits früher beschriebenen Methode acyliert (Gray, 1993; Torella *et al.*, 1994). IAA wurde in 1 M Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 6,5 bei 65 °C in einer Konzentration von 2,2 M gelöst und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Während der Präparation wurde darauf geachtet, dass diese unter Ausschluss von Licht stattfand, da photolytisch gebildetes Iod stark oxidierend auf Thiolgruppen wirkt. 2 ml Proteinlösung ([C_{H3}] = 7,5 µg/ml = 0,3 µM Dimer) wurden mit 1,1 ml der IAA-Lösung vermischt (Endkonzentration IAA = 0,8 M). Die Acylierungsreaktion wurde nach 15 s im Dunkeln bei Raumtemperatur durch Zugabe von 0,9 ml 0,45 %iger Trifluoressigsäure (TFA) gestoppt und schnell gevortext. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mittels *reversed phase*-Chromatographie (siehe 2.6.) entsalzt.

2.4.4. Natriumdesoxycholat-Trichloressigsäure-Fällung

Lagen Proteine in sehr geringen Konzentrationen vor, so wurde mittels der Natriumdesoxycholat-Trichloressigsäure-Fällung (kurz: NaDoc-TCA) eine Aufkonzentrierung erzielt, um sie durch SDS-Page (siehe unten) besser analysieren zu können.

Dabei wurde die Proteinlösung, welche einen pH-Wert von über 7 besaß, mit 1/500 Volumen an 10 %iger (w/v) NaDoc-Lösung versetzt. Nach kurzer, gründlicher Durchmischung (vortexen) und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde soviel 85 %ige Trichloressigsäure zugegeben, dass der pH-Wert auf etwa 2-3 absank und das Protein ausfiel. Erneute 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur (besser: über Nacht auf Eis) und Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, RT) lieferte ein Pellet, welches in 1x Lämmli-Auftragspuffer resuspendiert und anschließend mit Hilfe von SDS-Page analysiert wurde.

2.4.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei dieser Methode werden die Proteine unter nicht-nativen (reduzierenden oder nicht-reduzierenden) Bedingungen entsprechend dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Sodiumdodecylsulfat (SDS), das im Auftragspuffer enthalten ist, lagert sich im Verhältnis 1:1,4 (SDS:Aminosäure) an die denaturiert vorliegenden Proteine an. Daraus resultiert eine proportional zur Aminosäurenkettenlänge, negative Überschussladung, die die Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern lässt. Die Proteine können durch anschließende Färbung sichtbar gemacht werden (Cooper, 1981).

In dieser Arbeit wurden SDS-Polyacrylamidgele (10 x 8 x 0,75 cm³) mit Trenn- (15 %ig) und Sammelgel (5 %ig) benutzt (modifizierte Methode nach Fling & Gregerson, 1986). Pro Gel wurde zur Auftrennung ein elektrisches Feld konstanter Stromstärke (25 mA) angelegt (Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,8).

Für die Herstellung der Gele und die anschließende Elektrophorese wurden folgende Lösungen verwendet:

Sammelgel:	0,625 ml 40 % Acrylamid
	2,5 ml 2x Sammelgelpuffer
	1,875 ml H ₂ O

Trenngel: 3,75 ml 40 % Acrylamid
2,5 ml 4x Trenngelpuffer
3,75 ml H₂O

Die angegebenen Mengen reichen für zwei Midget-Gele (6 x 9 cm).

2x Sammelgelpuffer: 0,25 M Tris/HCl
0,4 % (w/v) SDS
pH 6,8 mit HCl eingestellt.

4x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl
0,8 % (w/v) SDS
pH 8,8 mit HCl eingestellt.

APS-Lösung: 10 % (w/v) APS in H₂O

TEMED-Lösung: 98 % (w/v) TEMED in H₂O

Desweiteren wurden 10-20%ige Tricin-Gradientengele der Firma NOVEX verwendet. Der Lauf- sowie der Auftragspuffer hatten folgende Zusammensetzung:

Tricingel-Laufpuffer: 0,1 M Tris/HCl
0,1 M Tricin
0,1 % (w/v) SDS
pH 8,3 mit HCl eingestellt.

Tricingel-Auftragspuffer: 0,45 M Tris/HCl
12% (v/v) Glycerin
4 % (w/v) SDS
0,0025 % (w/v) Coomassie Blau R250

Die Proteinproben wurden mit 5x Lämmli- bzw. Tricingel-Auftragspuffer versetzt. Wenn vorhandene Disulfidbrücken reduziert werden sollten, enthielt der Puffer mindestens 5 % β -Mercaptoethanol. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben vor dem Auftragen 5 min bei 95 °C inkubiert (Lämmli, 1970).

2.4.6. Protein-Färbemethoden

2.4.6.1. Silberfärbung

Die Silberfärbung ist vor allem zum Nachweis von sehr geringen Proteinmengen bis zu 10 ng geeignet. Die Vorschrift hierzu stammt von Heukeshofen & Dernick (1988).

Färbelösungen:

Fixierer I:	30 % (v/v) techn. Ethanol 10 % (v/v) techn. Eisessig	
Fixierer II:	25 % (v/v) Glutaraldehyd Natriumdithiosulfat 0,4 M Natriumacetat 30 % (v/v) techn. Ethanol 0,5 % (v/v) techn. Eisessig	2 ml 0,1 g ad 100 ml
Färbelösung:	1,2 M Silbernitratlösung (37 % (w/v)) Formaldehyd H ₂ O bidest.	0,5 ml 25 µl ad 100 ml
Entwickler:	Natriumcarbonat (37 % (w/v)) Formaldehyd H ₂ O bidest.	5 g 80 µl ad 200 ml
Stopplösung:	50 mM EDTA pH 7,5	

Färbeprotokoll:

Lösung	Zeit [min]
Fixierer I	10
Fixierer II	30
H ₂ O	3 x 5
Färbelösung	45
Entwickler	max. 1
Stop-Lösung	-

2.4.6.2. Färbung nach Fairbanks (Fairbanks et al., 1971)

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 30 bis 50 ng Protein. Die Färbung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgt in Lösung A, anschließend wird mit den Lösungen B bis D entfärbt. Die Verweilzeiten der Gele in den einzelnen Lösungen können durch kurzes Aufkochen auf etwa 10 min verkürzt werden.

Verwendete Lösungen:

Lösung A:	20 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) techn. Eisessig 0,05 % (w/v) Coomassie Blau R250
Lösung B:	10 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) techn. Eisessig 0,005 % (w/v) Coomassie Blau R250
Lösung C:	10 % (v/v) techn. Eisessig 0,002 % (w/v) Coomassie Blau R250
Lösung D:	10 % (v/v) techn. Eisessig

2.4.7. Densitometrie

Zur Quantifizierung von Proteinbanden, die mit Hilfe der Fairbanks-Färbung (2.4.6.2.) sichtbar gemacht wurden, wurde ein Sharp JX-330 Scanner eingesetzt. Die Auswertung der digitalisierten Banden erfolgte mit Hilfe der ImageMaster 1D Prime Software von Amersham Pharmacia Biotech.

2.5. Spektroskopische Methoden

2.5.1. Absorptionsspektroskopie

Proteine absorbieren Licht im UV-Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Als Chromophore wirken neben den Peptidbindungen und den prosthetischen Gruppen die Seitenketten der Aminosäuren. Während im Wellenlängenbereich von 180 bis 240 nm die

Carbonylgruppen der Peptidbindungen für die Absorption verantwortlich sind, liegt der Absorptionsbereich der drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin zwischen 230 und 300 nm. Der Absorptionsanteil ist dabei unterschiedlich groß, da sich die drei Aminosäuren sowohl hinsichtlich ihres molaren Extinktionskoeffizienten als auch in Bezug auf die Wellenlänge ihrer maximalen Absorption unterscheiden.

Aminosäure	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
Tryptophan	280	5700
Tyrosin	274	1400
Phenylalanin	257	200
Cystin	250	300

Tab. 2.5.1.: Absorptionseigenschaften von Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Cystin in Wasser bei pH 7 (Cantor & Schimmel, 1980).

Der Beitrag von Tryptophan und Tyrosin zum Proteinspektrum ist folglich am größten. Nichtsdestotrotz wird die Intensität und Form eines Spektrums von der Anzahl aller drei aromatischen Aminosäuren bestimmt (Schmid, 1989). Die spektralen Absorptionseigenschaften der aromatischen Aminosäuren hängen von der Polarität des umgebenden Mediums ab. So sieht man Signalverbreiterungen, Wellenlängenverschiebungen und Intensitätsveränderungen bei Änderung der Umgebungspolarität. Bei zunehmender Polarität der Umgebung findet eine hypsochrome Verschiebung (Blauverschiebung) des Absorptionsmaximums statt. Die UV/VIS-Spektroskopie kann deshalb auch Aufschluß über Konformation bzw. Konformationsänderungen und Lösungsmittelzugänglichkeit der aromatischen Aminosäuren geben (Schmid, 1989).

Für Konzentrationsberechnungen ist die Ermittlung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1\%, 1 \text{ cm}}$ des Proteins nötig. Dieser wird nach der modifizierten Methode von Wetlaufer

(1962) aus den molaren Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein multipliziert mit deren Anzahl im jeweiligen Protein bestimmt.

$$\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1\%, 1 \text{ cm}} = \frac{a \cdot \epsilon_{M, \text{Trp}} + b \cdot \epsilon_{M, \text{Tyr}} + c \cdot \epsilon_{M, \text{Cys}}}{\text{MW}}$$

Gl. 2.5.1.: Ermittlung des Extinktionskoeffizienten.

$\epsilon_{M, \text{Trp}}$	molarer Extinktionskoeffizient von Tryptophan ($5600 \text{ cm}^{-1} \text{ l}^{-1}$)
$\epsilon_{M, \text{Tyr}}$	molarer Extinktionskoeffizient von Tyrosin ($1400 \text{ cm}^{-1} \text{ l}^{-1}$)
$\epsilon_{M, \text{Cys}}$	molarer Extinktionskoeffizient von Cystein ($150 \text{ cm}^{-1} \text{ l}^{-1}$)
a, b, c	Anzahl der entsprechenden Aminosäuren
MW	Molekulargewicht des Proteins [g mol^{-1}]

Lambert und Beer stellten ein Gesetz auf, das eine Beziehung zwischen der Absorption von UV-Licht bei 280 nm und der Konzentration der absorbierenden Lösung herstellt.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d = \epsilon \cdot c_M \cdot d \cdot M^{-1}$$

Gl. 2.5.2.: Lambert Beer'sches Gesetz.

E	Extinktion/Absorption bei 280 nm
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ [$\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
c	Konzentration des Proteins [M]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
M	Molekulargewicht [g mol^{-1}]
c_M	Proteinkonzentration [g l^{-1}]
$\epsilon \cdot M^{-1}$	$\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1\%, 1 \text{ cm}}$

Neben der Konzentrationsbestimmung wurde die UV/VIS-Spektroskopie zum anderen zur Abschätzung der Verunreinigung der Proteinprobe durch Nukleotide (Absorption bei 260 nm) sowie zum Nachweis von Aggregaten eingesetzt, die aufgrund ihrer Größe das Licht oberhalb von 300 nm streuen und so eine Grundliniendrift hervorrufen.

2.5.2. Fluoreszenzspektroskopie

Die drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind aufgrund ihres delokalisierten π -Elektronensystems für die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins verantwortlich. Das Verhältnis der relativen Empfindlichkeiten für die Fluoreszenzanregung von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin ist 1100:200:8 (Schmid, 1989). Tryptophan zeigt von den oben genannten Aminosäuren die größte Fluoreszenz, da es Photonen am stärksten absorbiert und darüber hinaus durch Energieübertragung von Tyrosin angeregt werden kann (Schmid, 1989; Cantor & Schimmel, 1980).

Die Intensität des Fluoreszenzsignals und die Lage des Emissionsmaximums von Tryptophan wird stark von dessen molekularer Umgebung beeinflusst. Das Emissionsmaximum liegt im hydrophoben Inneren von nativen Proteinen bei 333 nm, während es in einer polaren Lösungsumgebung nach 354 nm hin verschoben ist. Darüber hinaus nimmt die Intensität des Signals ab. Bei Tyrosin ist nur eine geringe Verschiebung des Emissionsmaximums von 303 nm, aber eine starke Intensitätsabnahme zu beobachten (Schmid, 1989). Die Auswertung von Fluoreszenzspektren von Proteinen erlaubt somit Rückschlüsse auf deren Tertiärstruktur. Da die Fluoreszenzintensität von der Temperatur abhängt, werden Fluoreszenzmessungen bei konstanter Temperatur durchgeführt.

2.5.2.1. Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Spektren der verschiedenen Antikörperfragmente wurden nach der Anregung der Fluoreszenz bei 280 nm in einem Wellenlängenbereich von 290 bis 400 nm aufgenommen. Die Breiten des Anregungs- und des Emissionsspaltens wurden entsprechend der Proteinkonzentration eingestellt, um im für das Gerät optimalen Intensitätsbereich zu messen. Bei allen Spektren erfolgte eine Pufferkorrektur.

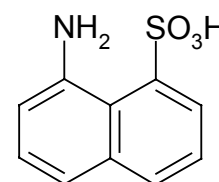
2.5.2.2. *Fluoreszenzkinetiken*

Im Falle von Denaturierungskinetiken wurde das native Protein aus einer konzentrierten Stammlösung in einen Ansatz mit einer bestimmten Denaturierungsmittelkonzentration verdünnt. Als Anregungswellenlänge wurde entweder 280 nm oder 295 nm, zur selektiven Anregung der Tryptophane, gewählt. Das Fluoreszenzsignal wurde anschließend bei einer Emissionswellenlänge von 355 nm verfolgt. Die Spalten wurden entsprechend der Proteinkonzentration eingestellt.

Für Renaturierungskinetiken wurde das Protein für bestimmte Zeit in Denaturierungspuffer entfaltet und danach in Renaturierungspuffer verdünnt. Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie die Spaltbreiten wurden wie bei den Denaturierungskinetiken gewählt.

2.5.3. **ANS-Fluoreszenzspektroskopie**

8-Anilino-1-Naphthalensulfonsäure (ANS) ist ein Reagenz, welches an exponierte, hydrophobe Bereiche von Proteinen binden kann. Aufgrund dieser Bindung verstärkt sich die Fluoreszenz von ANS (Stryer, 1965; Goldberg *et al.*, 1990; Ptitsyn *et al.*, 1990; Semistonov *et al.*, 1991).



Es wurde eine Lösung von 10 mg/ml ANS in Wasser hergestellt. Zum Protein wurde ANS in einem 10-fachen molaren Überschuss gegeben und anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ANS-Fluoreszenz wurde bei 390 nm angeregt und Spektren zwischen 400 nm und 600 nm aufgenommen.

2.5.4. **Circulardichroismus (CD)**

Unter Circulardichroismus wird die Eigenschaft optisch aktiver Moleküle verstanden, Licht, das circular polarisiert ist, unterschiedlich stark zu absorbieren. Die Voraussetzung für die optische Aktivität ist die Chiralität der Moleküle. Die Grundlage hierfür bilden unter

anderem asymmetrische Kohlenstoffatome und/oder aromatische Seitenketten in asymmetrischer Umgebung. Alle Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin sind chiral. Proteine, die eine zur dichroitischen Absorption beitragenden Sekundärstruktur aufweisen, verursachen Circular dichroismus. Je nach Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes unterscheidet man zwischen Nah-UV-CD und Fern-UV-CD.

Als quantitatives Maß für die Ausprägung einer Struktur wird die Elliptizität Θ (in Grad) herangezogen. Für die Berechnung der molaren Elliptizität, bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure, fand folgende Formel Anwendung (Schmid, 1989):

$$\Theta_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A}$$

Gl. 2.5.3.: Berechnung der molaren Elliptizität.

Θ_{MRW} :	Molare Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure [deg cm ² d mol ⁻¹]
Θ :	gemessene Elliptizität [deg]
M_r :	Molekulargewicht
c :	Proteinkonzentration [mg ml ⁻¹]
d :	Schichtdicke [cm]
N_A :	Anzahl der Aminosäuren im Protein

2.5.4.1. Nah-UV-CD

Der Nah-UV-Bereich erstreckt sich von 250 bis 350 nm. Die hier absorbierenden aromatischen Aminosäuren, deren Seitenketten in eine durch die Tertiärstruktur des Proteins verantwortete asymmetrische Umgebung ragen, sind für das CD-Signal verantwortlich. Somit lässt sich anhand von Messungen in diesem Bereich ein „Fingerabdruck“ eines Proteins erstellen. Bei denaturierten Proteinen fehlt dieses Signal, da die asymmetrische Umgebung der aromatischen Seitenketten nicht mehr vorhanden ist.

2.5.4.2. Fern-UV-CD

Der Fern-UV-CD-Bereich wird auch als Amid-Region (170-250 nm) bezeichnet (Cantor & Schimmel, 1980). Hier erzeugt die Konformation der Polypeptidkette ein charakteristisches CD-Signal. α -Helices erzeugen zwei benachbarte Minima hoher Intensität bei 208 und 222 nm, wohingegen β -Faltblätter ein einziges Minimum geringer Intensität bei 218 nm aufweisen. Folglich erhält man aus einem Fern-UV-CD-Spektrum Aufschluss über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins.

CD-Spektren wurden in den entsprechenden Wellenlängenbereichen (Nah-UV-CD: 250 – 350 nm; Fern-UV-CD: 200 – 250 nm) aufgezeichnet. Um Signalschwankungen auszugleichen, wurden die Spektren bis zu 12-mal akkumuliert. Da das Nah-UV-CD-Signal um einiges geringer ausfällt als das Fern-UV-CD-Signal, sind für diese Messungen höhere Proteinkonzentrationen nötig. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert.

Denaturierungs- und Renaturierungskinetiken wurden bei einer festen Wellenlänge – meist 213 oder 220 nm – aufgezeichnet. Die Detektion von sehr schnellen Faltungsphasen erfolgte mit Hilfe einer sogenannten *stopped flow*-Apparatur.

2.5.5. Dynamische Lichtstreuung

Alle Experimente wurden bei 20 °C und einem Streuwinkel von 90 ° durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 12 μ l. Puffer und Proteinproben wurden vor der Messung mit Hilfe eines Filters mit 100 nm Porengröße (Anodisc-13, Whatman) von Staub und Luftblasen befreit. Der Diffusionskoeffizient D und der hydrodynamische Radius wurden mit der Autokorrelationsfunktion des Programms Dynamics (Protein Solutions) berechnet. Dazu erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten die Messung der Streuungsintensität I_s .

2.5.6. Refraktometrie

Die genaue Denaturierungsmittelkonzentration (hier: Guanidiniumhydrochlorid, kurz GdmCl) in De- und Renaturierungsansätzen wurde über den Brechungsindex der Lösung bestimmt. Die im Refraktometer ermittelten Werte werden in folgende Gleichung eingesetzt:

$$[\text{GdmCl}] = 57,147 \cdot (\Delta n) + 38,68 \cdot (\Delta n)^2 - 91,6 \cdot (\Delta n)^3$$

Gl. 2.5.4.: Berechnung des Brechungsindex.

Δn : Differenz der Brechungsindices der Lösungen mit und ohne GdmCl

2.6. High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Bei der *high pressure liquid chromatography* kann die Trennung von Komponenten auf Adsorption, Ionenaustausch, Größenausschluss oder Verteilung beruhen. Im Vergleich zu den entsprechenden Einzelmethoden wird bei der *HPLC* die Trennleistung durch Verwendung hochauflösender Methoden deutlich verbessert und die Retentionszeiten stark gesenkt. Die mobile Phase wird mit Drücken bis zu 400 bar durch die dicht gepackte Säule gepresst, was zu kürzeren Analysenzeiten führt.

In dieser Arbeit wurde diese Methode zum einen zur Molekulargewichtsbestimmung (Analytische Gelfiltration), zum anderen zur Entsalzung von Proben für die Massenspektrometrie (*reversed phase*-Chromatographie) verwendet.

Zur Entsalzung von Proteinproben mittels *reversed phase*-Chromatographie kam ein Elutionssystem bestehend aus 0,1 % TFA in Wasser (Puffer A) und 0,07 % TFA in 95 % Acetonitril / 5 % Wasser (Puffer B) zum Einsatz. Die Entsalzung erfolgte mit Hilfe eines linearen Gradienten von Puffer B von 20 % bis 95 % in 5 min bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Elution des Proteins wurde anhand der Absorption bei 220 nm verfolgt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zur weiteren Analyse aufgefangen.

2.7. Massenspektrometrie

Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik zur genauen Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ist die Aminosäuresequenz eines Proteins bekannt, so kann aus der Differenz der theoretischen und der im Massenspektrometer ermittelten Masse direkt auf posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen, Phosphorylierungen und Sulfatierungen, aber auch auf chemische Veränderungen durch Acylierungen und Oxidation geschlossen werden. Durch Behandlung mit Proteasen und anschließende massenspektrometrische Analyse ist es ohne weiteres möglich, die Sequenz eines Proteins zu bestimmen. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Massenspektrometrie bis hinunter in den Femtomol-Bereich ist diese Technik sensitiver als beispielsweise die optische Detektion in der klassischen Edman-Sequenzierung.

Die Massenspektrometrie wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die Ausbildung der Disulfidbrücke der C_{H3}-Domäne unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurden durch die kovalente Modifizierung der freien Cysteine mit Glutathion und/oder IAA (siehe 2.4.3.) Proteine erzeugt, die sich hinsichtlich ihrer Masse unterscheiden und somit einer massenspektrometrischen Analyse zugänglich sind.

Für ESIMS-Analysen wurden den zuvor entsalzten Proben (siehe 2.6.) 5 % Ameisensäure zugesetzt. Das Einspritzen der Proteinlösung in die Ionenquelle geschah mit einer Geschwindigkeit von 5 µl/min. Die Spektren wurden mit einer Rate von 10 s/scan aufgenommen. Kalibriert wurde das Gerät durch das Einspritzen von Myoglobin aus Pferd. Dabei wurde aus den detektierten Massen der mehrfachgeladenen Ionen der Mittelwert gebildet ($M_r = 16\,951,5$).

MALDIMS-Analysen erforderten, dass die Probe in 0,2 % TFA gelöst eine Konzentration von 10 pmol/µl hatte. Ein 1 µl-Aliquot wurde mit 1 µl 3-(α -Cyano-4-Hydroxyphenyl)-

propensäure (10 mg/ml in Acetonitril/0,1 % TFA 1:2 (v:v)) gemischt. Nach Lufttrocknung wurden die Spektren jeweils durch 50-fachen Laserbeschuss generiert. Die Massenkalisierung erfolgte mit Hilfe von Insulin (durchschnittliches Molekulargewicht 5734,6) und des Maxtrixsignals ($M_r = 379,1$).

2.8. Mathematische Methoden

2.8.1. Auswertung konformationeller Übergänge

GdmCl-Übergänge wurden mit Hilfe des Programms SigmaPlot 5 durch nicht-lineare Regression der Datenpunkte ausgewertet (Santoro & Bolen, 1988).

$$y([D]) = y_N^0 + m_N \cdot [D] - \frac{y_N^0 + m_N \cdot [D] - y_U^0 - m_U \cdot [D]}{1 + \exp\left\{-\frac{\Delta G_{\text{stab}}^0 + m \cdot [D]}{R \cdot T}\right\}}$$

Gl. 2.8.1.: **Auswertung GdmCl-induzierter Übergänge.** m ist der Kooperativitätsparameter und ein Maß für die Steilheit des Übergangs. Die Stabilität des Proteins bei Abwesenheit des Denaturierungsmittels wird mit ΔG_{stab}^0 bezeichnet. $[D]$ steht für die Konzentration des Denaturierungsmittels. y_N und y_U sind die spektroskopischen Eigenschaften des nativen und denaturierten Proteins in Abhängigkeit von $[D]$, y_N^0 und y_U^0 die dazugehörigen Werte bei $[D] = 0$. Die Steigungen in diesen Bereichen werden mit m_N bzw. m_U bezeichnet.

Die Auswertung von Temperaturübergängen erfolgte mit einer angepassten Gleichung, bei der y_N und y_U linear von der Temperatur abhängen. ΔG_{stab}^0 ist ebenfalls eine lineare Funktion der Temperatur.

$$y(T) = y_N^0 + m_N \cdot T - \frac{y_N^0 + m_N \cdot T - y_U^0 - m_U \cdot T}{1 + \exp\left\{-\frac{\Delta G_{\text{stab}}^0(T)}{R \cdot T}\right\}}$$

$$\Delta G_{\text{stab}}(T) = \Delta H_m \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \cdot \left(T_m - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right)$$

Gl. 2.8.2.: **Auswertung von Temperaturübergängen.** T steht für die Temperatur in Kelvin. T_m ist die Schmelztemperatur des Proteins (= Mittelpunkt des Übergangs). y_N^0 und y_U^0 sind die auf $T = 0$ extrapolierten Werte von y_N und y_U . ΔH_m bezeichnet die van't Hoff-Enthalpie bei T_m , ΔC_p die mit der Entfaltung verbundene Änderung der Wärmekapazität.

2.8.2. Entfaltung/Faltung

Entfaltungs- und Faltungskinetiken wurden je nach Anzahl der Phasen mit Hilfe von Exponentialfunktionen gefittet. Daraus konnten die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen kinetischen Phasen gewonnen werden. Mit den Gleichungen 2.8.3.; 2.8.4. und 2.8.5. werden exponentiell abfallende Kinetiken ausgewertet. Für exponentiell steigende Kinetiken müssen die Phasen entsprechend umgedreht werden.

$$y(t) = y(t_0) + a \cdot e^{(-b \cdot t)}$$

Gl. 2.8.3.: **Mono-exponentieller Fit.** Legende siehe 2.8.6..

$$y(t) = y(t_0) + a \cdot e^{(-b \cdot t)} + c \cdot e^{(-d \cdot t)}$$

Gl. 2.8.4.: **Bi-exponentieller Fit.** Legende siehe 2.8.6..

$$y(t) = y(t_0) + a \cdot e^{(-b \cdot t)} + c \cdot e^{(-d \cdot t)} + g \cdot e^{(-h \cdot t)}$$

Gl. 2.8.5.: **Tri-exponentieller Fit.** Legende siehe 2.8.6..

$$y(t) = \frac{(e^{-k_1 \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t})}{\left(\frac{k_2}{k_1 - 1} \right)} \cdot D$$

Gl. 2.8.6.: Intermediats-Fit. t ist die Zeit. a , c , g sind die Amplituden der einzelnen Phasen. Mit b , d , h , k_1 und k_2 werden die Geschwindigkeitskonstanten bezeichnet. D steht für die spezifische Fluoreszenz des denaturierten Proteins.

3. Ergebnisse

3.1. Physikalisch-chemische Eigenschaften der MAK33-Antikörperdomänen C_{H2} und C_{H3}

3.1.1. Analyse der Primärstruktur: C_{H2} und C_{H3} im Vergleich

Antikörper setzen sich aus zahlreichen Domänen zusammen, die alle dasselbe Faltungsmotiv, den *immunoglobulin fold*, aufweisen. Trotzdem verhalten sie sich recht unterschiedlich bezüglich Stabilität und Faltung. Um diesen Unterschieden auf den Grund zu gehen, bot sich zuerst die Analyse der Aminosäuresequenz der beiden Proteine, ihrer Primärstruktur an. In Abbildung 3.1.1. sind die Sequenzen der C_{H2}- und der C_{H3}-Domäne des monoklonalen Antikörpers MAK33 einander gegenübergestellt.

C_{H2}	1	-----SS <u>VF</u>	IF <u>PP</u> KPKD <u>VL</u>	TIT <u>LTPKVTC</u>	<u>VVVDIS</u>
C_{H3}	1	KGRPAAPQ <u>VY</u>	TI <u>PP</u> PKEQ <u>MA</u>	KDK <u>VS</u> -- <u>LTC</u>	<u>MITDFF</u>
C_{H2}	31	K <u>DD</u> PE <u>VQFSW</u>	FVDDV <u>EVHTA</u>	<u>QTQP</u> PRE <u>EQFN</u>	<u>STFRSVSELP</u>
C_{H3}	35	<u>PE</u> D <u>ITVEWQW</u>	NGQPA <u>ENYKN</u>	-- <u>TQP</u> IM <u>DTDG</u>	<u>SYF</u> -VY <u>SKLN</u>
C_{H2}	71	<u>IMH</u> QD <u>WLN</u> <u>GK</u>	E <u>FK</u> <u>CRV</u> NSAA	FP-API <u>EKTI</u>	-----
C_{H3}	73	<u>VQ</u> KS <u>NWEAGN</u>	T <u>FT</u> <u>CSV</u> LHEG	LH <u>NHHT</u> <u>EKSL</u>	SHSPGK

Abb. 3.1.1.: Sequenzvergleich zwischen der C_{H2}-Domäne und der C_{H3}-Domäne des monoklonalen Antikörpers MAK33. Die Aminosäuren, die einander ähnlich sind, sind fett, die, die identisch sind, zusätzlich unterstrichen dargestellt.

Die C_{H2}- und die C_{H3}-Domäne sind annähernd gleich große Moleküle (Tab. 3.1.1.). Während die Sequenz von C_{H2} der Faltungseinheit im Antikörper MAK33 entspricht, weist diejenige von C_{H3} zusätzliche Aminosäuren aus der Ellenbogen-Region zwischen C_{H2} und

C_{H3} auf. Da C_{H3} sonst mit einem Prolin beginnen würde, sollten durch die Klonierung dieser eventuelle Komplikationen für die Faltung ausgeschlossen werden (Mayer, 1993).

Die beiden konstanten Domänen sind evolutionär eng verwandte Proteine, die durch Genduplikation entstanden sind (Davies & Metzger, 1983). Trotzdem ist der Anteil an ähnlichen Aminosäuren nicht besonders hoch (39,4 %). Sucht man nach den Aminosäuren, die in C_{H2} und C_{H3} an identischen Positionen liegen, erhält man einen Wert von 24,2 %. Auffallend ist, dass im Bereich um die beiden Cysteine der Disulfidbrücke in beiden Proteinen überwiegend ähnliche oder dieselben Aminosäuren vorkommen. Darüber hinaus sind die Positionen der meisten Chromophore konserviert. C_{H2} besitzt aber im Vergleich zu C_{H3} keine Tyrosine. Entweder sind an diesen Positionen keine aromatischen Reste vorhanden, oder sie sind gegen Phenylalanin ausgetauscht (Abb. 3.1.1.).

Das Erlangen der nativen Konfiguration von Peptidyl-Prolyl-Bindungen ist bei der Proteinfaltung oft ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt, da deren Isomerisierung eine hohe Aktivierungsenergie erfordert (Schmid, 1993). Die Aminosäuresequenzen von C_{H2} und C_{H3} sind reich an Prolinen (9,1 % bzw. 8,3 %). Am N-Terminus beider befindet sich eine Anhäufung von drei Prolinresten in unmittelbarer Nachbarschaft (Abb. 3.1.1.). Eine Analyse der Proteinsequenzen im Hinblick auf die den Prolinresten vorangehenden Aminosäuren lässt Rückschlüsse auf die Konfiguration der entsprechenden Xaa-Pro-Bindung im nativen Zustand des Proteins zu (Abb 3.1.2.). Dabei zeigt sich, dass die Wahrscheinlichkeit für eine *cis*-Konfiguration bei Prolinen und Phenylalaninen mit 9,3 % bzw. 7,2 % am größten ist (Reimer *et al.*, 1998). Berücksichtigt man Analysen bei Modellpeptiden, ergeben sich Werte von 6,0 % und 23,0 % (Reimer *et al.*, 1998). Dieses zeigt, dass lokale Wechselwirkungen im Protein einen großen Einfluss auf die *cis/trans*-Verteilung von Xaa-Pro-Bindungen haben. Bei C_{H2} sind mit ₆F-₇P und ₉₁F-₉₂P zwei Xaa-Pro-Bindungen mit großen Wahrscheinlichkeiten für die *cis*-Konfiguration zu finden. Allerdings liegen diese nahe des N- und des C-Terminus des

Proteins in relativ flexiblen Regionen. In der C_H3-Sequenz gibt es neben der am N-Terminus liegenden Prolinanhäufung nur den Prolinrest an Position 35, dem besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden muss. Wie später beschrieben wird, ist der Konfigurationswechsel der ₃₄F-₃₅P-Bindung der limitierende Faktor in der Faltung des Proteins. An der entsprechenden Position in der C_H2-Domäne befindet sich kein Prolin.

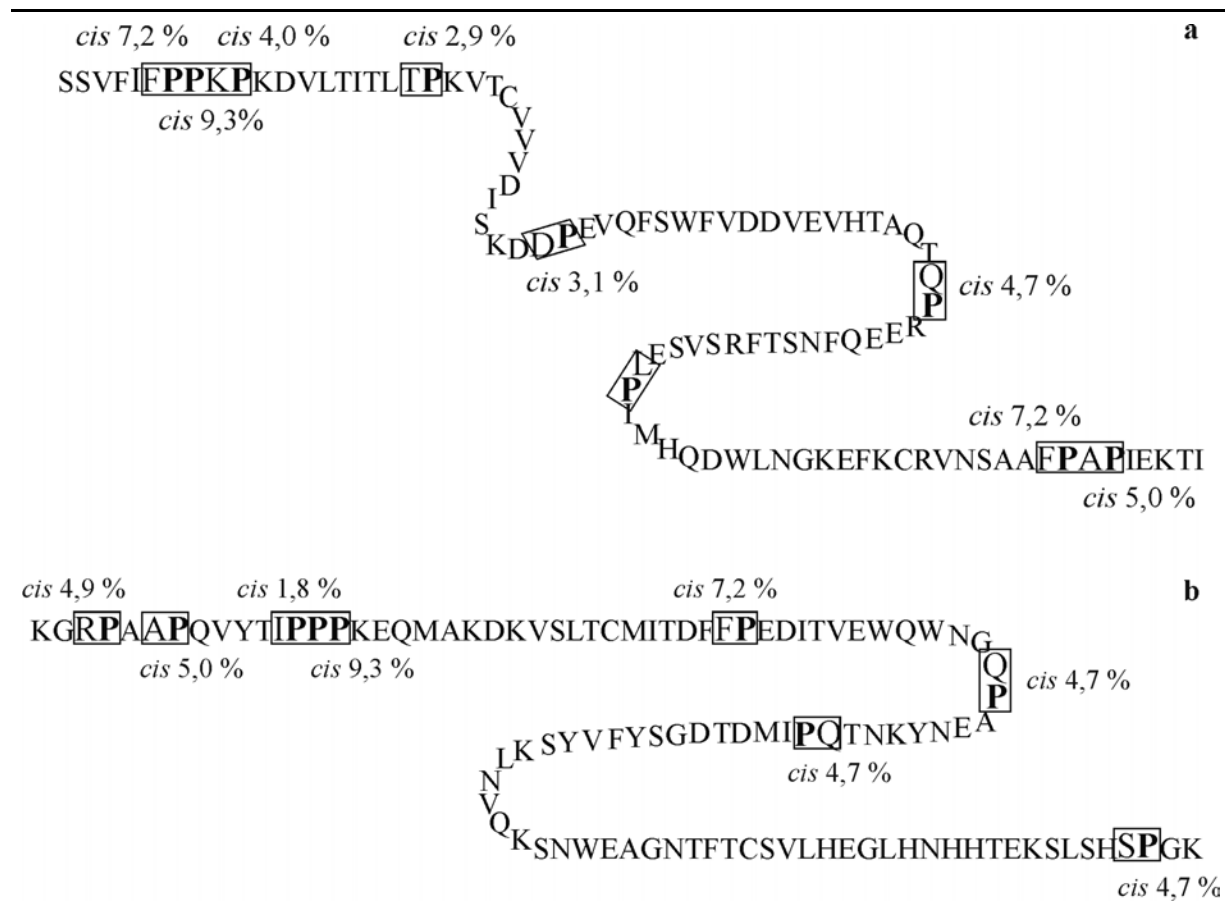


Abb. 3.1.2.: Xaa-Pro-Bindungen in den Antikörperdomänen C_H2 (a) und C_H3 (b). Die wichtigen Bereiche sind durch eine größere Schrift und eine Umrahmung hervorgehoben. Proline sind fett gedruckt und die Wahrscheinlichkeit, dass die entsprechende Bindung in der *cis*-Konfiguration vorkommt, in Prozent angegeben (Reimer *et al.*, 1998).

Die Sequenz von C_H2 enthält 2 Tryptophane und 8 Phenylalanine, aber keine Tyrosine. Dieses hat großen Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften des Proteins. Das UV/VIS-Spektrum weist bei 257 nm – dem Absorptionsmaximum von Phenylalanin (Schmid, 1989) – und nachfolgend eine hohe Absorption im Vergleich zu der bei 280 nm auf (Pirkel,

1996; Thies, 1997). Darüber hinaus ruft die im Verhältnis zur Gesamtanzahl der Reste von C_{H2} große Anzahl von Phenylalaninen im Fern-UV-CD-Spektrum ein Maximum bei 222 nm hervor, was für β -Faltblattproteine völlig untypisch ist (Pirkl, 1996; Thies, 1997). Diese besitzen bei 218 nm ein definiertes Minimum. Mit einer Gesamtzahl von 14 negativ geladenen (D und E) und 12 positiv geladenen Resten (R, K und H) ist das Protein insgesamt leicht negativ geladen und weist infolge dessen einen sauren isoelektrischen Punkt (pI) auf (Tab. 3.1.1.). Der Anteil an hydrophoben Aminosäuren (A, I, L, M, F, P, W, V) ist mit 45,5 % relativ groß. Demgegenüber besitzt C_{H3} 3 Tryptophane, 4 Tyrosine und 4 Phenylalanine. Dieses drückt sich in dem hohen Extinktionskoeffizienten des Proteins aus (Tab. 3.1.1.). Der große Anteil aromatischer Aminosäuren (10 %) bewirkt im Fern-UV-CD-Spektrum eine Verschiebung des für β -Faltblattproteine charakteristischen Minimums von 218 nm auf 222 nm (Mayer, 1993). Wie bei C_{H2} überwiegen leicht die sauren Aminosäuren gegenüber den basischen (11,1 % zu 9,3 %). Der pI-Wert liegt infolge des größeren Verhältnisses von negativ geladenen Resten zur Gesamtanzahl der Aminosäuren etwas höher als bei C_{H2} (Tab. 3.1.1.). Mit 40 % ist der Anteil hydrophober Aminosäuren etwas geringer als bei C_{H2}.

Mit Hilfe sogenannter Hydropathieplots lässt sich die Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Resten in einer Proteinsequenz genauer analysieren. In dieser Arbeit wurde die Methode nach Kyle & Doolittle gewählt, die den Aminosäuren entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften feste Werte in einem Bereich von -4,5 bis 4,5 zuweist (Kyle & Doolittle, 1982). Dabei ist Arginin mit -4,5 der hydrophilste, Isoleucin mit 4,5 der hydrophobste Rest. Der Vergleich der C_{H2}- und der C_{H3}-Domäne bestätigte für C_{H2} eine im ganzen leicht höhere Hydrophobie (siehe oben und Abb. 3.1.3.). Während zwischen Position 10 und 30 bei beiden Proteinen viele hydrophobe Aminosäuren vorkommen, ergeben sich nachfolgend nur wenige Gemeinsamkeiten. C_{H2} weist um Position 40 zusätzlich einen hydrophoben Bereich auf. Das sich anschließende Muster ist bei C_{H3} leicht nach links

verschoben. Dieses mag daran liegen, dass C_{H3} einige Deletionen in seiner Sequenz gegenüber C_{H2} aufweist (Abb. 3.1.1.).

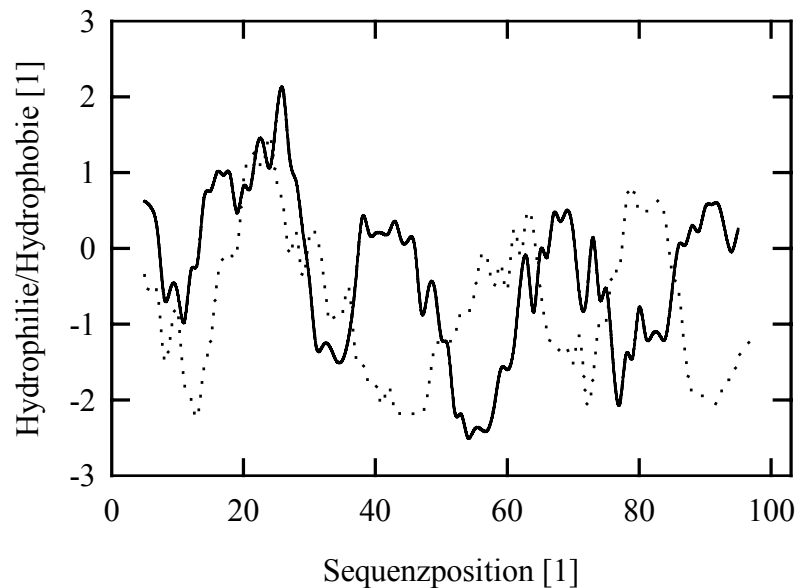


Abb. 3.1.3.: Hydropathie-Plot der C_{H2} (—) und der C_{H3}-Domäne (....). Es wurde mit Hilfe eines Rasters von 9 Aminosäuren die Hydrophilie (negative Werte) bzw. Hydrophobie (positive Werte) in diesem Bereich bestimmt. Als Minimum ergab sich ein Wert von -2,23, als Maximum 2,08 (Kyle & Doolittle, 1982).

Einige Eigenschaften, die sich aus der Aminosäuresequenz der beiden Proteine ergeben, sind in Tab. 3.1.1. aufgelistet.

	C_{H2}	C_{H3}	Fc
Anzahl der Aminosäuren	99	108 (Monomer)	210 (Monomer)
relative Molekülmasse	11279,7	12251,6 (Monomer)	23885,0 (Monomer)
Isoelektrischer Punkt	5,02	6,20	6,37
Extinktionskoeffizient	1,020 (red.)	1,831 (red.)	1,416 (red.)
(280 nm, 0,1 %, 1 cm)	1,009 (ox.)	1,811 (ox.)	1,405 (ox.)

Tab. 3.1.1.: Gegenüberstellung einiger Eigenschaften von C_{H2} und C_{H3}. Zum Vergleich sind die Daten des Fc-Fragmentes (C_{H2} + C_{H3}) aufgeführt. Der Extinktionskoeffizient ist für das jeweilige Protein mit und ohne intakter Disulfidbrücke angegeben.

Bedingt durch die unterschiedlichen Eigenschaften wie pI oder Hydrophobie waren verschiedene Ansätze für C_{H2} und C_{H3} notwendig, um in *E.coli* eine zufriedenstellende Expression zu erzielen und das gewonnene Protein anschließend bis zur Homogenität zu reinigen. Da die Antikörperdomänen C_{H2} und C_{H3} jeweils eine intramolekulare Disulfidbrücke enthalten (Amzel & Poljak, 1979), sind oxidierende Bedingungen die Voraussetzung dafür, dass natives Protein mit intakter Disulfidbrücke erhalten wird. Deshalb wurde für die C_{H3}-Domäne eine Expression mit anschließender Sekretion in das Periplasma von *E.coli* erprobt und etabliert. Ein oxidierendes Redoxpotential im Periplasma konnte durch Zugabe von oxidiertem Glutathion (GSSG) eingestellt werden. Die Reinigung danach war in guten Ausbeuten möglich (Mayer, 1993; Bell, 1997; Mayer, 1998).

Demgegenüber gestaltete sich die Gewinnung von C_{H2} auf analogem Wege schwierig. Aufgrund einer geringen Expression des Proteins (Pirkl, 1996; Thies, 1997) wurde entschieden, ein anderes Expressionssystem zu wählen. Durch den Wechsel zur cytoplasmatischen Expression konnte die Ausbeute um ein Vielfaches gesteigert werden. Allerdings lag das Protein in Form von unlöslichen *inclusion bodies* vor und musste deshalb oxidativ zurückgefaltet werden (Thies, 1997; Thies & Pirkl, 2000).

3.1.2. Sequenz und Struktur

Die Sequenzen der Immunoglobulin-Domänen C_{H2} und C_{H3} wurden dahingehend untersucht, wie groß die Tendenz einzelner Bereiche ist, β -Faltblattstrukturen auszubilden. Es wurde nach der Methode von Chou & Fasman (1978) verfahren, die jeder Aminosäure einen bestimmten Zahlenwert zuordnet, je nachdem, ob die Tendenz, Faltblattstrukturen auszubilden, kleiner oder größer ist. Für Glutamat ist die Wahrscheinlichkeit, in Faltblättern vorzukommen, am kleinsten (0,370), für Valin am größten (1,700). In Abb. 3.1.4. ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt. C_{H2} weist im ganzen vier Maxima / Faltblattbereiche auf,

während es bei C_{H3} sechs sind. Auffallend ist, dass die Maxima bei C_{H2} sehr zerklüftet sind. In diesen Bereichen kommen neben „Faltblattbildnern“ (z. B. Valin) auch solche Reste vor, die diesen Prozess eher behindern (Aspartat, Glutamat; siehe Abb. 3.1.1.). Somit dürften die Faltblattstränge sehr unregelmäßig geformt sein, da sie durch andere Strukturen unterbrochen werden. Im Fall von C_{H2} und C_{H3} stimmt die Anzahl der mit dieser Methode gefundenen Bereiche der Faltblattstränge mit der sonst gefundenen nicht überein (Amzel & Poljak, 1979). Da hierbei jedoch Tertiärkontakte und Quartärstruktur außer Acht gelassen werden, kann nur die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur endgültig Aufschluss über die Sekundärstruktur des Proteins geben.

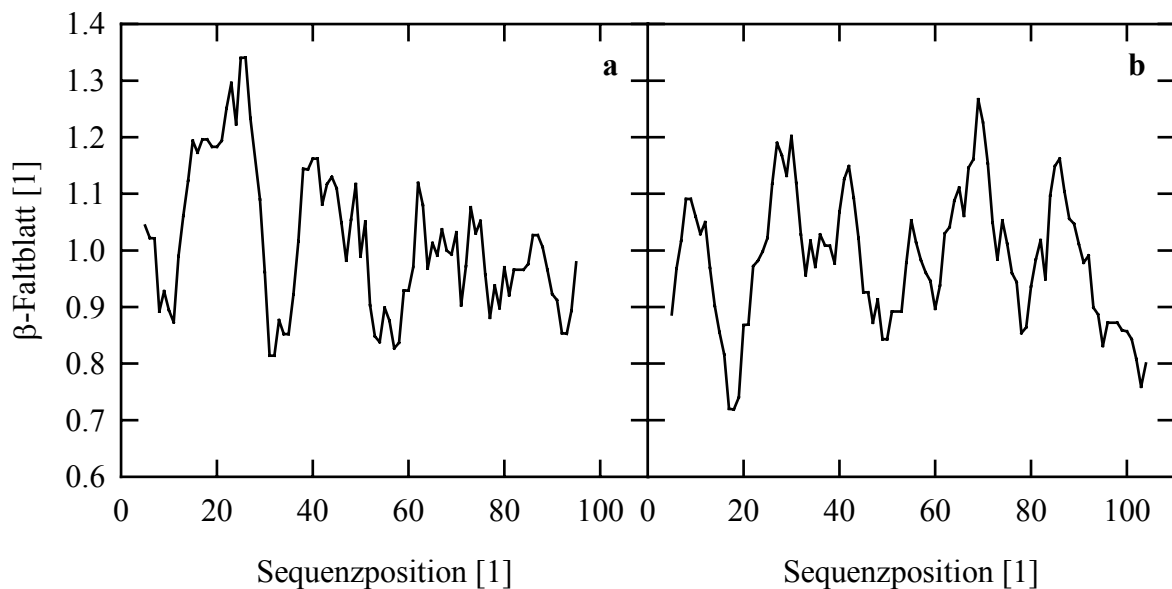


Abb. 3.1.4.: β -Faltblattbereiche in C_{H2} (a) und C_{H3} (b). Dargestellt ist die Tendenz einzelner Sequenzbereiche, β -Faltblattkonformation anzunehmen (bei Verwendung eines Rasters von 9 Aminosäuren). Nach Chou & Fasman (1978) hat Glutamat die geringste (0,370), Valin die größte Neigung (1,700), in Faltblattstrukturen vorzukommen.

3.1.2.1. Die dreidimensionale Struktur von C_{H3}

Die dreidimensionale Struktur des rekombinanten C_{H3}-Dimers wurde mit Hilfe von Röntgen-Kristallographie gelöst. Dabei wurde zur Strukturbestimmung die Methode des molekularen Ersatzes (*molecular replacement*) genutzt. Die gewonnenen Daten sowie Werte aus der Strukturverfeinerung (*refinement*) sind in Tab. 3.1.2. aufgeführt.

A. Streuungsdaten	
Raumgruppe	P21
Dimensionen der Einheitszelle in [Å]: (a, b, c)	48,74, 42,78, 50,46
B [°]	105,93
Auflösungsbereich [Å]	50,0 – 2,2
Einzelreflektionen	10 340
Redundanz	5,58
Completeness [%]	93,4 (83,6)
R_{merge} [%]^a	10,4 (27,3)
I/s	10,1 (3,2)
B. Strukturverfeinerung	
Anzahl der Atome im Protein	1622
Anzahl an Wassermolekülen	88
Auflösungsbereich [Å]	8,0 – 2,2
Einzelreflektionen	9338
Completeness [%]	92,5
R-Faktor [%]^b	20,5
Freier R-Faktor [%]^c	25,7
rmsd von idealen z-Werten: Bindungslängen [Å]^d	0,006
rmsd von idealen z-Werten: Bindungswinkel [°]^d	1,15
Temperatur-Faktor: alle Atome	32,25
Temperatur-Faktor: Hauptkettenatome	30,84
Temperatur-Faktor: Seitenkettenatome	38,07
Temperatur-Faktor: Wasser	43,30

Tab. 3.1.2.: Röntgenstreuungsdaten eines C_{H3}-Kristalls und Werte aus der Strukturverfeinerung. Die Werte in runden Klammern gehören zur höchsten erzielten Auflösung (2,20-2,26 Å). ^aR_{merge} = S | I - <I> | S <I>. ^bR-Faktor = S | F_o - F_c | / S | F_o |. ^cDer freie R-Faktor wird wie der R-Faktor berechnet aber nur für einen Test-Satz von 5 % der Reflektionsdaten, die nicht für die Strukturverfeinerung benutzt wurden. ^dRoot-mean-squared deviations (*rmsd*) wurden von idealen Werten berechnet (Thies *et al.*, 1999).

Das Protein kommt im Kristall als Dimer vor. Die Gesamtstruktur ist in Abb. 3.1.5. gezeigt. Das C_{H3}-Monomer besteht aus zwei β-Faltblättern, die aus vier (A, B, E, D) bzw.

drei Strängen (G, F, C) aufgebaut sind. Die beiden Faltblätter sind durch eine senkrecht dazu stehende Disulfidbrücke miteinander verbunden. Sie wird von den Resten Cys28 im Strang B und Cys86 in Strang F gebildet und ist wie bei anderen Immunoglobulin-Molekülen im hydrophoben Inneren des Proteins verborgen. Um die Disulfidbrücke herum sind zahlreiche hydrophobe Aminosäuren angeordnet (Val9, Ile30, Val40, Trp42, Val88). Der Tryptophanrest 42 liegt innerhalb des van der Waals-Kontakt-Abstandes ($< 4,5 \text{ \AA}$) zur Disulfidbrücke (Abb. 3.1.5. und 3.1.6.). Dadurch wird dessen Fluoreszenz unter nativen Bedingungen unterdrückt. Bei Vergrößerung des Abstandes zwischen Trp42 und der Disulfidbrücke z. B. durch Entfaltung des Proteins wird dieser Effekt aufgehoben (siehe unten).

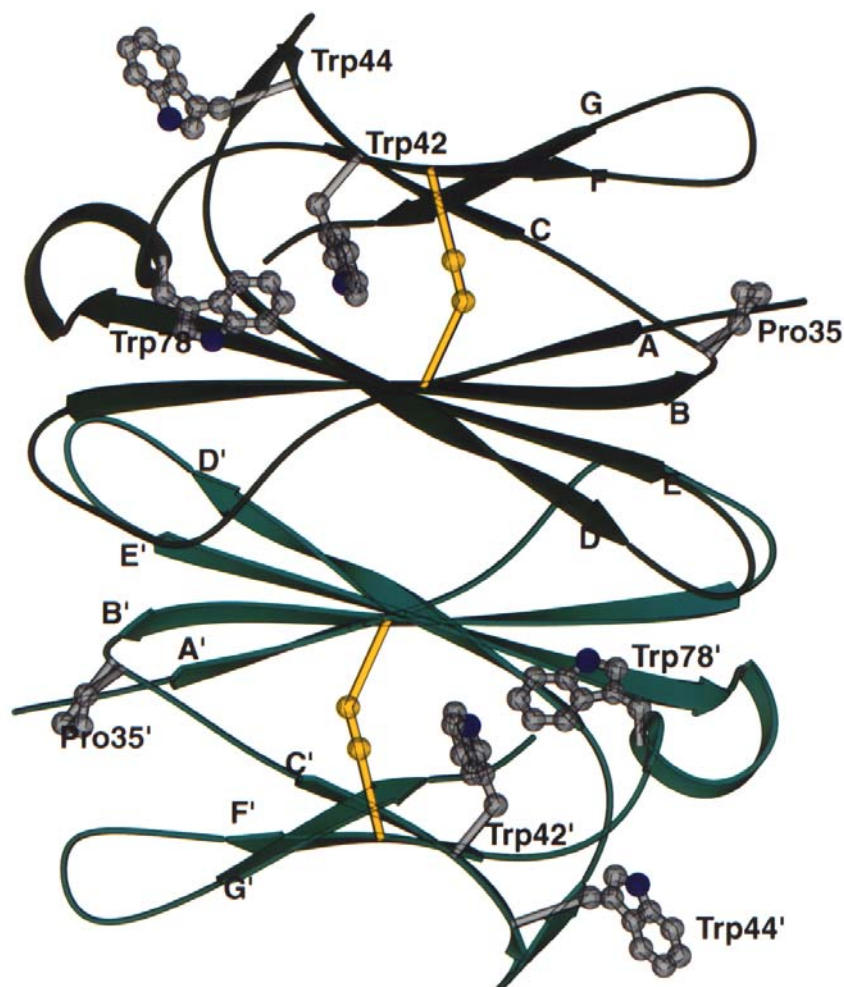


Abb. 3.1.5.: Kristallstruktur der rekombinanten C_H3 -Domäne. Die Tryptophane sowie der *cis*-Prolinrest sind in der *ball and stick*-Darstellung gezeigt. Die Disulfidbrücke zwischen den β -Faltblättern ist gelb eingefärbt. Die Auflösung beträgt $2,2 \text{ \AA}$.

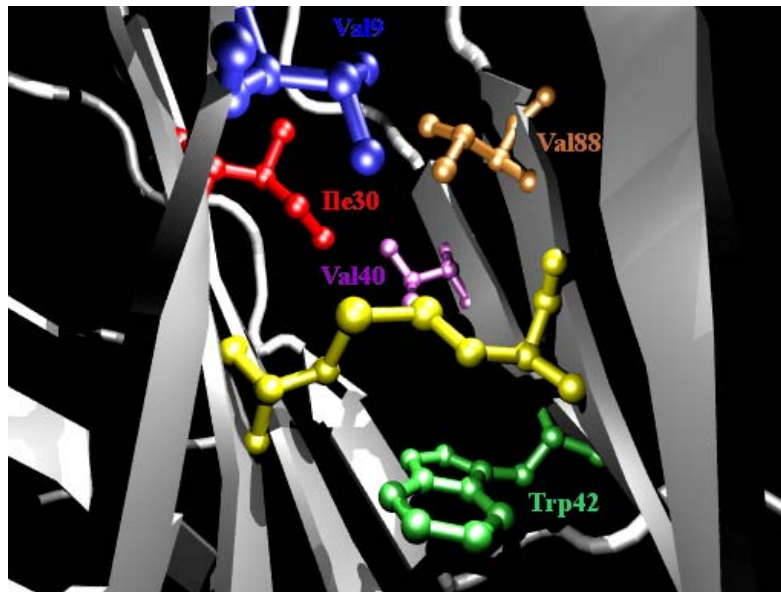


Abb. 3.1.6.: Die molekulare Umgebung der Disulfidbrücke in C_H3 . Die die beiden β -Faltblätter verbindende Schwefelbrücke (gelb) ist umgeben von zahlreichen hydrophoben Resten, deren Abstand zur Disulfidbrücke weniger als 4,5 Å beträgt. Dadurch wird unter anderem die Fluoreszenz von Trp42 (grün) unterdrückt.

Die meisten Proteine der Immunoglobulin-Superfamilie zeichnen sich dadurch aus, dass sie wenigstens einen *cis*-Prolinrest im nativen Zustand besitzen (Deisenhofer, 1981). Wie schon oben erwähnt, ist die Isomerisierung von der *trans*- zur *cis*-Konfiguration einer Xaa-Pro-Bindung oft ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Proteinfaltung (Isenman *et al.*, 1979; Schmid, 1993). In der dreidimensionalen Struktur von C_H3 nimmt das Prolin an Position 35 die *cis*-Konfiguration an (Abb. 3.1.5. und 3.1.7.). Es befindet sich in einem, von außen her gut zugänglichen *loop*, der die Stränge B und C verbindet. Zwei große hydrophobe Reste im Abstand von 3,2 Å (Phe34 und His90) sowie die Seitenkette von Glu91 bilden eine Barriere, die eine Isomerisierung in *trans* verhindert (Abb. 3.1.7.).

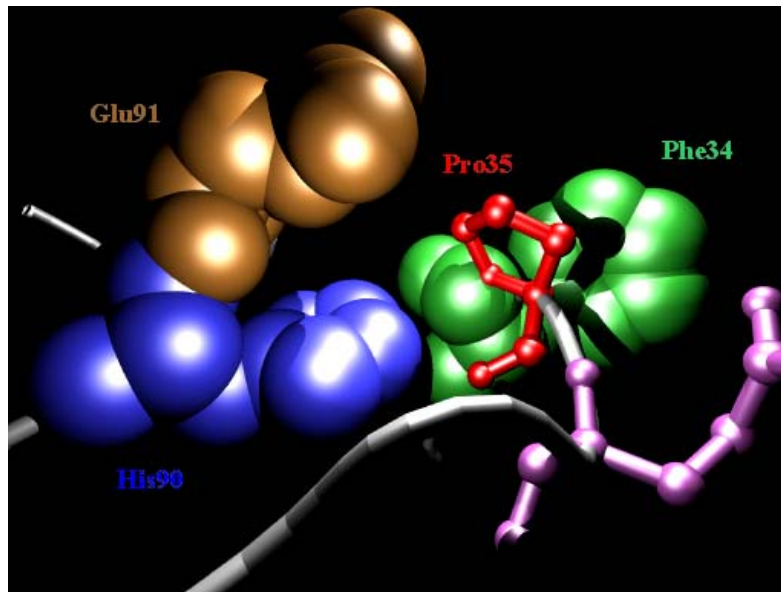


Abb. 3.1.7.: Umgebung des *cis*-Prolinrestes 35 in der C_H3 -Domäne. Die Phe34-Pro35-Bindung befindet sich im *loop*, der die β -Faltblattstränge B und C verbindet. His90 und Glu91 (Darstellung der van der Waals-Radien) gehören zu einem anderen *loop*.

Sequenzvergleiche mit mehr als 75 anderen Immunoglobulin-Domänen haben ergeben, dass nur eine davon, gc3 aus Maus, kein Prolin an der entsprechenden C_H3 -Position hat (Wels *et al.*, 1984). Dabei wurde bei sechs Domänen die dazugehörige Peptidbindung in der *cis*-Konfiguration gefunden. Der vorausgehende Rest ist in diesen Fällen immer ein Phenylalanin oder Tyrosin (siehe oben; Reimer *et al.*, 1998).

Die C_H3 -Monomere dimerisieren über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander. Die konservierten Reste dafür liegen auf den Faltblattsträngen A, B, E und D (Abb. 3.1.8.). Diese werden flankiert von sauren Aminosäuren in *loop* DE und basischen in *loop* AB. Durch Ausbildung von Salzbrücken zwischen den Monomeren wird das C_H3 -Dimer stabilisiert.

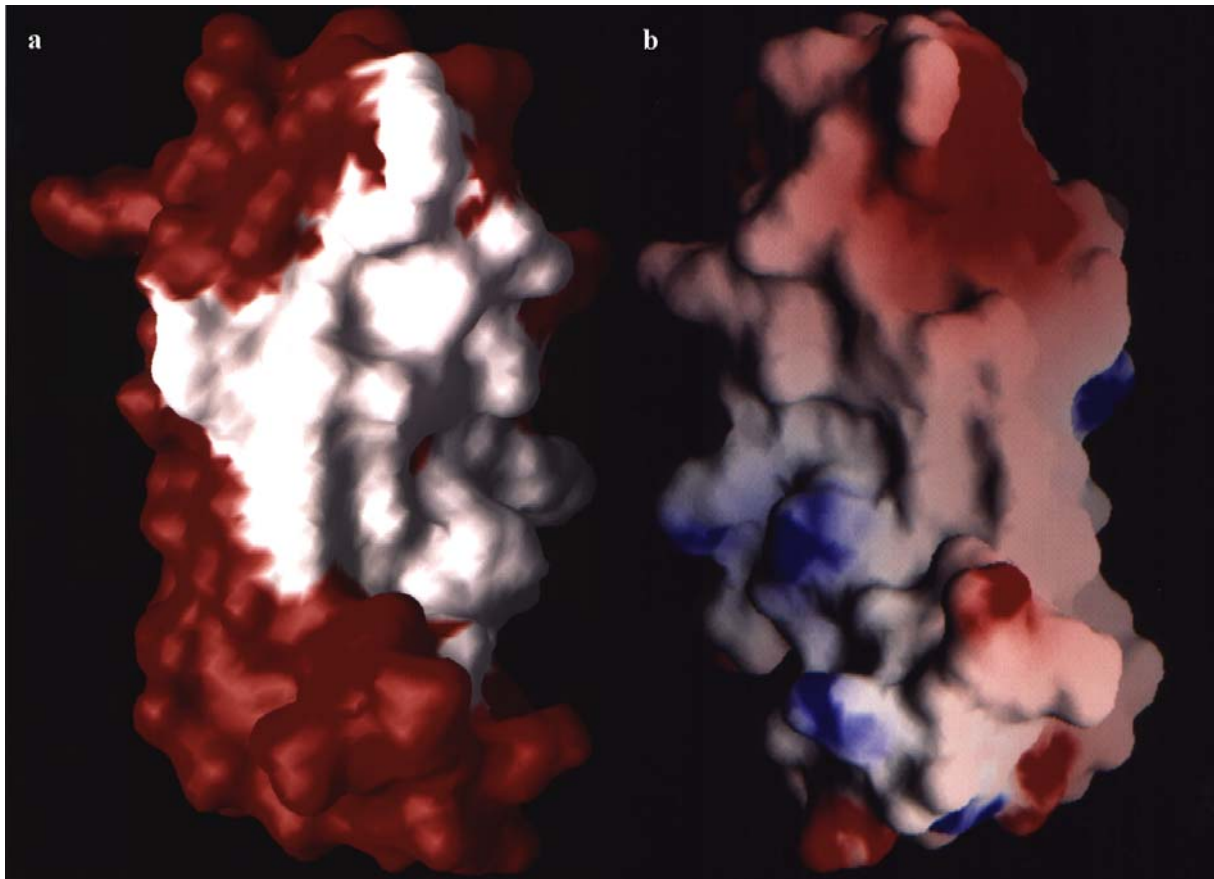


Abb. 3.1.8.: Die Dimerisationskontaktfläche von C_{H3} . (a) Oberflächendarstellung eines C_{H3} -Monomers mit Dimerisationsfläche in weiß. In (b) sind die an der Dimerisation beteiligten Reste hinsichtlich ihrer Ladung gekennzeichnet: Positiv geladene in blau, negative in rot und ungeladene Seitenketten in weiß.

3.1.2.2. Die dreidimensionale Struktur von C_{H2}

Von der C_{H2} -Domäne des monoklonalen Antikörpers MAK33 ist bislang keine dreidimensionale Struktur mittels Röntgenkristallographie oder NMR gelöst worden. Dennoch war es möglich, relativ präzise Strukturvorhersagen zu treffen. Dazu wurde ein sogenanntes Homologie-Modelling auf Basis der Strukturdaten von MAK33- C_{H3} sowie eines Fc-Fragmentes, das 93 % Sequenzidentität zu MAK33-Fc aufweist, durchgeführt. Die C_{H2} -Domänen sind dabei zu 97 % homolog bzw. 90 % identisch. Benutzt wurde dazu das Programm SwissModel 3.5 (www.expasy.ch/swissmod/). Das Ergebnis ist in Abb. 3.1.9. zu sehen.



Abb. 3.1.9.: Berechnete Struktur der C_{H2} -Domäne. Die intramolekulare Disulfidbrücke ist gelb, Tryptophane grün und Proline rot gefärbt. Rekombinant, in *E.coli* hergestelltes C_{H2} besitzt keinen Kohlenhydratrest. Dieser ist sonst über Asn60 (orange) mit der Polypeptidkette verbunden.

C_{H2} bildet wie C_{H3} eine sogenannte β -sandwich-Struktur aus, die über eine intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert ist (Cys24-Cys84). Die Sequenzbereiche, die die Faltblattstränge bilden, stimmen gut mit den zuvor, aus der Primärstruktur abgeleiteten Bereichen überein (Abb. 3.1.4.). Allerdings ist zu sehen, dass beide β -Faltblätter große Fluktuationen aufweisen. Dieses mag seine Ursache in *Modelling*-Artefakten haben. Andererseits finden sich in der Sequenz von C_{H2} Aminosäuren, die eine korrekte Ausbildung der Faltblätter stören könnten (Abb. 3.1.4.). Darüber hinaus ist der stabilisierende Zuckerrest (Deisenhofer, 1981) im Fall der rekombinant, in *E.coli* erzeugten C_{H2} -Domäne nicht vorhanden. Dieses kann ebenfalls Einfluss auf deren Struktur haben.

Wie bei C_{H3} liegt auch in der C_{H2}-Domäne ein Tryptophanrest (Trp40) in unmittelbarer Nähe zur Disulfidbrücke. Das zweite Tryptophan, Trp76, befindet sich in einem *loop*, der teilweise lösungsmittel exponiert ist (Abb. 3.1.9.). Darüber hinaus zeigte eine genauere Analyse der Struktur, dass eine größere Anzahl hydrophober Reste dem Lösungsmittel zugewandt ist.

Die Struktur von C_{H2} zeigt zahlreiche, von außen gut zugängliche Prolinreste. Zwei davon (Pro7 und Pro92) können in *cis*-Konfiguration zur Seitenkette der vorangehenden Aminosäure vorliegen (Abb. 3.1.2.). Prolin 7 befindet sich im Übergang zwischen einem Faltblattstrang und einem helikalen Bereich, während Prolin 92 in einer *loop*-Struktur zu finden ist (Abb. 3.1.9.).

Der authentische Antikörper MAK33 ist über die C_{H2}-Domäne mit einem Zuckerrest verknüpft (Deisenhofer, 1981). Dabei wird eine N-glykosidische Bindung zwischen dem Amidstickstoff der Asparaginseitenkette von Asn60 (entspricht Asn297 in der schweren Kette) und der Oligosaccharideinheit ausgebildet. Asparagin 60 befindet sich in einer gut zugänglichen *loop*-Region der Domäne (Abb. 3.1.9.). Mit Threonin 62 findet man die Erkennungssequenz Asn-X-Thr für die N-Glykosylierung wieder (Kornfeld & Kornfeld, 1985).

3.1.3. Quartärstruktur

Zur Analyse des oligomeren Zustandes wurden bisher hauptsächlich analytische Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Es wurde gefunden, dass C_{H2} als Monomer von der Säule eluiert. Der für die molekulare Masse des Proteins ermittelte Wert wich allerdings um 20 % von dem aus der Aminosäuresequenz errechneten Wert (11 279,7) ab (Pirkl, 1996). Aus diesem Grund wurden diese Experimente wiederholt (Abb. 3.1.10.) und zusätzlich analytische Ultrazentrifugationsläufe unternommen, um die früheren Ergebnisse zu bestätigen. Bei

Verwendung einer anderen Gelfiltrationssäule sowie leicht veränderter Flussrate lieferte der analytische *HPLC*-Lauf mit einer molekularen Masse von rund 12 000 einen genaueren Wert als zuvor (6 % Abweichung). In freier Lösung konnte mittels Ultrazentrifugation das Protein eindeutig als Monomer klassifiziert werden ($M_r = 11\ 677$).

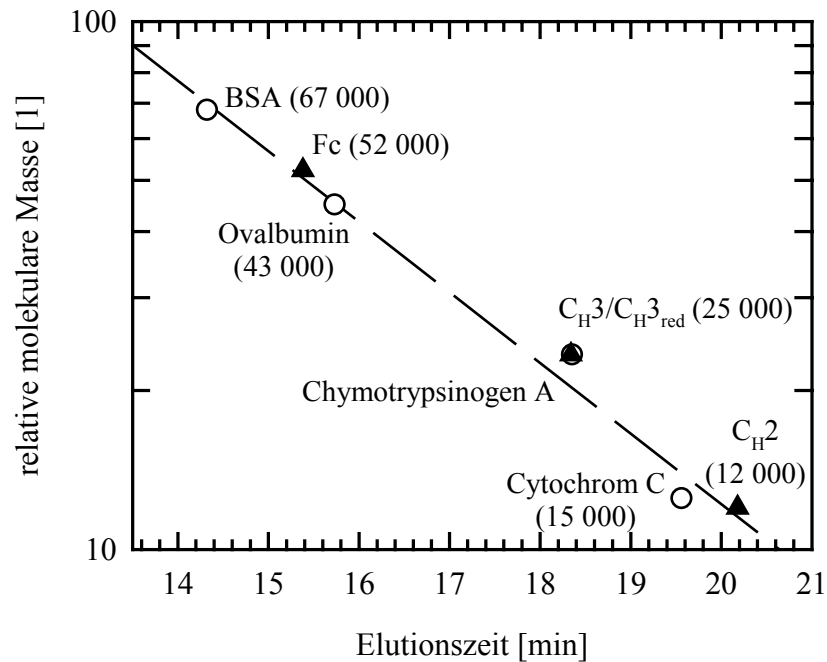


Abb. 3.1.10.: Analytischer *HPLC*-Gelfiltrationslauf von unterschiedlichen Fragmenten des Antikörpers MAK33. Benutzt wurde eine BioSep SEC S2000-Säule: 0,6 ml min⁻¹, 0,1 M Tris/HCl, 0,3 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 8, 20 °C. (O) Eichproteine.

Von der CH₃-Domäne war bereits bekannt, dass sie als Dimer auftritt (Mayer, 1993). Der Vollständigkeit halber wurde der analytische Gelfiltrationslauf unter identischen Bedingungen wie bei den anderen MAK33-Fragmente durchgeführt (Abb. 3.1.10.). Interessanterweise wirkte sich eine Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücke nicht auf die Quartärstruktur des Proteins aus. Trotz der Aggregationsempfindlichkeit konnte CH₃red als Dimer identifiziert werden (siehe auch 3.2.2.; Bell, 1997). Zusätzlich durchgeführte analytische Ultrazentrifugationsläufe bestätigten dieses Resultat.

In Abb. 3.1.10. ist ergänzend das rekombinant hergestellte Fc-Fragment aufgeführt. Dieses Protein, ebenfalls nicht glykosyliert wie C_{H2}, lief als Dimer, wobei der gefundene Wert für die molekulare Masse mit 52 000 um 9 % von der berechneten abwich (Tab. 3.1.1.). Wegen der unerwartet großen Aggregationsempfindlichkeit konnten keine Ultrazentrifugationsexperimente durchgeführt werden.

Unter sauren Lösungsmittelbedingungen wurde in der Vergangenheit das Umfallen von einigen Proteinen in eine andere Konformation beobachtet, mit der Folge, dass oft eine Zusammenlagerung zu größeren Komplexen erfolgte (Sunde & Blake, 1998; Damaschun *et al.*, 1999). Das Überführen von C_{H3} in den sogenannten *alternatively folded state* (siehe dazu 3.2.3.2.) bewirkte eine langsame Oligomerisierung des Proteins (Abb. 3.1.11.).

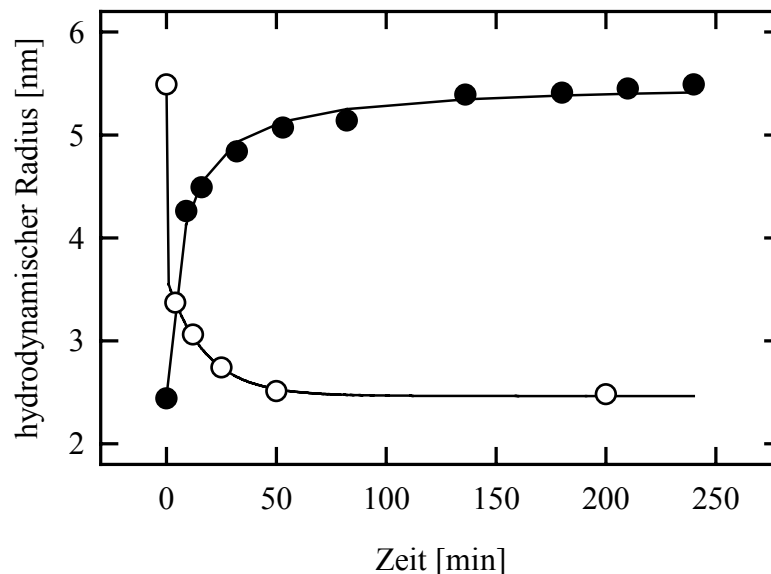


Abb. 3.1.11.: Oligomerisierung von *alternatively folded* C_{H3}. Der Vorgang wurde mit Hilfe von dynamischer Lichtstreuung gemessen. Aufgetragen ist der hydrodynamische Radius der detektierten Partikel. Proteinkonzentration: 471 µg/ml (19,2 µM Dimer). (●) Oligomerisierung in 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 60 mM NaCl, pH 2. (○) Dissoziation nach pH-Sprung auf pH 8 durch Zugabe von 1 M Tris/HCl.

Die Oligomeren bildeten sich in einer Reaktion zweiter Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_o = 2,77 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (o steht für Oligomerisierung). Nach

drei Stunden war der Vorgang beendet. Eine genaue Analyse ergab, dass 90 % des Proteins in der Lösung in einem Komplex mit einer relativen molekularen Masse von 172 000 vorlag. Gleichgewichtsläufe mit der analytischen Ultrazentrifuge lieferten eine Masse von 142 000. Die Oligomere müssen folglich aus 12-14 Untereinheiten bestehen. Die restlichen 10 % waren dimeres C_{H3}. Interessanterweise ließen sich die großen Komplexe durch die Anhebung des pH-Wertes auf pH 8 wieder auflösen (Abb. 3.1.11.). Dieser Prozess war schneller als die Oligomerisationsreaktion. Die Zwei-Schritt-Reaktion konnte durch eine schnelle Phase mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_{d1} = 8,33 \text{ s}^{-1}$ (d für Dissoziation) und eine langsame mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_{d2} = 9,48 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ beschrieben werden.

3.2. Stabilität

3.2.1. Stabilität der Domänen C_{H2} und C_{H3} im Vergleich

3.2.1.1. Stabilität der nicht glykosylierten C_{H2}-Domäne

Große hydrophobe Bereiche an der Oberfläche des Proteins, sowie instabile, durch ungeordnete Sequenzbereiche unterbrochene β -Faltblätter ließen vermuten, dass die intrinsische Stabilität der monomeren C_{H2}-Domäne gering ist. Der Einfluss von Denaturierungsmittel auf die Tertiär- und die Sekundärstruktur wurde mit Fluoreszenz und Fern-UV-CD verfolgt. GdmCl-induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsgleichgewichtsübergänge ergaben, dass die Tertiärstruktur von C_{H2} bei 0,6 M GdmCl aufzufalten beginnt. Der Mittelpunkt des Übergangs (C_m) befand sich bei 1,1 M GdmCl. Bei 2 M war das Protein vollständig denaturiert (Abb. 3.2.1.). Die Entfaltung war vollständig reversibel (Pirkel, 1996).

Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht festgestellt werden. Aus den Übergängen wurde eine freie Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_{U \rightarrow N}^0$ von $-11,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ und eine Kooperativität

m von $-10,8 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ GdmCl}$ unter der Annahme eines Zwei-Zustand-Modells berechnet (Gl. 2.8.1.). CD-Messungen lieferten dasselbe Ergebnis wie die Fluoreszenz.

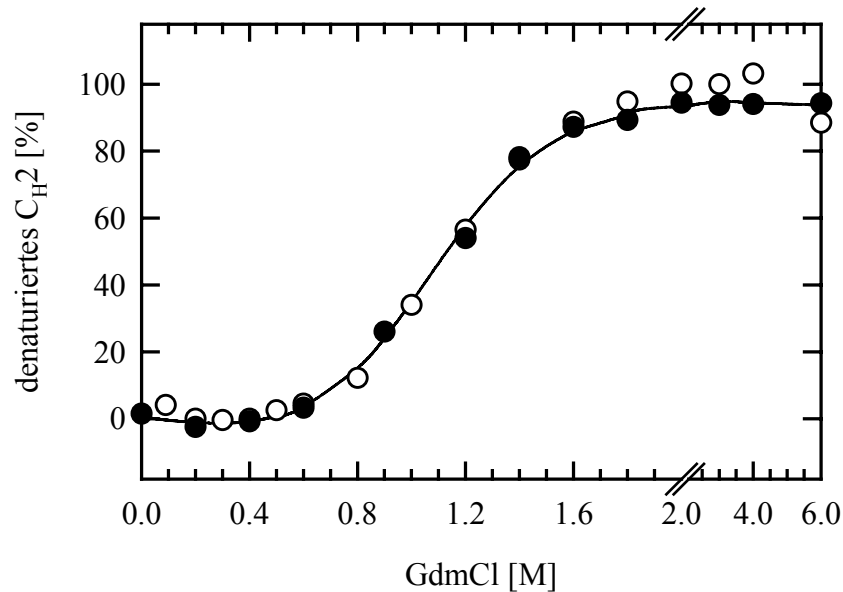


Abb. 3.2.1: Gleichgewichtsdenaturierungs- und -renaturierungsübergang von MAK33 C_{H2}.

Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von $5,0 \mu\text{g/ml}$ ($= 0,4 \mu\text{M}$) nach 24 h Inkubation in $0,1 \text{ M Tris/HCl}$, pH 8 mit unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Fluoreszenzspektren wurden bei 353 nm hinsichtlich der Intensität ausgewertet und die gewonnenen Werte auf 100% Signal des denaturierten Proteins normiert. ● Denaturierungsübergang, ○ Renaturierungsübergang (Pirkl, 1996).

Die Stabilität der C_{H2}-Domäne gegenüber Temperaturänderungen wurde schon früher untersucht (Pirkl, 1996; Thies, 1997). In dieser Arbeit wurden diese Messungen jedoch bei einem anderen pH-Wert wiederholt (pH 8), um die Ergebnisse daraus für den Vergleich mit der C_{H3}-Domäne auf eine gemeinsame Grundlage zu stellen. Der Temperaturübergang von C_{H2} war ein hoch kooperativer Prozess (Abb. 3.2.2.). Das Protein begann bereits bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ zu entfalten. Der Mittelpunkt der Übergangs (T_m) war bei $39 \text{ }^\circ\text{C}$ erreicht, die Entfaltung bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ abgeschlossen. Nach dem Rückkühlen lag C_{H2} wieder in seiner nativen Konformation vor. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Pirkl (1996). Wie bei der Stabilität gegenüber GdmCl konnte auch in diesem Fall keine Abhängigkeit des Übergangs von der

Proteinkonzentration festgestellt werden. Die freie Stabilisierungsenthalpie wurde mit Hilfe von Gl. 2.8.2. berechnet: $\Delta G_{U \rightarrow N}^0 = -7,36 \text{ kJ mol}^{-1}$.

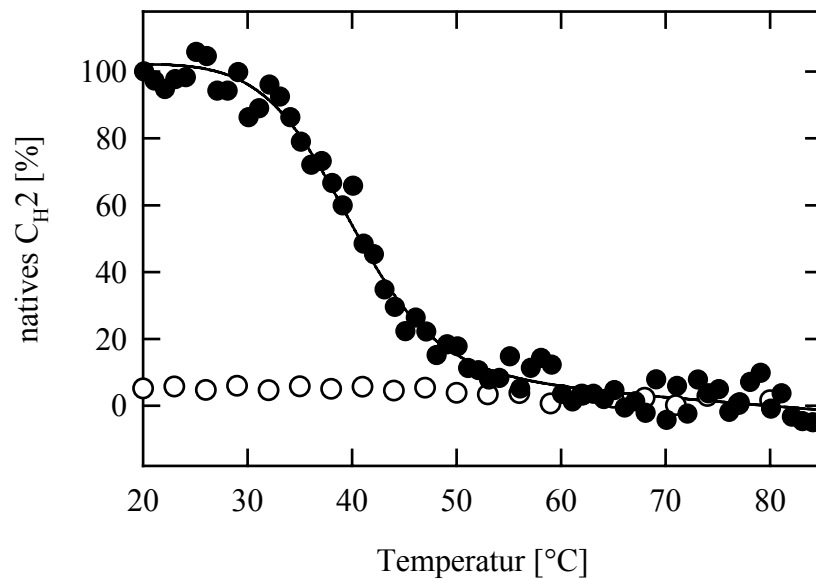


Abb. 3.2.2.: Temperaturübergang der C_{H2}-Domäne. Änderungen im CD-Signal bei der jeweiligen Temperatur wurden bei einer Wellenlänge von 220 nm aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 300 µg/ml (= 26,6 µM C_{H2}) in 40 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8 bzw. 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, pH 2. Der Übergang wurde bei pH 8 (●) und bei pH 2 (○) gemessen. Aufheizen auf 85 °C bei einer Heizrate von 1 °C/min

Die Messungen bestätigten die geringe Stabilität der C_{H2}-Domäne. Das Fehlen des Zuckerrestes und die Instabilität der β-Faltblätter scheinen der Grund dafür zu sein.

3.2.1.2. Stabilität der C_{H3}-Domäne

Das Verhalten der rekombinanten C_{H3}-Domäne gegenüber chemischer Denaturierung unterscheidet sich in vielen Punkten von dem von C_{H2} (Abb. 3.2.1.). C_{H3} ist ein Homodimer. Somit beinhaltet der beobachtete Vorgang der Denaturierung Dissoziation und Entfaltung der Monomere. Bis zu einer GdmCl-Konzentration von 0,4 M war das Protein stabil. Abhängig von der Proteinkonzentration durchlief C_{H3} einen unterschiedlich kooperativen Übergang. Die *m*-Werte schwankten zwischen $-43,2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ GdmCl}$ und $-28,9 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ GdmCl}$.

Eine Folge des dimeren Zustandes war die Verschiebung des Übergangsmittelpunktes (C_m) von 0,75 M zu 1 M GdmCl bei Erhöhung der C_{H3} -Konzentration um das 20-fache. Ab 1,4 M GdmCl war C_{H3} vollständig denaturiert (Abb. 3.2.3.).

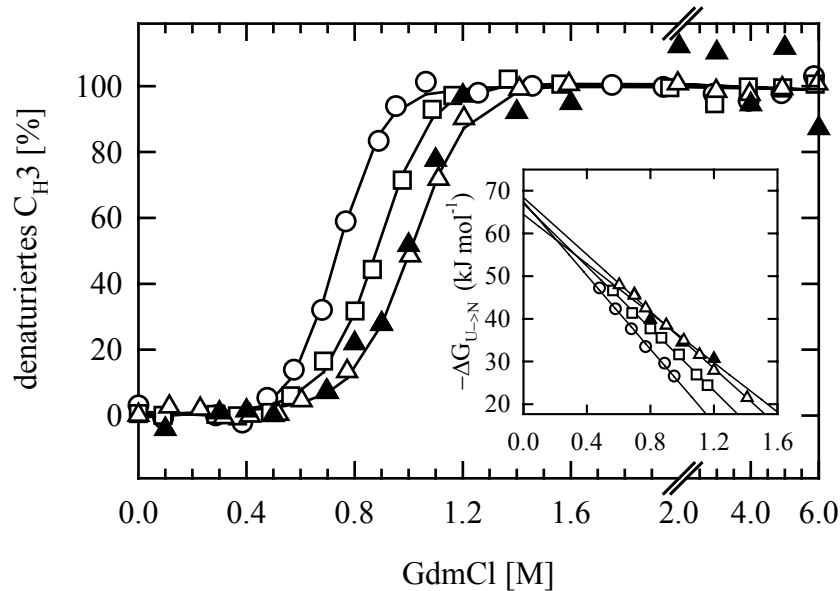
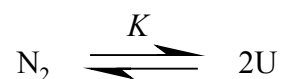


Abb. 3.2.3.: GdmCl-abhängiger Entfaltungs- und Rückfaltungsübergang von C_{H3} . Die Proben wurden nach sechstägiger Inkubation in 0,1 M Tris/HCl, pH 8 mit unterschiedlichen Konzentrationen von GdmCl bei 20 °C vermessen. Die Analyse der Fluoreszenzspektren erfolgte bei 355 nm, die der CD-Spektren bei 213 nm. Die C_{H3} -Konzentration betrug 5 µg/ml (0,2 µM Dimer)(○), 40 µg/ml (1,6 µM Dimer)(□) und 100 µg/ml (4,1 µM Dimer)(▲). CD wurde ebenfalls bei 100 µg/ml gemessen (Δ)(Mayer, 1998).

Auch hier stimmten die Ergebnisse aus den Fluoreszenz- und den CD-Messungen gut überein. Die Übergänge lieferten keinen Hinweis auf das Vorkommen von Gleichgewichtsintermediaten, so dass von einem Zwei-Zustands-Übergang ausgegangen wurde:



Gl. 3.2.1.: Gleichgewichtsübergang von C_{H3} nach dem Zwei-Zustands-Modell. N_2 steht für das native, dimere Protein und U für den denaturierten Zustand. K ist die Gleichgewichtskonstante.

Die freie Stabilisierungsenthalpie von C_{H3} wurde nach der Methode von Neet & Tim (1994) durch lineare Extrapolation bestimmt. Es ergab sich ein Wert für $\Delta G^0_{U \rightarrow N}$ von $-66,5 (\pm 1,5) \text{ kJ mol}^{-1}$ (Mayer, 1998).

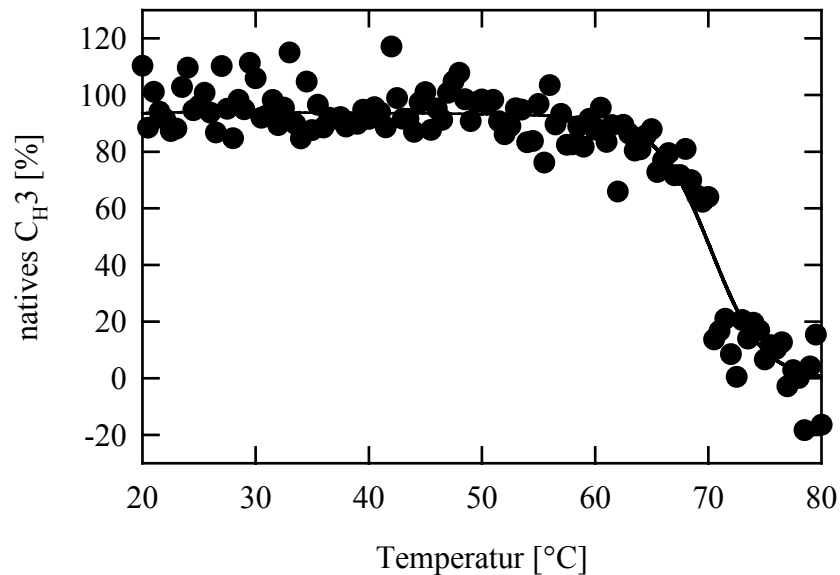


Abb. 3.2.4.: Temperaturübergang von C_{H3} bei pH 8. Verfolgung des Fern-UV-CD-Signals bei 215 nm. Die Proteinkonzentration betrug 200 µg/ml (8,2 µM Dimer) in 40 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8. Aufheizen auf 85 °C bei einer Heizrate von 1 °C/min.

Die C_{H3}-Domäne erwies sich als äußerst stabil gegenüber Temperaturänderungen (Abb. 3.2.4.). Das Protein behält über weite Temperaturbereiche seine native Struktur. Bei 60 °C begann es zu entfalten. Am Übergangsmittelpunkt T_m von 70 °C waren natives und denaturiertes C_{H3} im Gleichgewicht, die Entfaltung bei 78 °C abgeschlossen. Im Gegensatz zum GdmCl-Übergang war die thermische Denaturierung nur zu 79 % reversibel (Mayer, 1998).

Der Stabilitätsunterschied von C_{H3} zu C_{H2} scheint vorwiegend an der Dimerisierung des Proteins zu liegen. Dadurch werden große hydrophobe Bereiche dem Lösungsmittel entzogen und können so das Protein entropisch stabilisieren.

3.2.2. Der Beitrag der intramolekularen Disulfidbrücke zur Stabilität von Antikörperdomänen

Die C_{H3}-Domäne von MAK33, deren Disulfidbrücke reduziert wurde, wurde bereits früher eingehend charakterisiert (Bell, 1997). Dieses Protein wies eine gegenüber der oxidierten Domäne erheblich herabgesetzte Stabilität auf. Ergänzende Untersuchungen ergaben, dass beim GdmCl-Entfaltungsübergang nur noch eine minimale Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu beobachten war (Abb. 3.2.5.). Reduziertes C_{H3} beginnt bei 0,1 M GdmCl seine Struktur zu verlieren. Der Übergangsmittelpunkt (C_m) lag je nach Proteinkonzentration zwischen 0,3 M und 0,4 M GdmCl. Die Denaturierung war ab 0,6 M GdmCl abgeschlossen. Da die Entfaltung nicht vollständig reversibel war (Reversibilität zwischen 50 % und 60 %; Bell, 1997), konnte die freie Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_{U \rightarrow N}$ nur abgeschätzt werden.

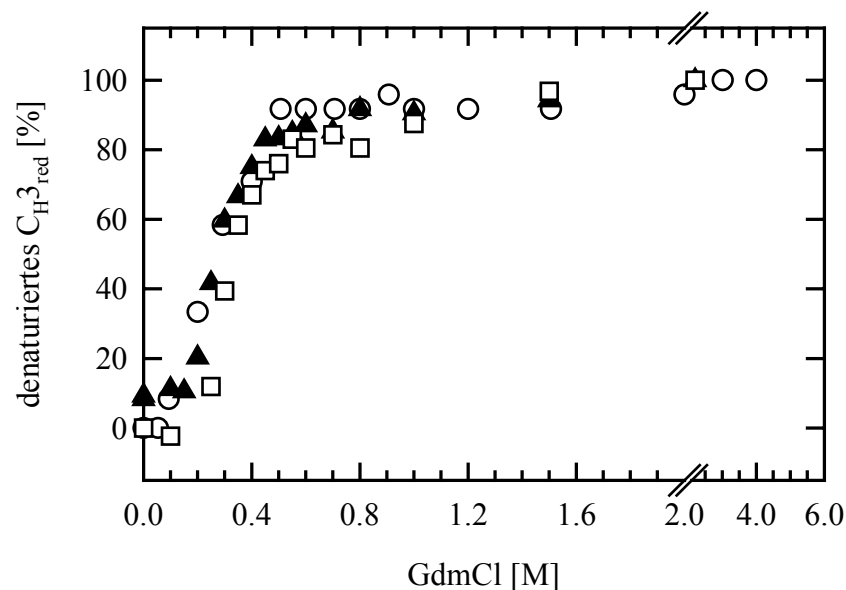


Abb. 3.2.5.: Stabilität der reduzierten C_{H3}-Domäne gegenüber GdmCl. Die Proteinkonzentration betrug 5 µg/ml (0,2 µM Dimer, ○), 50 µg/ml (1,6 µM Dimer, ▲) und 100 µg/ml (4,1 µM Dimer, □). Ausgewertet wurde die Fluoreszenzintensität bei 353 nm sowie das Fern-UV-CD-Signal bei 220 nm (nur die beiden höheren Konzentrationen) und anschließend auf 100 % Signal des denaturierten Proteins normiert. Als Puffer wurde 0,1 M Tris/HCl, pH 7, 1 mM EDTA verwendet. Gemessen wurde bei 20 °C.

Für C_{H2} bedeutet die Reduktion der Disulfidbrücke den kompletten Strukturverlust. Mit den hier angewandten spektroskopischen Methoden waren weder Reste von Tertiär- noch Sekundärstruktur nachweisbar.

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Disulfidbrücke der konstanten Domänen C_{H2} und C_{H3} einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität dieser Proteine hat. Während im Fall von C_{H3} die Dimerisierung einen wesentlichen stabilisierenden Beitrag leistet und dadurch eine vollständige Entfaltung verhindert (siehe auch 3.2.1.2.), hängt die strukturelle Integrität von C_{H2} von dem Vorhandensein der Disulfidbrücke ab.

3.2.3. Die C_{H2}- und die C_{H3}-Domäne im sauren pH-Bereich

Bedingt durch die Protonierung von Seitenketten und der daraus resultierenden elektrostatischen Abstoßung können Proteine im sauren pH-Bereich entfalten, aber auch dem *molten globule* ähnliche Intermediate bilden. So wurde neben anderen Antikörpern (Vlasov *et al.*, 1996; Welfle *et al.*, 1999) auch beim Antikörper MAK33 ein *molten globule* ähnlicher Zustand - im weiteren als *alternatively folded state* bezeichnet - gefunden (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995). Wie sich die Antikörperdomänen C_{H2} und C_{H3} unter diesen Bedingungen verhalten, sollten die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen zeigen.

3.2.3.1. C_{H2} bei pH 2

Die Inkubation der C_{H2}-Domäne in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten ergab folgendes Bild: Bei pH 8 zeigte das Protein sein charakteristisches Fern-UV-CD-Spektrum mit einem ausgeprägten Maximum bei 222 nm (1050 deg cm² dmol⁻¹) und zwei Minima bei 232 nm (-1506 deg cm² dmol⁻¹) und 210 nm (-3061 deg cm² dmol⁻¹), wie es auch schon früher beobachtet wurde (Abb. 3.2.6.) (Pirkl, 1996; Thies, 1997). Die Gesamtintensität war, wie für ein β -Faltblattprotein üblich, gering.

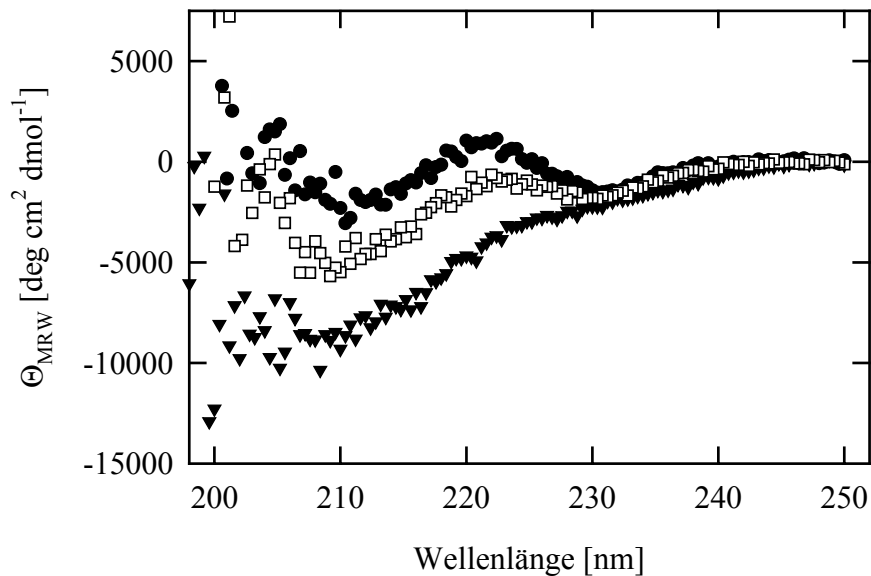


Abb. 3.2.6.: Fern-UV-CD-Spektren der C_{H2}-Domäne bei verschiedenen pH-Werten. Fern-UV-CD-Spektren des Proteins bei unterschiedlichen pH-Werten: pH 8 (●), pH 4,8 (□) und pH 2 (▼). Zu den entsprechenden Puffern siehe Abb. 3.2.9. Die Proteinkonzentration betrug 300 µg/ml (26,6 µM).

Wurde nun der pH-Wert gesenkt, so war zu beobachten, dass die Intensität auf das dreifache zunahm und das Maximum verschwand. Bei pH 2 war an dieser Stelle im Spektrum noch eine leichte Schulter zu beobachten (Abb. 3.2.6.). Ein Minimum bei 209 nm ($-9123 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) konnte nur vermutet werden, da das Rauschen des Signals in diesem Bereich des Spektrums zunahm. Das Spektrum schien jedoch überwiegend dem eines denaturierten Proteins zu entsprechen.

Die Analyse der Tertiärstruktur von C_{H2} bei pH 2 (Abb. 3.2.7.b) mittels Nah-UV-CD ergab ein Spektrum, dessen Intensität etwas über der des nativen Proteins bei pH 8 lag (Abb. 3.2.7.a). Das für Immunoglobulin-Domänen charakteristische Minimum bei 292 nm ($-27 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) (Pirkl, 1996; Thies, 1997; Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995) fand sich bei pH 2 nicht wieder. Das C_{H2}-Spektrum bei pH 2 unterschied sich jedoch deutlich vom Spektrum des denaturierten Proteins bei pH 8, während ein Unterschied zum Spektrum des entsprechenden Zustandes bei pH 2 nur im kurzwelligen Bereich auszumachen war (Abb.

3.2.7.b). Laut der Spektren waren die denaturierten Zustände bei pH 8 und pH 2 nicht dieselben.

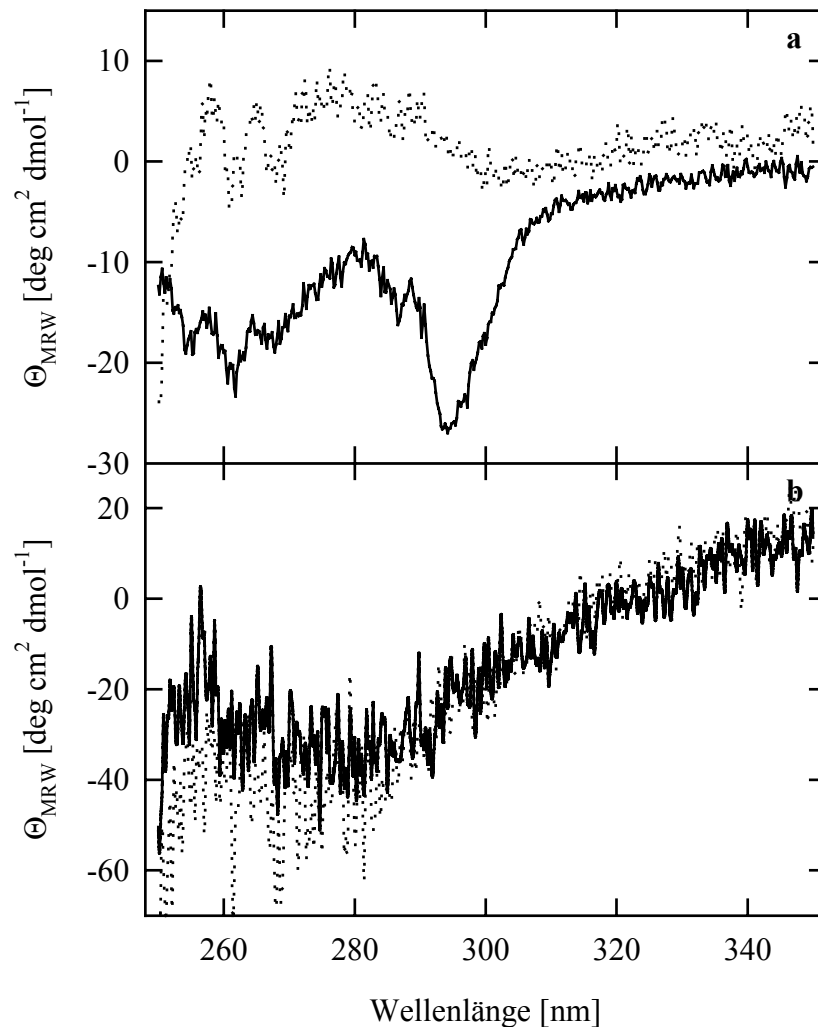


Abb. 3.2.7.: Nah-UV-CD-Spektren der C_{H2}-Domäne bei verschiedenen pH-Werten. (a) C_{H2} bei pH 8, denaturiert in 4 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl (····) und nativ in 0,1 M Tris/HCl (—). (b) C_{H2} bei pH 2, mit 4 M GdmCl (····) und ohne in 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 60 mM NaCl (—).

Die Fluoreszenzmessungen lieferten ähnliche Resultate. Der pH 2-Zustand von C_{H2} war nach der Lage seines Intensitätsmaximums (349 nm) kein vollständig entfaltetes Protein (Abb. 3.2.8.). Die Tryptophane waren etwas stärker lösungsmittlexponiert als im nativen Zustand, der sein Fluoreszenzmaximum bei 343 nm hat. Für das denaturierte Protein liegt er bei 355 nm (Pirkel, 1996; Thies, 1997). Nach Zugabe von 4 M GdmCl zur Proteinlösung

verschob sich das Maximum nach 353 nm, was ein Hinweis dafür war, dass noch vorhandene Strukturelemente denaturiert werden konnten. Im Vergleich zum nativen Protein bei pH 8 war die Intensität bei pH 2 um 50 % höher (Abb. 3.2.8.). Die beiden Ansätze – mit und ohne GdmCl – wiesen in dieser Hinsicht keinen Unterschied auf. Dass die Fluoreszenzintensität des denaturierten Zustandes bei pH 2 um die Hälfte geringer war als des entsprechenden Zustandes bei pH 8, könnte auf einem sogenannten *Quench*-Effekt im sauren pH-Bereich zurückzuführen sein (Mayer, 1998; Kammermeier, 1999). Dabei wird der Stickstoff der Tryptophan-Seitenkette protoniert, wodurch die Aromatizität und damit die Fluoreszenzeigenschaften verloren gehen.

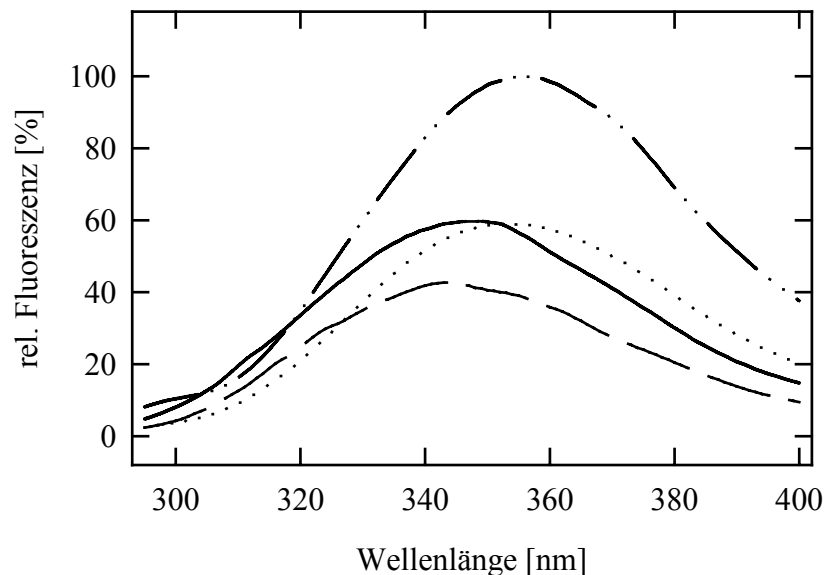


Abb. 3.2.8.: Fluoreszenzspektren der C_{H2}-Domäne bei verschiedenen pH-Werten. C_{H2} in 0,1 M Tris/HCl, pH 8 (---) und in 4 M GdmCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 8 (----). C_{H2} bei pH 2, mit 4 M GdmCl (····) und ohne GdmCl in 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 60 mM NaCl (—). Gemessen wurde bei einer C_{H2}-Konzentration von 7 µg/ml (0,6 µM), die Fluoreszenz wurde auf 100 % Signal des denaturierten Proteins bei pH 8 normiert.

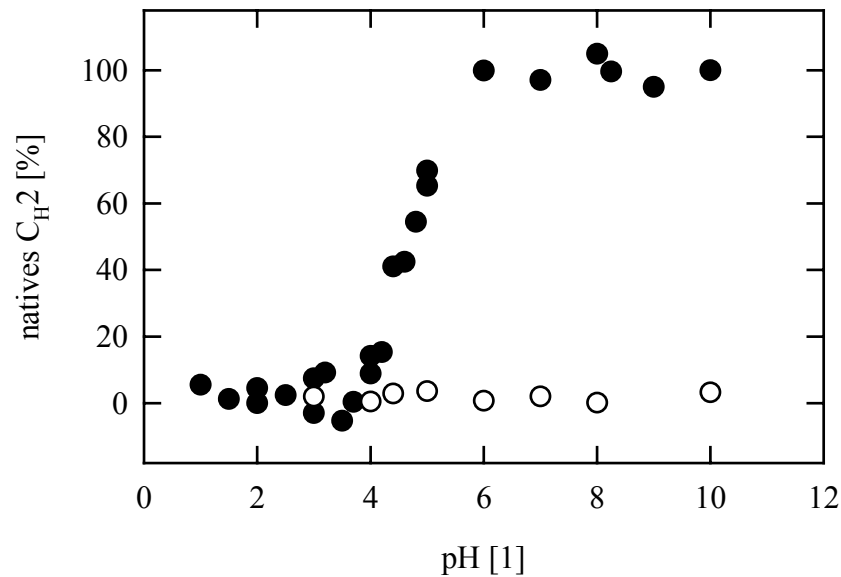


Abb. 3.2.9.: pH-Übergang von C_{H2}. Der pH-Übergang nach Auswertung der verschiedenen CD-Spektren bei 220 nm und Normierung auf 100 % Nativsignal: Denaturierung (●), Renaturierung (○). Puffer: pH 10 – pH 8: 50 mM H₃BO₃/NaOH, 50 mM NaCl; pH 8 – pH 5: 50 mM NaH₂PO₄/Citrat, 50 mM NaCl; pH 5 – pH 4,5: 50 mM HAc/NaOH, 56 mM NaCl; pH 4,5 – pH 4: 50 mM HAc/NaOH, 70 mM NaCl; pH 4 – pH 3: 50 mM Ameisensäure/NaOH, 56 mM NaCl; pH 3 – pH 2: 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 56 mM NaCl; pH 2 – pH 1: HCl, 50 mM NaCl. Die Proteinkonzentration betrug 300 µg/ml (26,6 µM).

Um herauszufinden, bei welchem pH-Wert sich der Konformationswechsel bei C_{H2} vollzieht, wurde ein pH-Übergang gemessen. Die Auswertung von Fern-UV-CD-Spektren von C_{H2}, gemessen bei verschiedenen pH-Werten, ergab einen kooperativen Übergang (Abb. 3.2.9.). Im Bereich von pH 10 bis pH 6 blieb die Sekundärstruktur von C_{H2} unbeeinflusst. Zwischen pH 6 und pH 4 fanden die größten Strukturänderungen statt, wie in Abb. 3.2.6. exemplarisch gezeigt. Der Mittelpunkt des Überganges befand sich bei pH 4,8. Ab pH 4 blieben die Spektren unverändert. Das Protein war hinterher durch Erhöhung des pH-Wertes nicht wieder renaturierbar (Abb. 3.2.9.). Die obigen Messungen wurden bereits in Puffern mit erhöhter Salzkonzentration gemacht. Anionen können eine Strukturbildung im sauren induzieren (Goto *et al.*, 1990; Fink *et al.*, 1994), was im Fall von C_{H2} aber nicht die

Denaturierung verhinderte. Auch eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration half nicht, die Sekundärstruktur zurückzubilden. Infolgedessen zeigten chemische und thermische Denaturierungsübergänge, ausgehend von C_{H2} bei pH 2, keine Änderung im CD-Signal (Abb. 3.2.1. und 3.2.2.). Fluoreszenzmessungen ergaben nur eine leichte Verschiebung in der Wellenlänge des Intensitätsmaximums (siehe oben).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass C_{H2} unter sauren Bedingungen fast vollständig entfaltet. Das Vorhandensein von Resten an Tertiärstruktur bei gleichzeitigem völligen Verlust der Sekundärstruktur ist zwar ungewöhnlich, zeigt aber, dass im denaturierten Zustand die Polypeptidkette keineswegs in einem strukturlosen Zustand vorkommen muss.

3.2.3.2. C_{H3} bei pH 2

Die C_{H3}-Domäne nahm im Gegensatz zu C_{H2} unter sauren Bedingungen eine wohldefinierte Struktur an (Abb. 3.2.10.) (Kammermeier, 1999). Entgegen früheren Arbeiten an IgG und Fab-Fragment war diese jedoch nur vorhanden, wenn zusätzlich Salz in der Lösung war.

Während das Fern-UV-CD-Spektrum (Abb. 3.2.10.a) von C_{H3} bei pH 8 ein Minimum bei 222 nm ($-3000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) zeigte (Mayer, 1993), war dieses unter pH 2-Bedingungen mit Salz deutlich zu 213 nm verschoben (Kammermeier, 1999). Das lokale Maximum bei 235 nm war verschwunden. Die Intensität des Signals hatte sich auf das dreifache erhöht. Im Gegensatz zu C_{H2} unterschied sich das Spektrum eindeutig von dem des denaturierten Proteins.

Die Analyse der Tertiärstruktur bei pH 8 mit Hilfe von Nah-UV-CD-Spektroskopie (Abb. 3.2.10.b), ergab zwei globale Minima bei 275 nm ($-225 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) und bei 292 nm ($-120 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) (Mayer, 1993). Letzteres wurde auch für C_{H2} gefunden (siehe oben; Pirkl, 1996; Thies, 1997). Unter pH 2-Bedingungen mit Salz nahm die Intensität des Signals

deutlich ab. Das Minimum bei 275 nm verschwand ganz, während es bei 292 nm in Ansätzen erhalten blieb (Abb. 3.2.10.b). Das Spektrum ähnelte dem des denaturierten C_{H3}. Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen lieferten Spektren, wie sie für C_{H2} unter denselben Bedingungen gemessen wurden (siehe 3.2.3.1.). Natives C_{H3} hatte eine niedrige Fluoreszenzintensität mit einem Maximum bei 345 nm (Abb. 3.2.10.c). Durch die Entfaltung stieg die Tryptophanfluoreszenzintensität, da sich die Chromophore nicht mehr im Einflussbereich der Disulfidbrücke befanden (Mayer, 1993; Mayer, 1998). Das Maximum verschob sich zu einer Wellenlänge von 352 nm. C_{H3} unter sauren Bedingungen zeigte ein Intensitätsmaximum bei 347 nm, das zwischen denen des nativen und des denaturierten Proteins lag (Mayer, 1998; Kammermeier, 1999). Zudem war die Intensität doppelt so hoch wie bei C_{H3} bei pH 8 (Abb. 3.2.10.c).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass C_{H3} unter sauren Bedingungen in Abhängigkeit von der Ionenstärke einen Faltungszustand annimmt, der sich durch den Verlust fast der gesamten Tertiärstruktur, aber durch eine wohldefinierte Sekundärstruktur auszeichnet. Dieser Zustand wird im Allgemeinen als *molten globule* bezeichnet. Wie aber die weiteren Untersuchungen zeigten, handelte es sich hier um einen sogenannten *alternatively folded state* (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995; Mayer, 1998; Kammermeier, 1999).

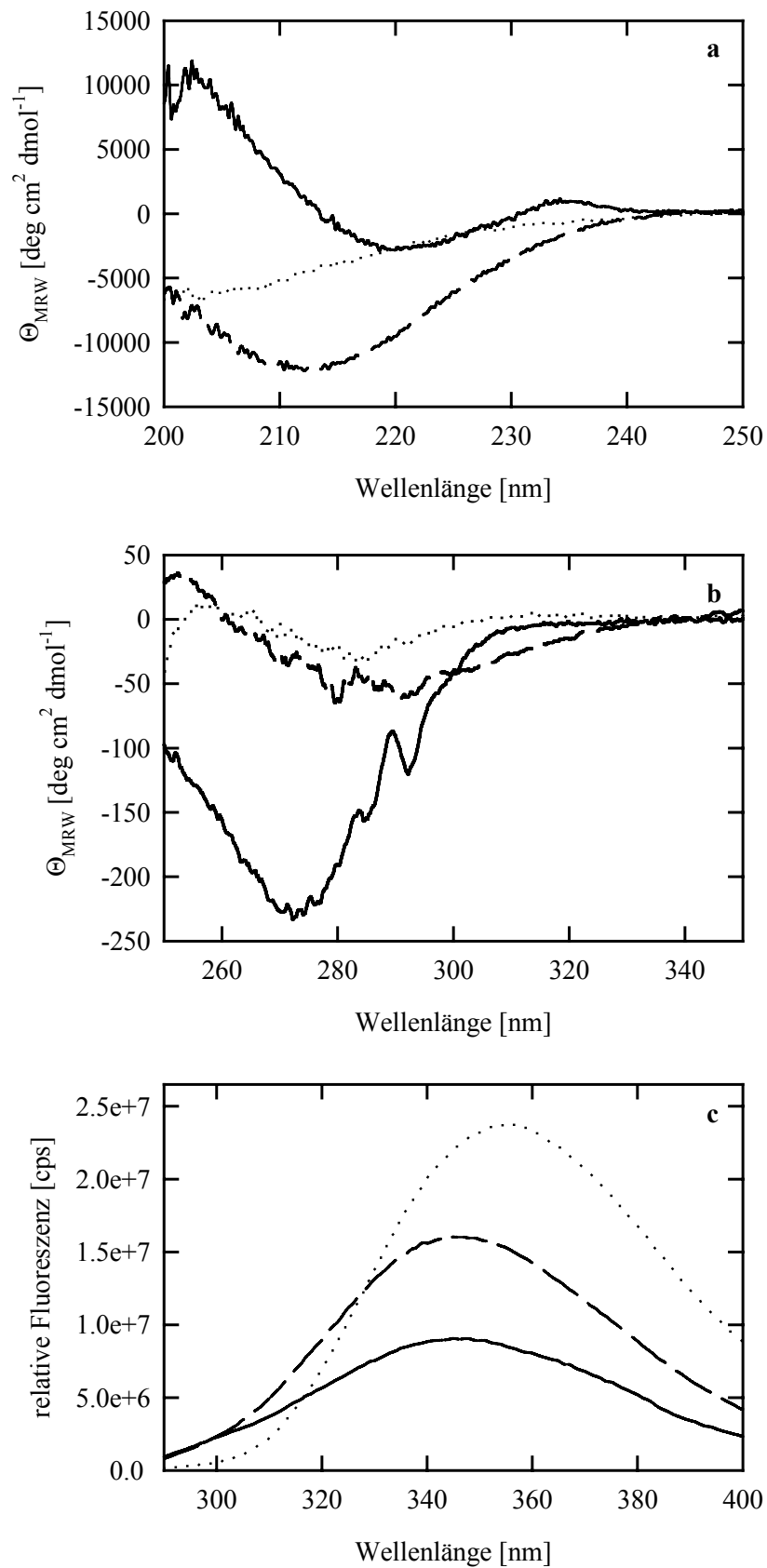


Abb. 3.2.10.: Die CH₃-Domäne bei pH 2. Legende nächste Seite.

Abb. 3.2.10.: Die C_{H3}-Domäne bei pH 2. Abbildung auf vorangehender Seite. (a) Fern-UV-CD-Spektren, **(b)** Nah-UV-CD-Spektren und **(c)** Fluoreszenzspektren von C_{H3}. Gemessen wurde in 0,1 M Tris/HCl, pH 8 (—), 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 60 mM NaCl, pH 8 (---) und das denaturierte Protein in 0,1 M Tris/HCl, 6 M GdmCl, pH 8 (····). Die C_{H3}-Konzentration betrug bei den CD-Messungen 200 µg/ml (8,2 µM Dimer) und bei den Fluoreszenzmessungen 7,5 µg/ml (0,3 µM Dimer).

C_{H3} nahm die *alternatively folded*-Konformation nur dann an, wenn die Ionenstärke einen bestimmten Wert überschritt. Der Wechsel von der säuredenaturierten Form zur *alternatively folded*-Konformation konnte mit einem Salzübergang verfolgt werden (Kammermeier, 1999). Dabei wurde C_{H3} im pH 2-Puffer mit unterschiedlichen Mengen verschiedener Salze inkubiert. Die Auswertung der entsprechenden Fern-UV-CD-Spektren ergab die in Abb. 3.2.11. dargestellten Übergänge.

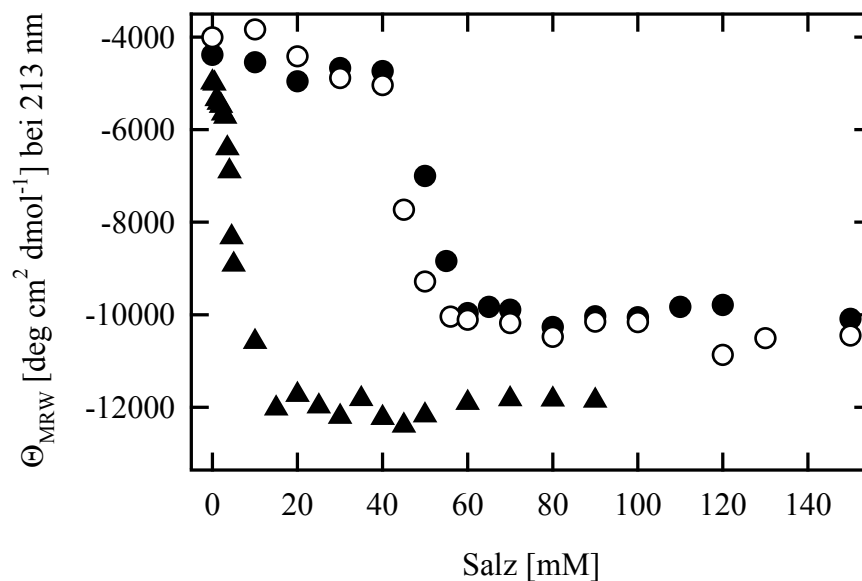


Abb. 3.2.11.: Einfluss von Anionen auf den säuredenaturierten Zustand von C_{H3}. Die Proteinkonzentration betrug 200 µg/ml (8,2 µM Dimer) in 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, pH 2 mit unterschiedlichen Konzentrationen an NaCl (●), KCl (○) und KClO₄ (▲). Gemessen wurde bei 20 °C (Kammermeier, 1999).

Dabei zeigten sich deutlich die schon beschriebenen Unterschiede in der Effektivität der Anionen, bei säuredenaturierten Proteinen Sekundärstruktur zu induzieren (Goto *et al.*, 1990;

Fink *et al.*, 1994). Während die Zugabe von kleinsten Mengen an KClO_4 bereits die Rückfaltung bewirkte, blieb $\text{C}_{\text{H}3}$ bei pH 2 durch die Zugabe des entsprechenden Chlorids zunächst entfaltet (Abb. 3.2.11.). Der Übergangsmittelpunkt verschob sich beim Wechsel des Salzes von 5 mM (KClO_4) nach 50 mM (KCl). Die Verwendung von NaCl anstatt KCl beeinflusste den Übergang kaum. Somit ergab sich hinsichtlich der Effektivität der Salze, die Rückfaltung von $\text{C}_{\text{H}3}$ bei pH 2 zu bewirken, folgende Reihenfolge:



Gl. 3.2.2.: Effektivität der Salze, die Rückfaltung von säuredenaturiertem $\text{C}_{\text{H}3}$ zu induzieren.

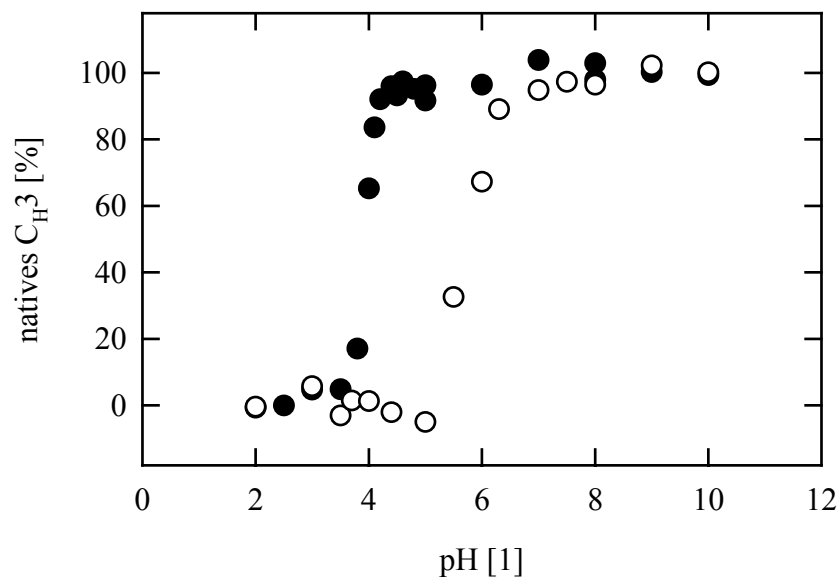


Abb. 3.2.12.: pH-Übergang der $\text{C}_{\text{H}3}$ -Domäne. Ausgewertet wurde das Fern-UV-CD-Signal bei 213 nm und anschließend auf 100 % Nativsignal normiert. Die Proteinkonzentration betrug 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (8,2 μM Dimer). Die Puffer entsprechen denen beim pH-Übergang von $\text{C}_{\text{H}2}$ (Abb. 3.2.9.). Gemessen wurde bei 20 °C. Denaturierung (●), Renaturierung (○).

Um den Konformationswechsel von $\text{C}_{\text{H}3}$ bei Absenkung des pH-Wertes zu beobachten, wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei $\text{C}_{\text{H}2}$ (siehe 3.2.3.1.) ein pH-Übergang gemessen, (Abb. 3.2.12.) (Kammermeier, 1999). Das Protein befand sich bis pH 4,4 in seiner

nativen Konformation. Zwischen pH 4,2 und 3,5 durchlief es einen kooperativen Übergang. Der Mittelpunkt des Übergangs erst bei pH 4 (C_{H2} : pH 4,8). Ab pH 3,5 lag C_{H3} im *alternatively folded state* vor.

C_{H3} ließ sich im Gegensatz zu C_{H2} durch pH-Erhöhung wieder in seine native Konformation überführen (Abb. 3.2.12.). Allerdings war eine Hysterese zu beobachten. Die Rückfaltung setzte erst bei pH 5 wieder ein. Der Mittelpunkt des Übergangs befand sich bei pH 5,8. Ab pH 7 konnte die native Konformation wieder detektiert werden.

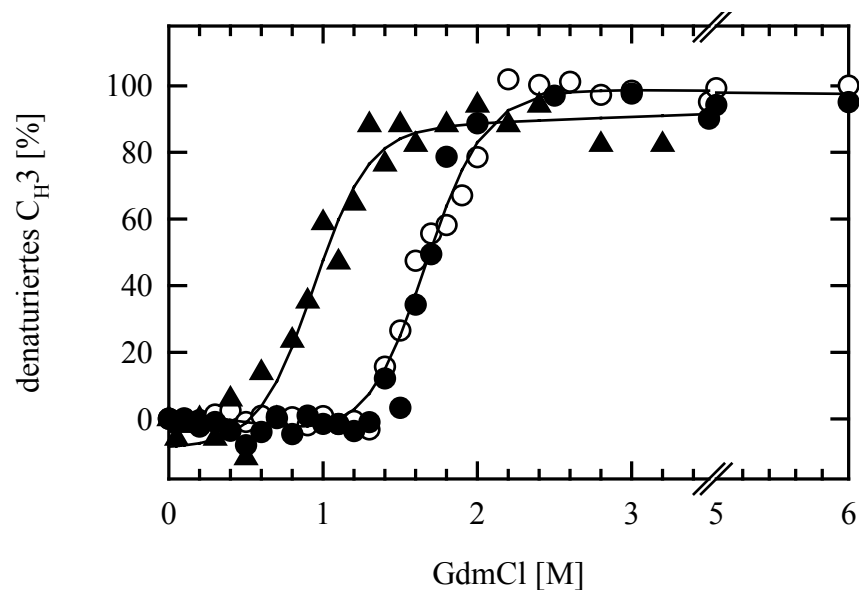


Abb. 3.2.13.: Stabilität von C_{H3} bei einem pH-Wert von 2 gegenüber GdmCl. Der Übergang wurde bei verschiedenen C_{H3} -Konzentrationen bei 20 °C gemessen: 20 µg/ml (0,8 µM Dimer; ▲), 100 µg/ml (4,1 µM Dimer; ○) und 200 µg/ml (8,2 µM Dimer; ●). Als Puffer wurde 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{o-H}_3\text{PO}_4$, pH 2 mit unterschiedlichen Konzentrationen GdmCl verwendet. Es wurde auf 100 % des denaturierten Signals normiert.

Wie bereits früher für den Antikörper MAK33 und dessen Fab-Fragment gezeigt werden konnte (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995), zeichnete sich auch der *alternatively folded state* der C_{H3} -Domäne durch eine hohe, dem nativen Protein ähnliche Stabilität gegenüber Denaturierung aus. Gleichgewichtsentfaltungübergänge von C_{H3} bei pH 2 in der Gegenwart von GdmCl waren hoch kooperativ und abhängig von der Proteinkonzentration

(Abb. 3.2.13.). Die Entfaltung des *alternatively folded state* begann bei 1,4 M GdmCl ($[C_{H3}] = 200 \mu\text{g/ml} = 8,2 \mu\text{M Dimer}$) und war bei 2,2 M GdmCl abgeschlossen. Der Mittelpunkt des Übergangs (C_m) wurde bei 1,7 M GdmCl festgestellt. Im Vergleich dazu denaturierte natives C_{H3} zwischen 0,6 M und 1,4 M GdmCl ($C_m = 1,0 \text{ M}$; siehe 3.2.1.2.). Die Entfaltung von *alternatively folded* C_{H3} war jedoch nicht völlig reversibel.

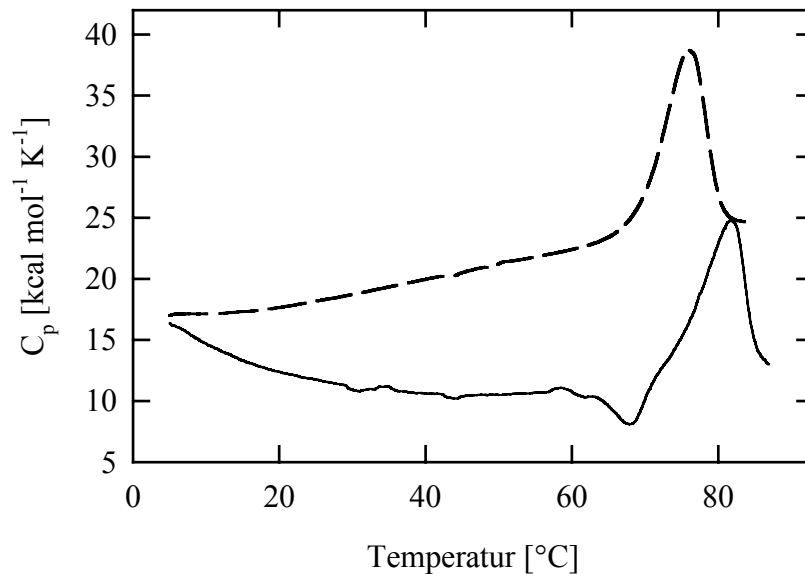


Abb. 3.2.14.: Temperaturübergang von C_{H3} bei pH 2. Gemessen mit *Differential Scanning Calorimetry (DSC)* bei einer Proteinkonzentration von 1,76 mg/ml (71,8 $\mu\text{M Dimer}$). (---) C_{H3} in 40 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 100 mM NaCl, pH 8. (—) C_{H3} in 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{o-H}_3\text{PO}_4$, 100 mM NaCl, pH 2 (Kammermeier, 1999).

Auch gegenüber thermischer Denaturierung erwies sich der *alternatively folded state* von C_{H3} als äußerst stabil (Kammermeier, 1999) (Abb. 3.2.14.). Kalorimetrisch gemessene Temperaturübergänge ergaben einen um 5 °C höheren Schmelzpunkt ($T_m = 80 \text{ °C}$) als bei nativem C_{H3} ($T_m = 75 \text{ °C}$). Die Asymmetrie der Peaks verhinderte eine Analyse der Daten nach einem Zwei-Zustands-Modell. Darüber hinaus war der Temperaturübergang nicht vollständig reversibel (Kammermeier, 1999).

3.3. Vergleichende Faltungsuntersuchungen von C_{H2} und C_{H3}

Die konstanten Domänen C_{H2} und C_{H3} des Antikörpers MAK33 falten trotz der beträchtlichen Unterschiede der Primärstrukturen in die gleiche Domänenstruktur, den *immunoglobulin fold*. Ob auch die Faltung und Entfaltung bei beiden Proteinen gleich abläuft, sollten die nachfolgenden Untersuchungen klären helfen.

3.3.1. Entfaltung

3.3.1.1. GdmCl-induzierte Entfaltung

Wie Entfaltungskinetiken der rekombinanten C_{H2}-Domäne zeigten, ist C_{H2} nicht nur thermodynamisch (siehe 3.2.), sondern auch kinetisch ein instabiles Protein. C_{H2} entfaltet nach dem Verdünnen in Denaturierungspuffer in kürzester Zeit (Abb. 3.3.1.). Entfaltungskinetiken – gemessen mittels *stopped flow* Fern-UV-CD- und Fluoreszenzspektroskopie – erfassten nur 40 % bzw. 45 % der Signaländerung. Diese konnte mit einer einfachen exponentiellen Funktion (Gl. 2.8.3.) analysiert werden und lieferte eine Geschwindigkeitskonstante von $k_e = 0,12 \text{ s}^{-1}$ (e steht für Entfaltung). Der restliche Teil der Signaländerung ging in der Totzeit von 2 ms verloren.

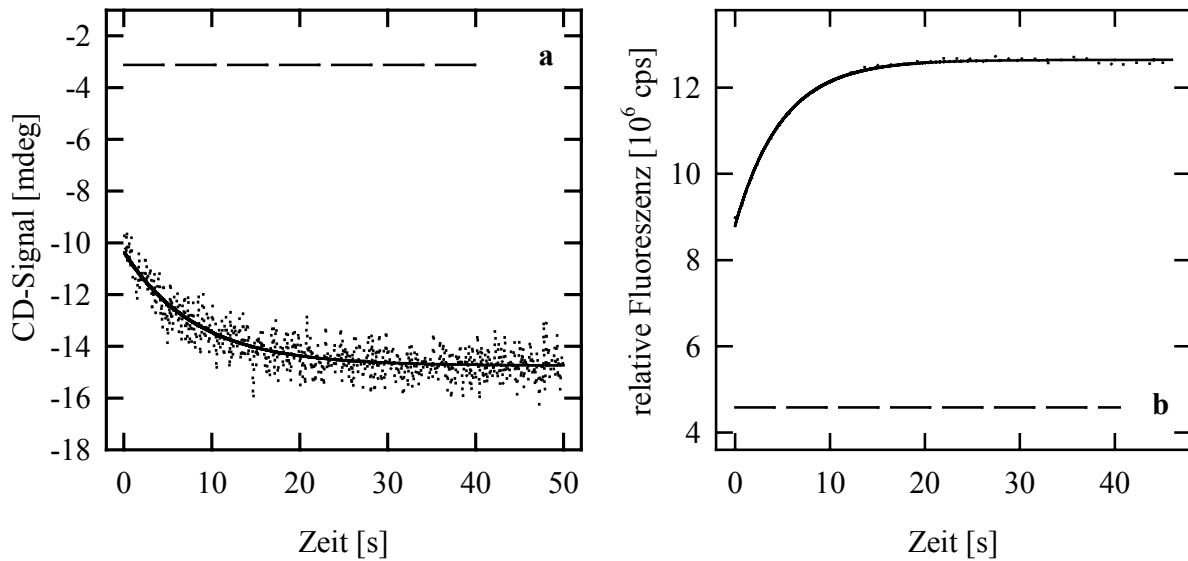


Abb. 3.3.1.: Entfaltung der C_{H2} -Domäne in 3 M GdmCl. (a) Fern-UV-CD-Signal bei 220 nm. Die Proteinkonzentration betrug 300 $\mu\text{g/ml}$ (26,6 μM) in 40 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 8. (b) Fluoreszenzsignal bei 353 nm (Anregung 280 nm). Die C_{H2} -Konzentration war 7 $\mu\text{g/ml}$ (0,6 μM) in 0,1 M Tris/HCl, pH 8. Gemessen wurde bei 4 $^\circ\text{C}$. (.....) Gemessenes Signal, (—) Fit und (---) Signal des nativen Proteins.

Die Untersuchung der Entfaltung von C_{H2} bei verschiedenen Denaturierungsmittelkonzentrationen ergab, dass mit sinkender GdmCl-Konzentration eine zweite Entfaltungsphase beobachtet werden konnte, deren Amplitude stetig zunahm (Pirkl, 1996). Diese Phase ist auf ein Phänomen zurückzuführen, das als *kinetic coupling* bezeichnet wird (Kiefhaber, 1995). Hierbei ist im Bereich niedriger GdmCl-Konzentrationen neben der Entfaltungsreaktion auch die Prolinisisomerisierung ein geschwindigkeitsbestimmender Vorgang (natives C_{H2} besitzt zwei *cis*-Xaa-Pro-Bindungen; siehe Abb. 3.1.2. und 3.1.9.).

Demgegenüber zeigte die C_{H3} -Domäne über den gesamten GdmCl-Konzentrationsbereich eine monophasische Entfaltung (Abb. 3.3.2.) (Mayer, 1993; Mayer, 1998). Diese war mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_e = 2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ wesentlich langsamer als die von C_{H2} . Zudem konnten 98 % der Amplitude der Entfaltung erfasst werden.

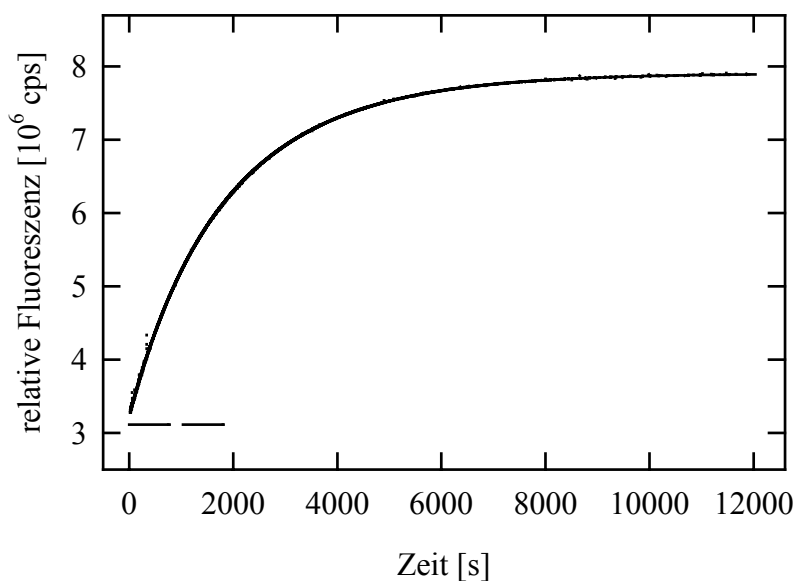


Abb. 3.3.2.: Entfaltung von C_{H3} in 3 M GdmCl. Die C_{H3}-Konzentration war 7,5 µg/ml (0,6 µM) in 0,1 M Tris/HCl, pH 8. Gemessen wurde die Fluoreszenz bei 355 nm (Anregung 295 nm; 4 °C). (····) Gemessenes Signal, (—) Fit und (---) Signal des nativen Proteins.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die unterschiedliche thermodynamische Stabilität von C_{H2} und C_{H3} auch in der Entfaltung des jeweiligen Proteins zum Ausdruck kommt. Die instabile C_{H2}-Domäne verliert einen Großteil ihrer Struktur bereits unmittelbar nach dem Kontakt mit dem Denaturierungsmittel, während die Entfaltung von C_{H3} deutlich länger dauert. In Tab. 3.3.1. sind die aus den Entfaltungskinetiken gewonnenen Daten zusammengestellt:

	C_{H2}	C_{H3}
Art der Entfaltung	bis 2 M GdmCl: biphasisch ab 2 M GdmCl: monophasisch	monophasisch
Geschwindigkeitskonstanten	$k_{e1} = 0,12 \text{ s}^{-1}$ (3 M GdmCl) $k_{e2} = 7,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (1,6 M GdmCl)	$k_e = 2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (3 M GdmCl)
Auflösbare Amplitude	40 % (CD) / 45 % (Fluoreszenz)	98 %

Tab. 3.3.1.: Parameter der Entfaltungskinetiken von C_{H2} und C_{H3}. Alle Kinetiken wurden in 0,1 M Tris/HCl, pH 8 bei 4 °C gemessen.

3.3.1.2. Entfaltung bei pH 2

Wie bereits oben erwähnt (siehe 3.2.3.1.) entfaltet C_{H2} beim Einbringen in pH 2-Puffer nahezu vollständig. Dieser Vorgang ließ sich mit Hilfe von *stopped flow*-Fern-UV-CD verfolgen (Abb. 3.3.3.). Die schnelle Kinetik konnte mit einer Exponentialfunktion nach Gl. 2.8.3. ausgewertet werden und lieferte eine Geschwindigkeitskonstante von $k_e^{\text{pH}} = 1,6 \text{ s}^{-1}$. Auffällig war auch hier ein großer Signalverlust von 40 % in der Totzeit der Messung (2 ms). Die Entfaltung war irreversibel.

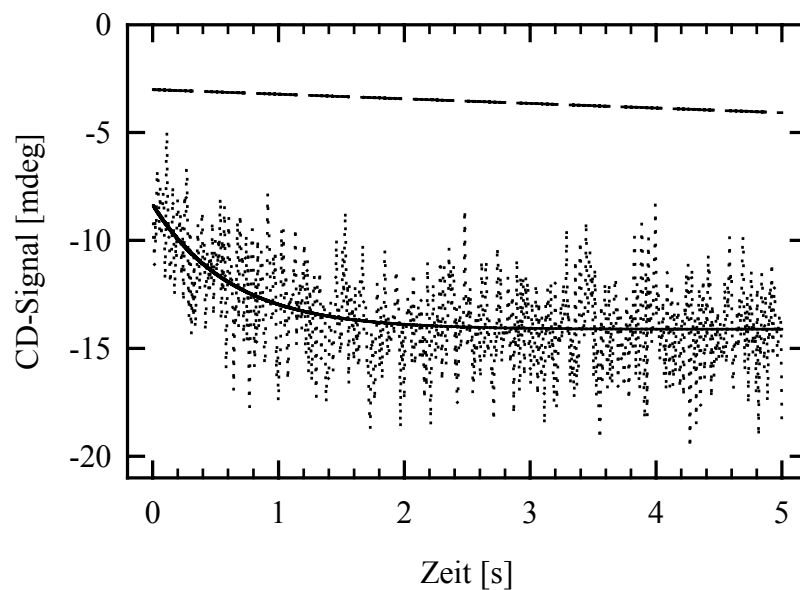


Abb. 3.3.3.: Entfaltung von C_{H2} unter sauren pH-Bedingungen. C_{H2} wurde 1:11 in 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 60 mM NaCl, pH 2 bei 4 °C verdünnt. Der Vorgang der Entfaltung wurde mit Hilfe von Fern-UV-CD bei 220 nm verfolgt. (····) Messsignal, (—) Fit und Signal des nativen Proteins (---).

C_{H3} war ebenfalls anfällig gegenüber der Absenkung des pH-Wertes auf pH 2. Allerdings fand diese Reaktion vollständig in der Totzeit der Messung (< 2 ms) statt und war deshalb nicht beobachtbar. Im Gegensatz zu C_{H2} entfaltete die C_{H3}-Domäne nicht, sondern nahm die Konformation des *alternatively folded state* an (siehe 3.2.3.2.; Mayer, 1998; Kammermeier, 1999). *Alternatively folded* C_{H3} konnte durch Anheben des pH-Wertes auf pH 8 in den nativen Zustand zurückgefaltet werden (Abb. 3.3.4.). Die Rückfaltung setzt sich aus einer lag-

Phase von 115 s, in der zuvor gebildete Oligomere (siehe dazu 3.1.3.) zu dissoziieren scheinen, und einer Faltungsreaktion mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_f^{\text{pH}} = 3,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ zusammen (Gl. 2.8.3.).

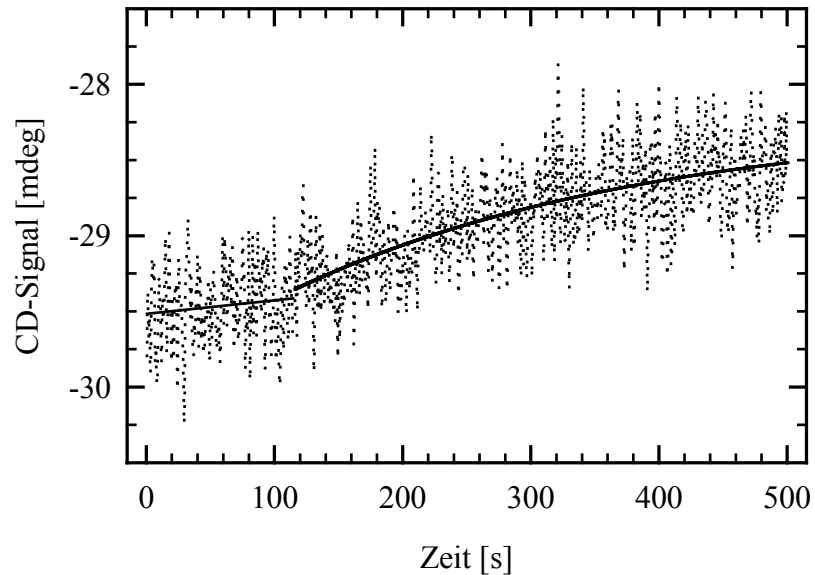


Abb. 3.3.4.: Rückfaltung von *alternatively folded* C_{H3} zum nativen Zustand. C_{H3} wurde für 24 Stunden in 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 60 mM NaCl, pH 2 inkubiert. Durch 1:11-Verdünnung wurde die Faltung gestartet und mittels Fern-UV-CD bei 220 nm beobachtet. Die Proteinkonzentration betrug 200 µg/ml (8,2 µM Dimer).

3.3.2. Faltung

3.3.2.1. Die Faltung der C_{H2}-Domäne

Der Faltungsweg der C_{H2}-Domäne war bis auf erste Vorversuche (Pirkl, 1996) noch nicht untersucht. Für die Faltungsexperimente wurde die C_{H2}-Domäne in 4 M GdmCl vollständig denaturiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden wurde durch Verdünnen in den Renaturierungspuffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8, 4 °C) die Rückfaltung induziert. C_{H2} faltete sehr langsam in die native Konformation zurück (Abb. 3.3.5.). Wurde die Kinetik mit zwei Exponentialfunktionen nach Gl. 2.8.4. ausgewertet, so ergaben sich Geschwindigkeitskonstanten von $k_{f1} = 2,0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $k_{f2} = 5,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (f steht für Faltung). Allerdings trat

eine geringe systematische Abweichung des Fits zu den gemessenen Daten auf. Diese Beobachtung deckt sich mit der von Pirkl (1996). Da durch die handgemischte Messung nur 50 % der Gesamtamplitude der Reaktion erfasst wurden, muss mindestens eine weitere kinetische Phase in der Totzeit dieses Experimentes ablaufen, die zudem für die obengenannte Abweichung des Fits verantwortlich ist.

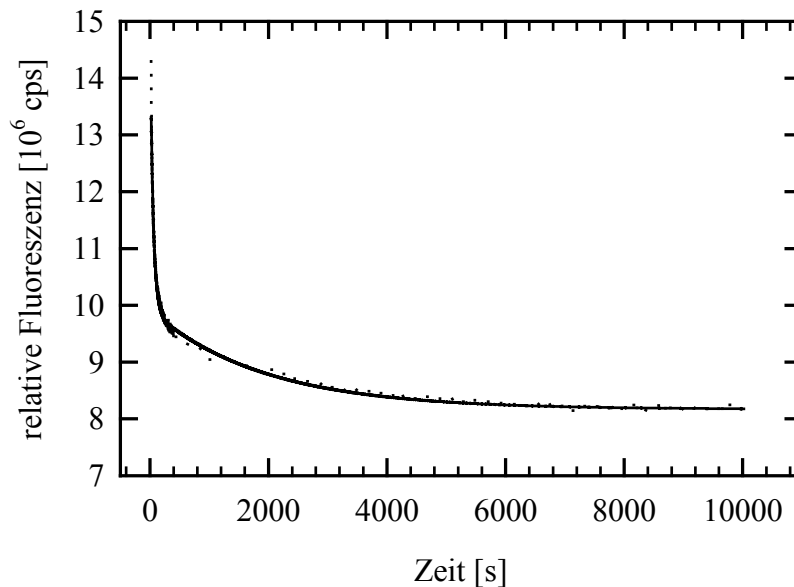


Abb. 3.3.5.: Rückfaltung von C_{H2}. Gemessen wurde die Änderung der Fluoreszenz bei 353 nm (Anregung 280 nm). Die Proteinkonzentration betrug 7,0 µg/ml (0,6 µM) in 0,1 M Tris/HCl, pH 8 bei 4 °C. Die Restkonzentration an GdmCl war 11 mM. (····) Messdaten, (—) Fit.

Stopped flow-Kinetiken der Rückfaltung von C_{H2} waren nicht mehr mit zwei, sondern nur noch mit drei Exponentialfunktionen auswertbar (Gl. 2.8.5.). Die gemessene Gesamtamplitude entsprach 71 % der Signaldifferenz zwischen denaturiertem und nativem C_{H2}. Bei der niedrigsten, erzielbaren GdmCl-Restkonzentration von 200 mM hatten die Geschwindigkeitskonstanten folgende Werte: $k_{f1} = 0,66 \text{ s}^{-1}$, $k_{f2} = 7,95 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $k_{f3} = 6,21 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

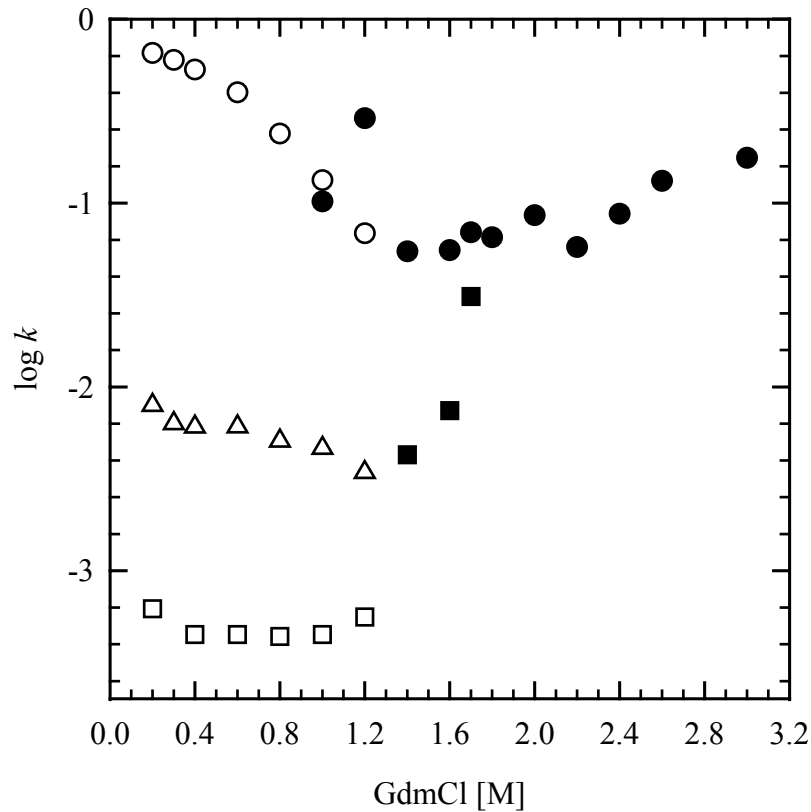


Abb. 3.3.6.: Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Geschwindigkeitskonstanten k_{f1} , k_{f2} und k_{f3} der Renaturierung (○)(△)(□). Geschwindigkeitskonstanten k_{d1} und k_{d2} der Denaturierung (■)(●). Fluoreszenzmessungen bei 353 nm (Anregung 280 nm) bei einer Proteinkonzentration von 7,0 $\mu\text{g/ml}$ (0,6 μM). Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8, 4 °C.

Die Faltung von C_{H2} wurde in Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration gemessen, um deren Einfluss auf die einzelnen kinetischen Phasen zu untersuchen (Abb. 3.3.6.). Die langsamste Phase k_{f3} wurde nicht von der GdmCl-Konzentration beeinflusst, während k_{f1} um eine Zehnerpotenz variierte. Außerdem war bei dieser Phase ein leichtes Abflachen unterhalb von 600 mM GdmCl zu beobachten, wie es auch schon für C_{H3} beobachtet wurde (F. Pirkl, pers. Mitteilung; Mayer, 1998).

Der Versuch, mit Hilfe von Fern-UV-CD-Kinetiken die Entstehung der Sekundärstruktur der C_{H2} -Domäne zu beobachten, war nicht erfolgreich. Erstaunlicherweise wurde sowohl nach Handmischung als auch bei *stopped flow*-Experimenten keine Kinetik der

Signaländerung beobachtet. Die Messung eines Fern-UV-CD-Spektrums kurz nach dem Start der Rückfaltung zeigte bereits das Spektrum des nativen C_{H2} (siehe Abb. 3.2.6.). Die Bildung der Sekundärstruktur scheint mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_f^{CD} > 2000 \text{ s}^{-1}$ abzulaufen. Das würde bedeuten, dass zu Beginn der Faltung ein Intermediat mit nativer Sekundärstruktur gebildet wird, das im weiteren Verlauf durch Ausbildung der Tertiärstruktur zum nativen Zustand faltet.

3.3.2.2. Die Faltung von C_{H3}

Die Aufklärung des Faltungsweges der C_{H3}-Domäne war bereits früher Thema eingehender Arbeiten (Mayer, 1998). Jedoch blieben einige wesentliche Fragen ungeklärt, so dass weitere Analysen nötig waren.

Wie bei C_{H2} wurden die Untersuchungen bei 4 °C durchgeführt, um eine höhere Auflösung hinsichtlich der Unterscheidung einzelner Faltungsphasen zu erreichen. Es war sichergestellt, dass sich der Faltungsmechanismus in diesem Temperaturbereich nicht von demjenigen in früheren Experimenten ermittelten unterschied (Mayer, 1998). Für die Faltungsstudien wurde C_{H3} zunächst vollständig für zwei Stunden in 6 M GdmCl bei Raumtemperatur entfaltet. Durch 240-fache Verdünnung des Denaturierungsmittels in Nativpuffer wurde die Rückfaltung gestartet. Wie die Entfaltung war auch die Faltung von C_{H3} langsam (Abb. 3.3.7.a und b). Die Bildung der nativen Sekundär- und Tertiärstruktur konnte mit drei Exponentialfunktionen nach Gl. 2.8.5. ausgewertet werden. Die erste, sich daraus ergebene Phase (14 % der Gesamtamplitude der Reaktion) hatte eine apparente Geschwindigkeitskonstante von $k_{f1} = 1,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (f steht für Faltung). Die verbleibenden 86 % der Signaländerung konnten durch zwei Faltungsphasen mit Geschwindigkeitskonstanten von $k_{f2} = 5,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $k_{f3} = 1,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ beschrieben werden. Die handgemischten Experimente erfassten jedoch nur 82 % (Fluoreszenz) bzw. 80 % (CD)

der Signaldifferenz zwischen denaturiertem und nativem C_{H3}. Bei *stopped flow*-Messungen (Totzeit 2 ms) blieben immer noch 10 % nicht detektierbar (Mayer, 1998). Ob dieser Verlust an Signal auf die Faltung von C_{H3}-Molekülen auf parallelen Wegen zum nativen Zustand oder auf die Bildung eines frühen Faltungsintermediates zurückzuführen ist, ließ sich mit diesen Experimenten nicht bestimmen.

Da die C_{H3}-Domäne schon bei Konzentration von 10⁻¹⁰ M als dimeres Protein vorliegt (Isenman *et al.*, 1979), könnte man vermuten, dass die Faltungskinetiken von der C_{H3}-Konzentration abhängig sind. Es wurde jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt (Mayer, 1998). Wie sich später zeigte, stellt die Dimerisierung keinen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der C_{H3}-Faltung dar und schlägt sich folglich auch nicht in den Faltungskinetiken nieder.

	C_{H2}	C_{H3}
Art der Faltung	triphasisch	triphasisch
Konzentrationsabhängigkeit	0	0
Geschwindigkeitskonstanten	$k_{f1} = 0,66 \text{ s}^{-1}$ $k_{f2} = 7,95 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{f3} = 6,21 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$k_{f1} = 1,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ $k_{f2} = 5,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ $k_{f3} = 1,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Auflösbare Amplitude	71 %	90 %
Einfluss von PPI	0	+ (k_{f3})

Tab. 3.3.2.: Parameter der Faltungskinetiken von C_{H2} und C_{H3}. Alle Kinetiken wurden in 0,1 M Tris/HCl, pH 8 bei 4 °C gemessen.

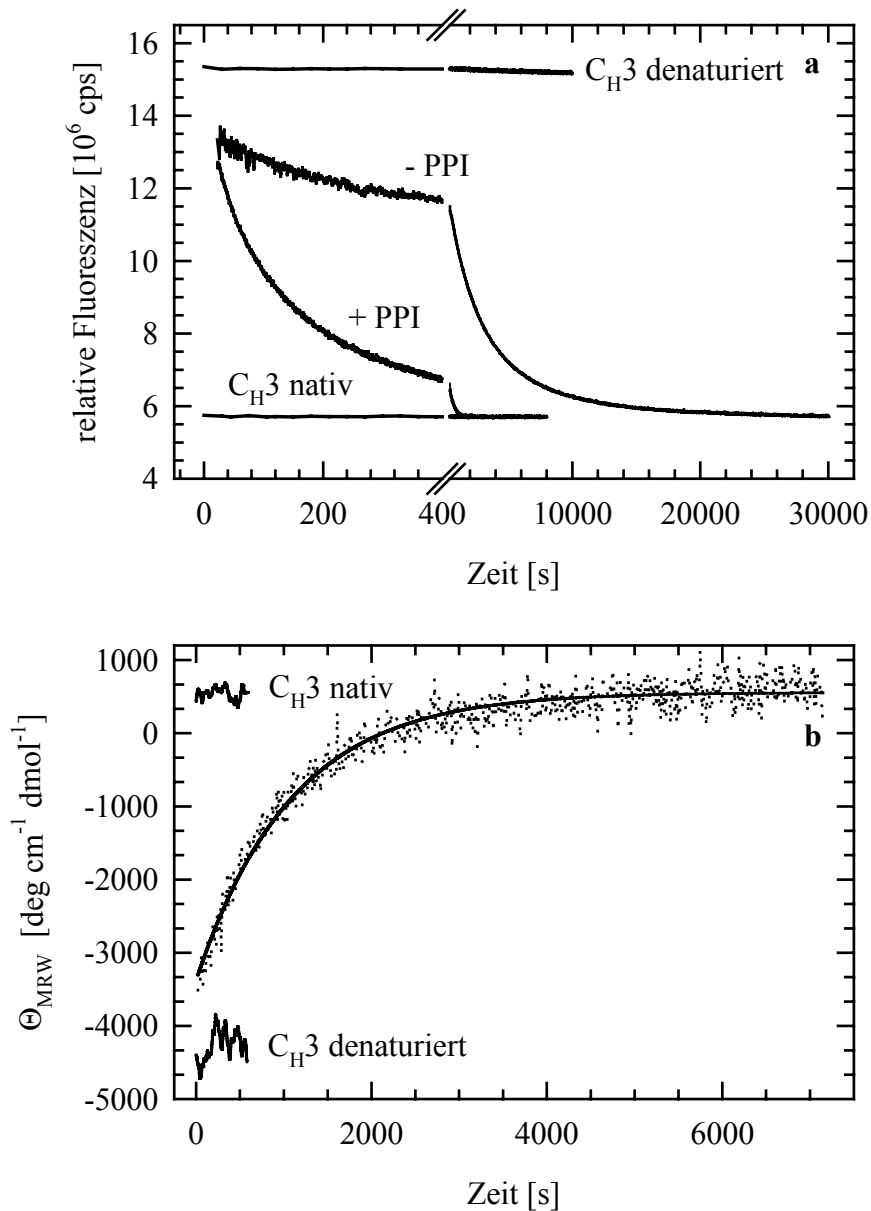


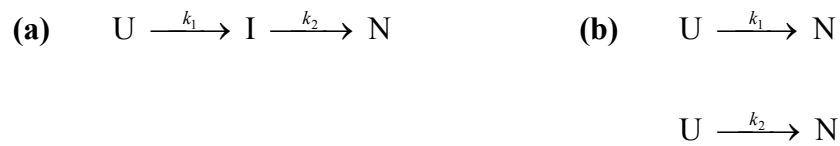
Abb. 3.3.7.: Faltungskinetiken von C_H3. (a) Die Änderung der Fluoreszenzintensität wurde bei einer Wellenlänge von 355 nm (Anregung 295 nm) bei 4 °C verfolgt. Die Proteinkonzentration war 7,5 µg/ml (0,3 µM Dimer) in 0,1 M Tris/HCl, 25 mM GdmCl, pH 8. Die Faltung von C_H3 konnte durch Zugabe von PPI in einem 5-fachen molaren Überschuss beschleunigt werden. (b) CD-Kinetik, gemessen wurde die Elliptizität bei 213 nm und 4 °C. Die C_H3-Konzentration betrug 200 µg/ml (8,2 µM Dimer).

3.3.3. Prolinisomerisierung

Die Beteiligung von Prolin-*cis/trans*-Isomerisierungen an der Faltung der C_{H2}-Domäne war bisher nicht eindeutig geklärt worden, obwohl C_{H2} zwei Prolinreste besitzt (Pro7 und Pro92), die aufgrund ihres Umfeldes in der Sequenz und laut der berechneten dreidimensionalen Struktur in der *cis*-Konfiguration vorliegen müssten (Abschnitt 3.1.). Die Zugabe des Faltungskatalysators PPI wie auch *double jump*-Experimente hatten keinen oder nur unwesentlichen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstanten der Faltung von C_{H2}. Vielmehr fiel das spektroskopisch detektierbare Signal um einiges geringer aus (Pirkl, 1996).

Um die Bildung von nativem C_{H2} zu verfolgen und eventuelle Einflüsse von Prolin-Isomerisierungen zu untersuchen, wurde eine Methode verwendet, die ursprünglich für RNase A entwickelt worden ist (Schmid, 1986) und auch als N-Test bezeichnet wird. Diese nutzt die Eigenschaft von nativen Proteinen aus, unter bestimmten Bedingungen (hohen GdmCl-Konzentrationen) viel langsamer zu entfalten als instabilere Faltungsintermediate. Damit ist die gemessene Signaländerung nur der Entfaltung des nativen Zustandes zuzuschreiben, da die Intermediate in der Totzeit der Messung denaturieren (Schmid, 1983; Schmid, 1986). Bei diesem Assay wird das Protein zuerst vollständig entfaltet, um anschließend die Rückfaltung zu starten. Nach verschiedenen Zeiten wird ein Aliquot vom Rückfaltungsansatz entnommen und durch erneute Denaturierung der Anteil an nativem Protein bestimmt. Im Fall von C_{H2} wurde die GdmCl-Konzentration hierfür so gewählt, dass die Domäne mit einer Kinetik, beschreibbar durch eine Exponentialfunktion nach Gl. 2.8.3., entfaltet (3 M GdmCl). Die Amplitude der einzelnen Kinetiken ist proportional zum Anteil an nativem Protein in der Lösung. Der Anstieg dieser Amplitude mit der Rückfaltungszeit gibt die Kinetik der Entstehung von nativ gefaltetem C_{H2} wieder. Anhand des Verlaufes der Kinetik können Aussagen darüber gemacht werden, ob das Protein über einen sequentiellen Zwei-Schritt-

Mechanismus faltet oder ob ausgehend von unterschiedlich denaturierten Zuständen zwei parallele Faltungswege angenommen werden können (Gl. 3.3.1.; Kiefhaber *et al.*, 1990).



Gl. 3.3.1: Mögliche Faltungswege von C_H2. (a) Sequentieller Weg, ausgehend von einem denaturierten Zustand (siehe auch Abb. 3.3.8.). (b) Zwei verschiedene denaturierte Zustände, die jeweils Ausgangspunkt eines Faltungsweges sind.

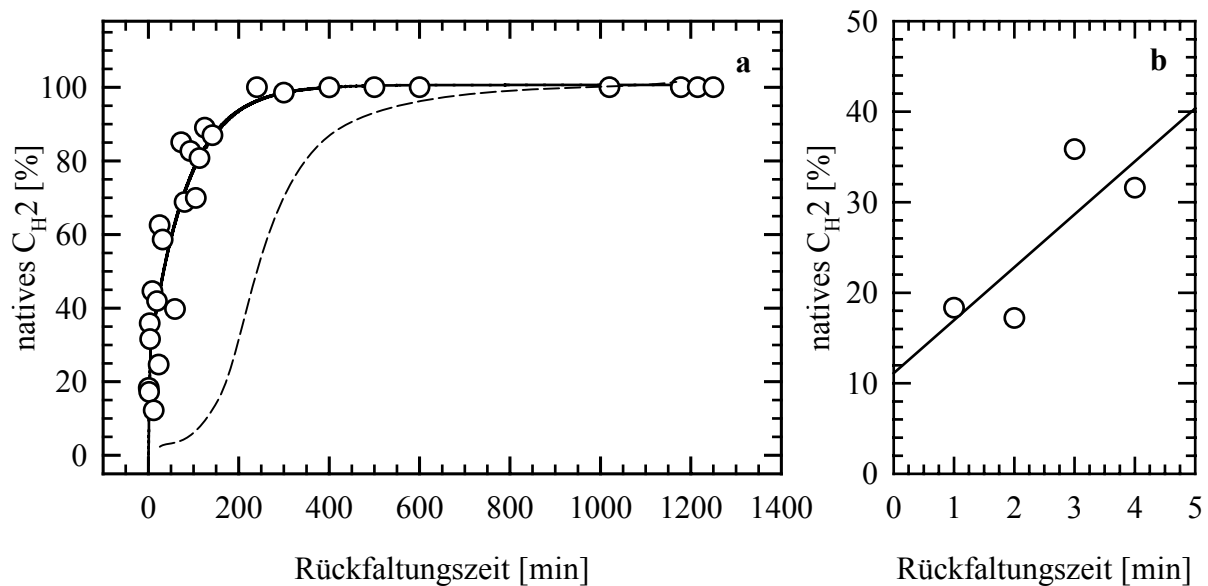


Abb. 3.3.8.: Kinetik der Entstehung von nativem C_H2. Amplitudenauswertung der Entfaltungskinetiken des N-Testes (siehe oben). (a) Gesamtkinetik: (○) Messwerte, (—) Fit, (---) exemplarisch berechnete Kinetik nach einem sequentiellen Faltungsmechanismus (Gl. 3.3.1.a). (b) Ausschnittsvergrößerung von (a).

Die Auswertung war nur mit zwei Exponentialfunktionen nach Gl. 2.8.4. möglich (Abb. 3.3.8.a). Es wurden zwei Geschwindigkeitskonstanten mit den Werten $k_{f1}^{ntest} = 1,9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $k_{f2}^{ntest} = 2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ erhalten, die 90 % der Gesamtamplitude beschreiben. Davon entfallen 27 % auf k_{f1}^{ntest} und 73 % auf k_{f2}^{ntest} . In der Totzeit der Messung wurden 10 % natives Protein gebildet (Abb. 3.3.8.b). Die Form der Kinetik deutet darauf hin, dass es sich

bei der Bildung von nativem C_{H2} nicht um einen sequentiellen Mechanismus handeln kann. Vielmehr muss natives C_{H2} auf mindestens zwei parallelen Wegen (k_{f1}^{nativ} und k_{f2}^{nativ}), ausgehend von unterschiedlich denaturierten Konformationen, gebildet werden (Gl. 3.3.1.b). Darüber hinaus deutet alles darauf hin, dass zusätzlich eine Population schnellfaltender Spezies im denaturierten Zustand von C_{H2} vorkommt (10 %). Erklärt werden könnte diese Heterogenität des denaturierten Zustandes durch die Kombination verschiedener Prolin-Konfigurationen (Brandts *et al.*, 1975; Schmid & Baldwin, 1978).

Die C_{H3}-Domäne des monoklonalen Antikörpers besitzt eine Xaa-Pro-Bindung, die im nativen Zustand in der *cis*-Konfiguration vorliegt (siehe dazu Abb. 3.1.7.). Zudem war bekannt, dass die Prolin-Isomerisierung ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Faltung von C_{H3} ist (Isenman *et al.*, 1979). Um herauszufinden, welche Phase der Rückfaltung (siehe 3.3.2.2.) dem Isomerisierungsprozess zugeordnet werden kann, wurden Faltungsanalysen bei Anwesenheit eines 5-fachen Überschusses PPI (Typ: Cyclophilin; $k_{\text{cat}}/K_m = 6,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) durchgeführt (Lilie *et al.*, 1993). Das Ergebnis ist in Abb. 3.3.7.a gezeigt. PPI hatte einen großen Einfluss auf die Faltung von C_{H3}. Eine der beiden langsamen Phasen (k_{f2} , k_{f3}) wurde stark beschleunigt ($k_f^{\text{PPI}} = 1,7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), während die andere unverändert blieb. Die Katalyse war auch dann noch möglich, wenn der Faltungsvorgang bereits gestartet worden war und PPI nachträglich zugegeben wurde (Abb. 3.3.9.). Dieses kann damit erklärt werden, dass die entsprechende Peptidbindung (F₃₄-P₃₅) auch im gefalteten Zustand noch gut von außen, vom Lösungsmittel her für das Enzym zugänglich ist (Abb. 3.1.7.).

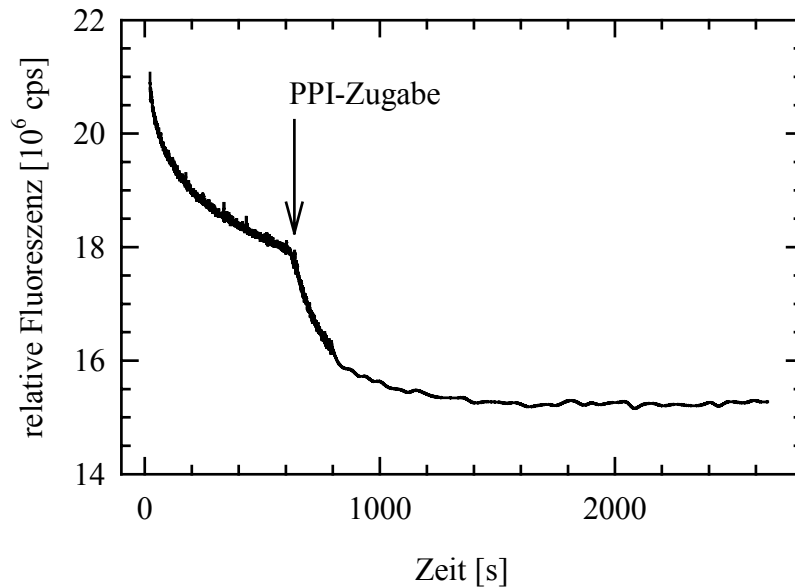


Abb. 3.3.9.: Zugabe von PPI nach Beginn der Faltung von C_{H3}. Die Rückfaltungsbedingungen waren die gleichen wie bei Abb. 3.3.7.a. Jedoch wurde ein 5-facher molarer Überschuss an PPI erst nach 10 min zum Rückfaltungsansatz hinzugegeben.

Sogenannte *double jump*-Experimente konnten die Beteiligung von Prolin-Isomerisierung an der Faltung von C_{H3} bestätigen (Mayer, 1998). Die kinetische Phase, die der Isomerisierungsreaktion zuzuordnen ist, war von der GdmCl-Konzentration im Rückfaltungsansatz abhängig. Dieses lässt darauf schließen, dass mit der Transformation der Xaa-Pro-Bindung von der *trans*- in die *cis*-Konfiguration eine weitergehende Konformationsänderung im Protein verbunden ist (Mayer, 1998).

3.3.4. Intermediate in der Faltung von Antikörperdomänen

Der Hauptfaltungsweg der C_{H3}-Domäne führt über mindestens ein Faltungsintermediat (Mayer, 1998). Um die zeitliche Verteilung dieser kinetisch gefangenen Proteinkonformation zu untersuchen, wurden sogenannte *triple jump*-Experimente durchgeführt. Die Prozedur hierfür gleicht der des N-Testes, mit dem Unterschied, dass die GdmCl-Konzentration für die Entfaltung niedriger liegt. Dadurch können sowohl das native Protein als auch Faltungsintermediate kinetisch nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens lässt sich

der Anteil von nativem Protein und Faltungsintermediat, die beide während der vorangegangenen Renaturierung gebildet worden sind, bestimmen. Natives C_{H3} denaturiert mit einer monoexponentiellen Kinetik (siehe 3.3.1.). Ist dagegen ein Intermediat vorhanden, dann tritt eine weitere Phase in der Kinetik auf (Abb. 3.3.10.). Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten waren $k_e^N = 2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $k_e^I = 3,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (N steht für das native Protein, I für das Intermediat). Erstere entspricht der Konstanten aus der Entfaltung von nativem C_{H3}. Die zweite ist dem Intermediat zuzuordnen, das somit 13-mal schneller denaturiert als N. Der Anteil der Intermediatsamplitude an der Gesamtamplitude der Reaktion entspricht dem Anteil an Intermediat am Gesamtprotein in der Lösung.

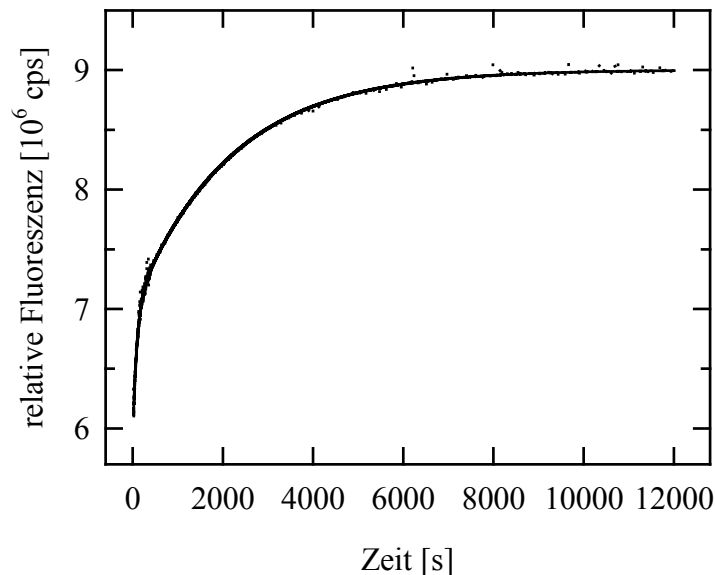


Abb. 3.3.10.: Exemplarische Kinetik eines *triple jump*-Experimentes mit C_{H3}. Nach Rückfaltung für 38 min wurde das Protein in 2,5 M GdmCl denaturiert. Die Kinetik wurde mittels Fluoreszenzmessung bei 355 nm (Anregung 295 nm) verfolgt. Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8, 4 °C. C_{H3}-Konzentration bei der Faltung: 7,5 µg/ml (0,3 µM Dimer); bei der Entfaltung: 5 µg/ml (0,2 µM Dimer).

Abb. 3.3.11.a zeigt den zeitlichen Verlauf der Intermediatsamplitude und der des nativen Proteins. Natives C_{H3} wird bereits zu Anfang des Faltungsprozesses gebildet, und zwar schneller als das Intermediat. Als Erklärung könnte hierfür ein paralleler Faltungsweg

angeführt werden, auf dem C_{H3} unter Umgehung des Intermediates direkt zum nativen Zustand faltet.

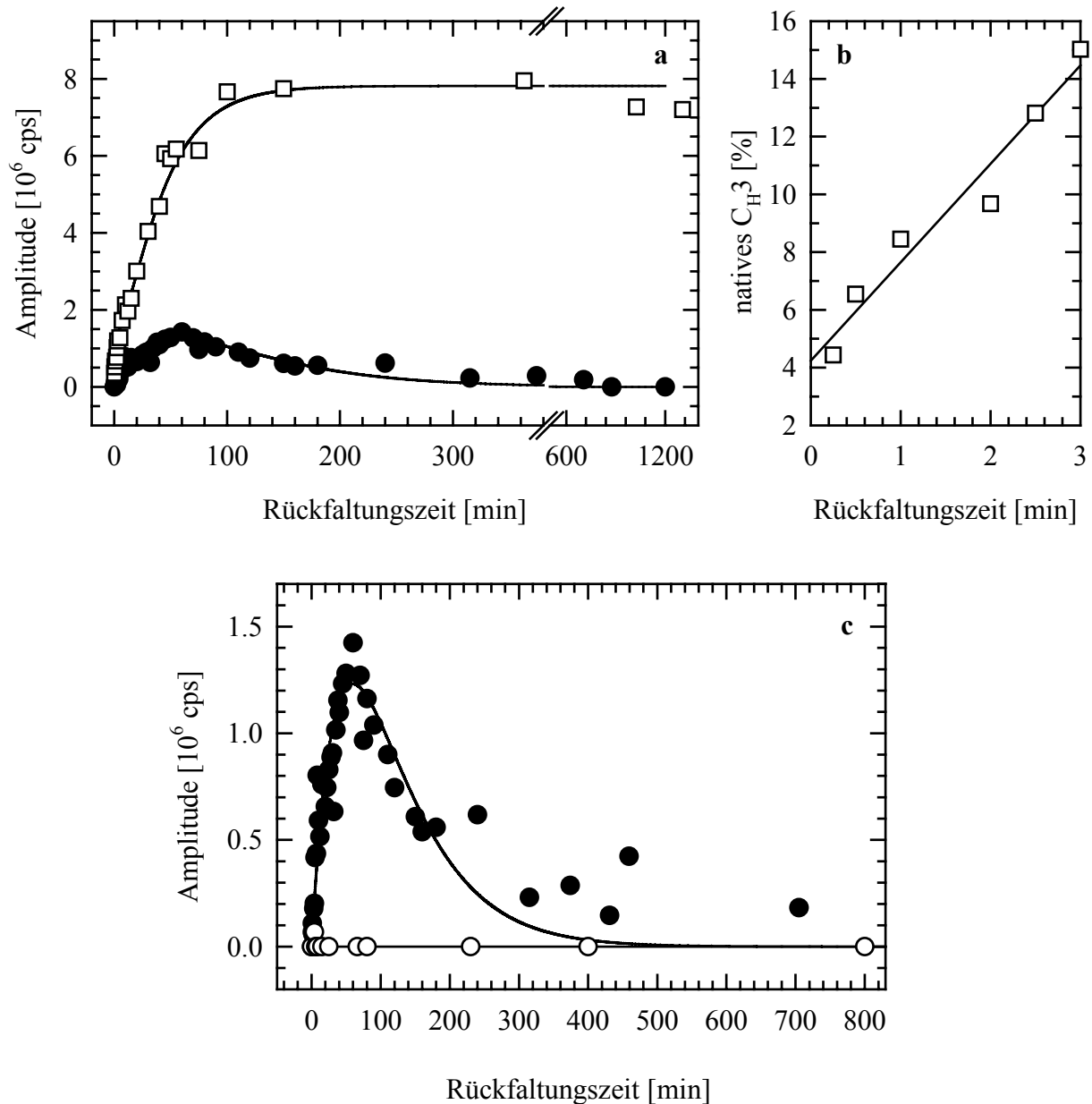


Abb. 3.3.11.: Zeitlicher Verlauf der Entstehung und des Verschwindens des C_{H3} Faltungsintermediates. Aus der Auswertung der Denaturierungskinetiken zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Faltung wurden die Amplituden der beiden Phasen gewonnen. **(a)** Natives C_{H3} (□) und Intermediat (●). **(b)** Ausschnittsvergrößerung von (a). **(c)** Intermediatsverteilung ohne (●) und mit PPI (○). Zu den experimentellen Bedingungen siehe oben Abb. 3.3.10..

Mit Hilfe eines Modells mit drei Exponentialfunktionen (Gl. 2.8.5.) konnten für die Bildung des nativen C_{H3} drei Geschwindigkeitskonstanten berechnet werden, die denen aus den Faltungskinetiken (k_{f1} , k_{f2} , k_{f3}) sehr nahe kommen: $k_{f1}^t = 1,0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_{f2}^t = 1,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $k_{f3}^t = 5,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (t steht für *triple jump*). Darüber hinaus war zu beobachten, dass natives Protein bereits in der Totzeit der Messung gebildet wurde (Abb. 3.3.11.a; vgl. 3.3.2.2.).

Das Faltungsintermediat von C_{H3} wurde mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_b^i = 4,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (b steht für Bildung des Intermediates) gebildet und verschwand mit einer Reaktion, deren Konstante mit $k_v^i = 5,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ war (v für das Verschwinden; Gl. 2.8.6.). Beide erhaltenen Konstanten können aufgrund ihrer Werte den beiden langsamen Phasen der Renaturierung von C_{H3} (k_{f2} , k_{f3}) zugeordnet werden (Abb. 3.3.11.a; vgl. 3.3.2.2.).

Um näher einzugrenzen, welche der langsamen Faltungsphasen von C_{H3} der Prolin-Isomerisierung zuzuordnen ist, wurden die *triple jump*-Experimente in Anwesenheit von PPI wiederholt (Abb. 3.3.11.c). Es zeigte sich, dass unter dem Einfluss dieses Enzyms nur ein geringer Anteil des Intermediates nachgewiesen werden konnte. Zudem war die maximale Anreicherung bereits nach 5 min erreicht (ohne PPI: 60 min). Es erfolgte also die Beschleunigung des Prozesses, der für das Verschwinden des Intermediates und die Weiterreaktion zum nativen Zustand verantwortlich zeigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Hauptfaltungsweg von C_{H3} ein Intermediat beinhaltet, das aufgrund der nachfolgenden langsamen Isomerisierung der F₃₄-P₃₅-Peptidbindung in die native *cis*-Konfiguration populierte wird. Daneben existiert aber auch ein schneller Faltungsweg (k_{f1} bzw. k_{f1}^t) der nicht über das oben beschriebene Faltungsintermediat verläuft.

Im Fall von C_{H2} ließ sich kein Intermediat mit der oben beschriebenen Methode finden. Die schnelle Entfaltung sowie der hohe Signalverlust bei diesem Vorgang (siehe 3.3.1.) erschwerten die Untersuchung zusätzlich.

3.3.5. Assoziation

Bei der C_{H2}-Domäne spielen Assoziationsvorgänge während der Faltung wegen ihres monomeren Zustandes keine Rolle. Deswegen konzentriert sich dieser Abschnitt ganz auf C_{H3}.

Da die C_{H3}-Domäne des monoklonalen Antikörpers MAK33 im nativen Zustand als Dimer vorliegt, stellte sich die Frage, wann während der Faltung die Assoziation der Monomere stattfindet. Wie oben schon erwähnt (3.3.2.2.), konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Faltungskinetiken mittels Fluoreszenzspektroskopie nicht nachgewiesen werden (Mayer, 1998). Der Grund dafür könnte einerseits darin liegen, dass die Dimerisierung in der Faltung von C_{H3} kein geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist. Andererseits ist es möglich, dass dieser Vorgang mit den zuvor benutzten Techniken überhaupt nicht nachweisbar ist. Aus diesen Überlegungen heraus wurde versucht, die Assoziation von C_{H3} mittels chemischer Quervernetzung zu untersuchen. Die quervernetzten Proben wurden anschließend mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.3.12.a). Die Analyse der Gelbanden erfolgte densitometrisch. Für die Bildung des C_{H3}-Dimers wurde mit $k_a = 2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ eine Geschwindigkeitskonstante ermittelt, mit der auch das Verschwinden des Monomers beschrieben werden konnte (Abb. 3.3.12.b). Diese Konstante war ebenfalls wie die spektroskopisch für die Renaturierung ermittelten von der Proteinkonzentration unabhängig.

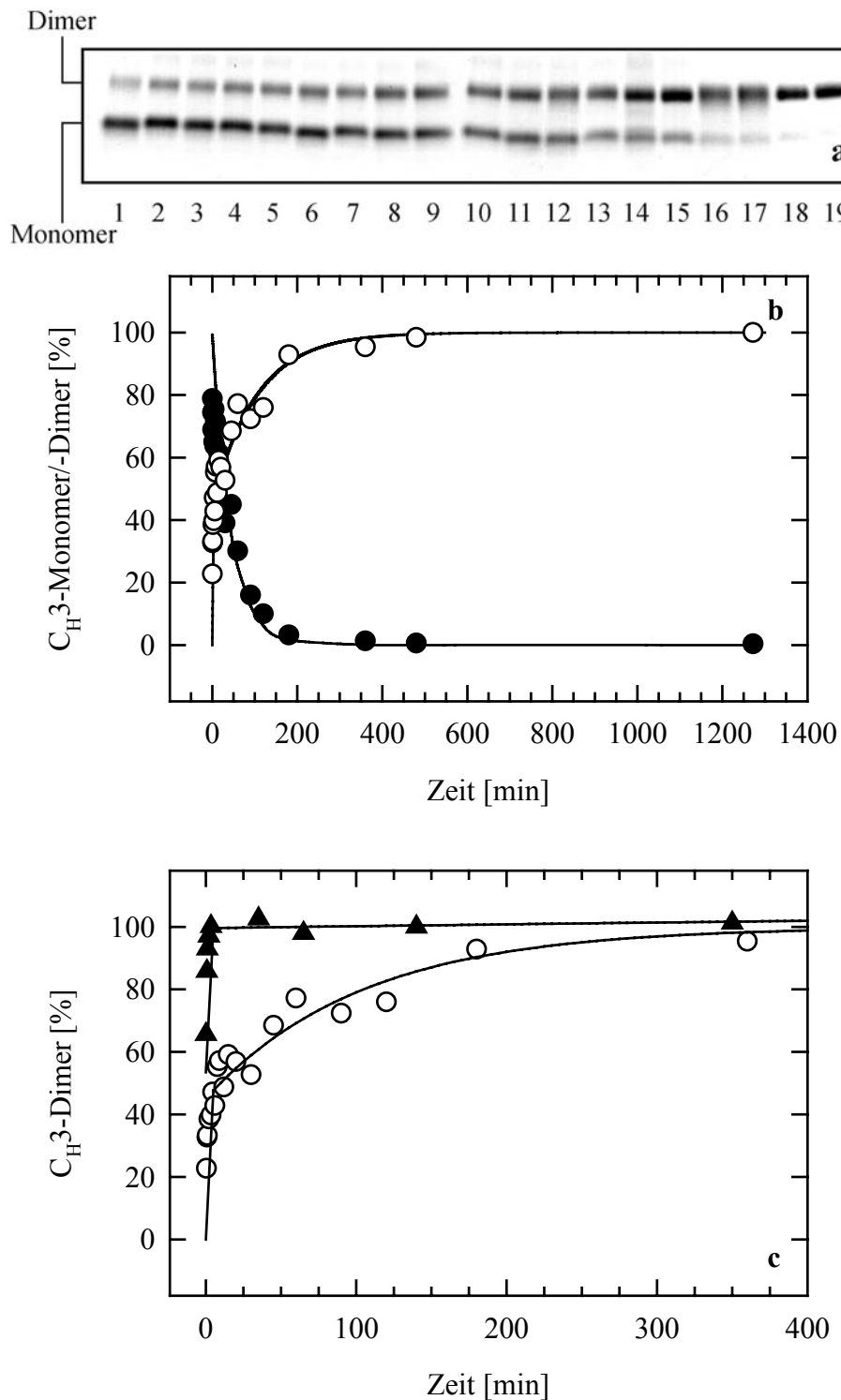


Abb. 3.3.12.: Dimerisierung von C_H3 während der Rückfaltung. Die Rückfaltung fand in 50 mM Hepes, pH 8 bei 4 °C statt. Die Proteinkonzentration war 7,5 µg/ml (0,3 µM Dimer). Während der Faltung wurden 5 µg Protein entnommen, mit Glutaraldehyd quervernetzt und gefällt. **(a)** SDS-Gel, gefärbt nach Fairbanks. **(b)** Zeitlicher Verlauf der Bildung von dimerem C_H3 (○) und des Verschwindens des Monomers (●). **(c)** Einfluss von PPI auf die Dimerisierung von C_H3: ohne PPI (○) und mit PPI (▲).

PPI beschleunigt bei C_{H3} die Weiterreaktion eines sich durch die sonst langsame Prolin-Isomerisierung anhäufenden Intermediates (siehe 3.3.3. und 3.3.4.). Diese Prolin-Isomerisierung ist mit einer Faltungsreaktion gekoppelt (Mayer, 1998). Deshalb war es von Interesse zu untersuchen, ob sich diese auf den Dimerisierungsprozess von C_{H3} auswirkt. Aus diesen Überlegungen heraus wurde das Quervernetzungsexperiment bei Anwesenheit eines 5-fachen molaren Überschusses an PPI wiederholt. Es wurde gefunden, dass die Dimerisierung unter dem Einfluss von PPI enorm beschleunigt wird (Abb. 3.3.12.c). Wegen der geringen Anzahl an Datenpunkten am Anfang der Reaktion war eine genaue mathematische Auswertung nicht möglich. Eine Abschätzung jedoch ergab, dass die Monomere 20-mal schneller zum Dimer assoziieren als in Abwesenheit von PPI. Somit ist die Prolin-Isomerisierung als Voraussetzung für die Dimerisierung von C_{H3} geschwindigkeitsbestimmend. Darüber hinaus konnte der Isomerisierung die Geschwindigkeitskonstante k_{F} zugeordnet werden (siehe 3.3.2. und 3.3.3.).

3.3.6. Faltung und Oxidation

C_{H2} und C_{H3} sind Proteine, die im nativen Zustand jeweils eine Disulfidbrücke aufweisen. Diese, die beiden β -Faltblätter verknüpfende kovalente Verbindung hat nicht nur einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinstabilität, sondern beeinflusst auch die Faltung nachhaltig.

Die rekombinante C_{H2}-Domäne, die sich im oxidierten Zustand schon durch eine geringe Stabilität auszeichnet, entfaltet bei Reduktion der Disulfidbrücke vollständig (siehe 3.2.2.). Eine Reaktivierung aus diesem Zustand war selbst unter oxidierenden Bedingungen mit den hier angewandten Methoden nicht möglich.

Dagegen gelang es, C_{H3} aus dem denaturierten und reduzierten Zustand wieder in die oxidierte native Form zu überführen. Nach dem Verdünnen in Nativpuffer wurde die

Ausbildung der Disulfidbrücke durch ein Redoxsystem, bestehend aus reduziertem und oxidiertem Glutathion, gefördert. Auffällig war, dass die Reaktion erst nach 12 Stunden beendet schien. Der nachfolgende Signalverlust ist dem auftretenden *photobleaching* der Chromophore zuzuschreiben.

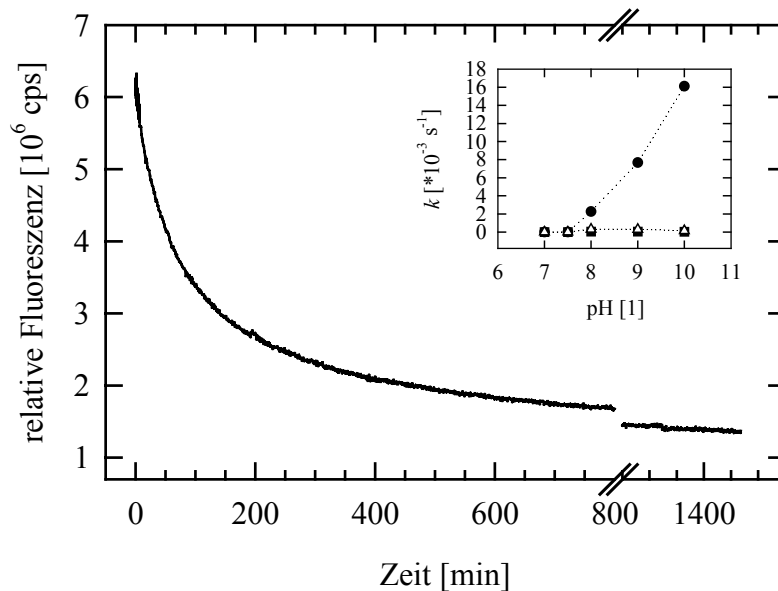


Abb. 3.3.13.: Fluoreszenzkinetik der Oxidation und Faltung von C_{H3} . Gemessen wurde bei 355 nm (Anregung 280 nm). Die Proteinkonzentration war 7,5 $\mu\text{g/ml}$ (0,3 μM Dimer) in 0,1 M Tris/HCl, pH 8, 3 mM GSSG, 6 mM GSH, 4 °C. Kleines Bild: Die Abhängigkeit der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten vom pH-Wert: k_{fo1} (●), k_{fo2} (■), k_{fo3} (Δ).

Die Kinetik konnte mit drei Exponentialfunktionen nach Gl. 2.8.5. analysiert werden (Abb. 3.3.13.). Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten hatten die Werte $k_{fo1} = 2,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $k_{fo2} = 3,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $k_{fo3} = 5,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (fo steht für Faltung und Oxidation). Da der gemessene Signalverlauf zum einen durch den zunehmenden *quenching*-Effekt der sich ausbildenden Disulfidbrücke, zum anderen durch die Änderung der molekularen Umgebung der Tryptophane verursacht wird, sind die Konstanten nicht mit denen aus der Faltung von C_{H3} vergleichbar. Um eine der Geschwindigkeitskonstanten der Oxidation von C_{H3} zuordnen zu können, wurden die Kinetiken bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen (Abb. 3.3.13., kleines Bild). Eindrucksvoll zeigte sich, dass k_{fo1} bei Erhöhung des pH-Wertes stetig zunahm,

während die anderen Geschwindigkeitskonstanten kaum beeinflusst wurden. Unterhalb von pH 8 wurde keine Oxidation beobachtet. Dagegen beeinflusste die Variation des GSH/GSSG-Verhältnisses die Geschwindigkeit der Kinetik nicht (Abb. 3.3.14.).

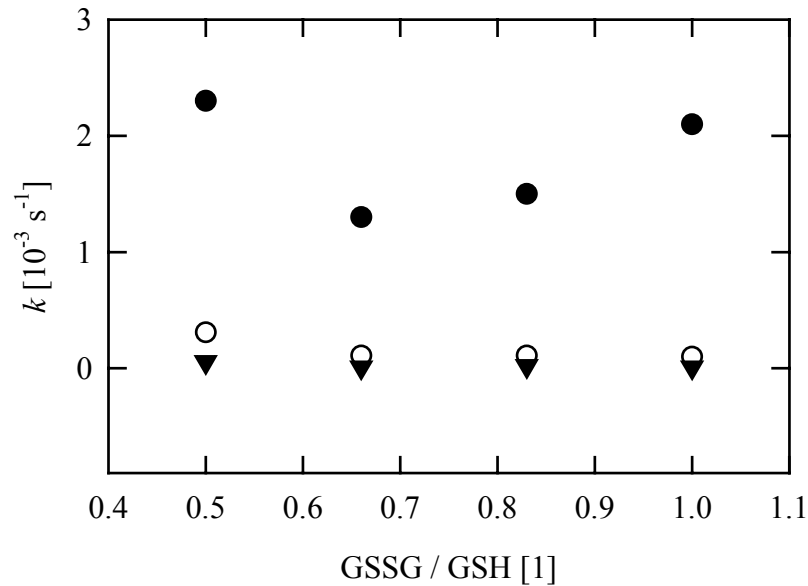
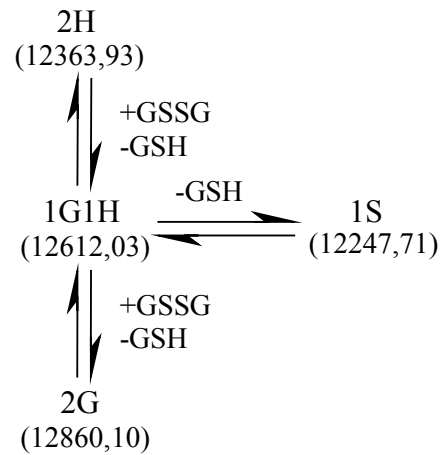


Abb. 3.3.14.: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten vom Verhältnis GSSG / GSH. Die Bedingungen der einzelnen Messungen sind oben beschrieben (Abb. 3.3.13.). k_{f01} (●), k_{f02} (○) und k_{f03} (▼).

Die Ausbildung der Disulfidbrücke in C_{H3} wurde direkt mittels Massenspektrometrie verfolgt (Abb. 3.3.15.). Die Rückfaltung und Oxidation fand unter den gleichen Bedingungen wie bei den Fluoreszenzmessungen statt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die zu diesem Zeitpunkt freien Cysteine mit Iodacetamid derivatisiert. Anhand theoretischer Überlegungen stehen die verschiedenen Oxidationstufen der C_{H3} -Domäne, die sich nun hinsichtlich ihrer Masse unterscheiden, in folgender Beziehung zueinander, wie in Gl. 3.3.2. dargestellt.



Gl. 3.3.2.: Modell der Oxidation von C_{H3}. Reduziertes C_{H3} (2H), gemischtes Disulfid (1G1H) mit oxidiertem Glutathion (GSSG), Addukt mit zwei Molekülen GSSG (2G) und vollständig oxidiertes C_{H3} (1S). GSH steht für die reduzierte Form von Glutathion. Die Werte in Klammern sind die massenspektrometrisch bestimmten Massen. $M_r(\text{GSH}) = 307,3$; $M_r(\text{IAA}) = 184,96$.

Ausgehend vom reduzierten Protein (2H, beide Cysteine in der Thiol-/Thiolatform) wird ein gemischtes Disulfid mit oxidiertem Glutathion (GSSG) gebildet (1G1H), das anschließend auf zwei Arten weiterreagieren kann. Zum einen kann ein zweites Molekül GSSG an das verbliebene freie Cystein binden und die Spezies 2G bilden. Der andere Weg stellt jedoch den produktiven Weg zur Bildung von oxidiertem C_{H3} (1S) dar. Hier reagiert das gemischte Disulfid des einen Cysteins mit dem freien zweiten Cystein unter Freisetzung von reduziertem Glutathion (GSH). Die reaktive Gruppe ist bei diesem Vorgang das Thiolat-Anion, weshalb auch verständlich ist, warum unterhalb von pH 8 keine Oxidation mehr stattfindet (Abb. 3.3.13.; der pK_a -Wert der Thiol-Gruppe in Cystein hängt von der molekularen Umgebung im Protein ab. Gewöhnlich ist er zwischen 9 und 9,5). Acyliert werden die frei vorliegenden Cysteine.

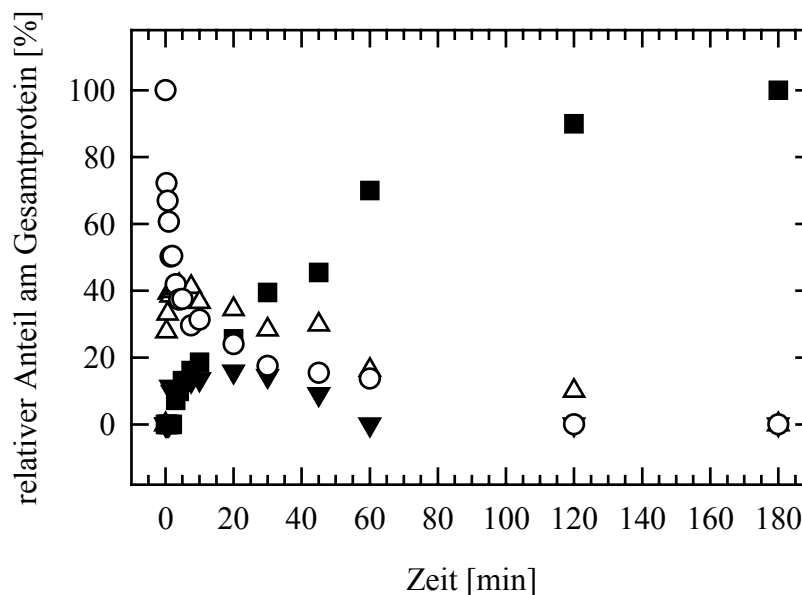


Abb. 3.3.15.: Oxidation und Faltung von C_{H3}. Die Pufferbedingungen waren 0,1 M Tris/HCl, pH 8, 3 mM GSSG, 6 mM GSH, 3 mM DTT_{ox}, 4 °C. Die Proteinkonzentration war 7,5 µg/ml (0,6 µM). Nach Derivatisierung der freien Cysteine mit Iodacetamid wurde die Zusammensetzung des Proteingemisches mittels ESIMS analysiert: (○) 2H-Spezies, (△) 1G1H, (▼) 2G und (■) 1S.

Die Analyse der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zu unterschiedlichen Zeitpunkten lieferte folgendes Resultat (Abb. 3.3.15.): Der Anteil des reduzierten C_{H3} verringerte sich zu Anfang gegenüber der Entstehung der oxidierten Form ($k = 1,3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) relativ schnell ($k = 2,8 \text{ s}^{-1}$). Dieses ist auch nachzuvollziehen, da zuerst das Intermediat 1G1H gebildet wird. Die Spezies 2G und 1S wurden nach einer kurzen *lag*-Phase zunächst gleich schnell gebildet. Die Intermediate waren nach 5 min (1G1H) bzw. 20 min (2G) maximal populiert. Die Oxidation von C_{H3} dauerte insgesamt drei Stunden (100 % 1S).

Für die Oxidation der reduzierten C_{H3}-Domäne ist es günstig, wenn die die Disulfidbrücke bildenden Cysteinreste in der Proteinstruktur nahe beieinander sind. Auf der anderen Seite kann das Vorhandensein von Sekundär- und Tertiärstruktur für die Oxidation auch hinderlich sein, da der Zugang des Lösungs- und damit des Oxidationsmittels zum Reaktionsort eingeschränkt ist (Wedemeyer *et al.*, 2000).

Um dieses zu untersuchen, wurde denaturiertes, reduziertes C_{H3} unter Bedingungen, die die Ausbildung der Disulfidbrücke verhindern, zurückgefaltet. Anschließend wurde die Oxidation durch Zugabe von GSSG gestartet.

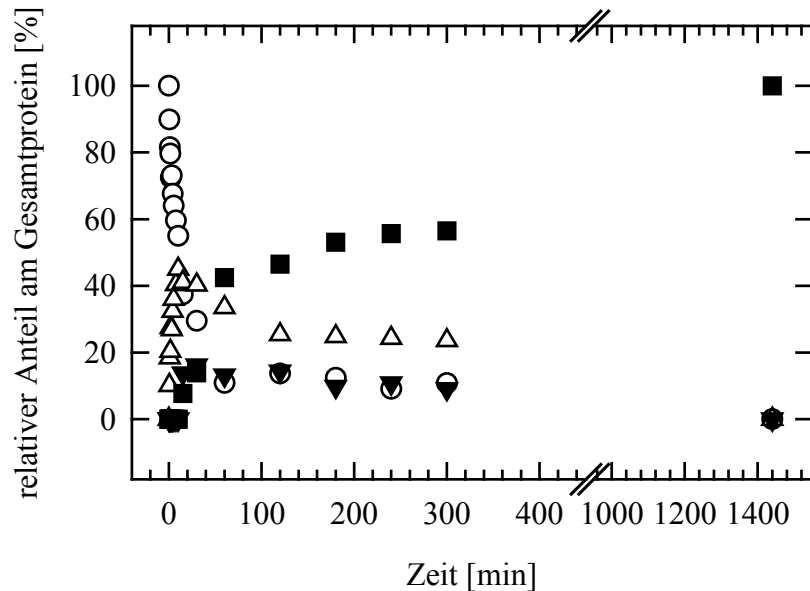


Abb. 3.3.16.: Oxidation von C_{H3} nach der Rückfaltung. Das Protein wurde zunächst unter reduzierenden Bedingungen für drei Stunden zurückgefaltet. Anschließend wurde durch Zugabe von GSH/GSSG die Oxidation gestartet. Zu den genauen Bedingungen siehe oben Abb. 3.3.15.. (○) 2H-Spezies, (Δ) 1G1H, (▼) 2G und (■) 1S.

Abb. 3.3.16. zeigt deutlich, dass die Ausbildung bzw. das Vorhandensein von Sekundär- und Tertiärstruktur großen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Oxidation von C_{H3} hat. Wurde die Oxidation des Proteins eingeleitet, nachdem der Strukturbildungsprozess abgeschlossen war, vollzog sich dieser Vorgang wesentlich langsamer. Andererseits war die räumliche Nähe der Cysteine eine Voraussetzung für die effiziente Ausbildung der Disulfidbrücke der C_{H3}-Domäne. Wurde das Experiment in Anwesenheit von 1 M GdmCl durchgeführt, stellte sich ein Gleichgewicht zwischen den vier Oxidationstufen des Proteins ein. Der Anteil von nativem, oxidiertem C_{H3} überstieg nie 40 % (F. Talamo, pers. Mitteilung).

4. Diskussion

4.1. Struktur

Antikörper sind eine Familie von Plasmaproteinen, deren grundlegender Baustein – die Immunoglobulin-Domäne – in unterschiedlichen Formen in vielen weiteren Proteinen des Immunsystems wie auch anderer biologischer Erkennungssysteme vorkommt (Janeway & Travers, 1997). Antikörper selbst sind aus zwei verschiedenen Arten von Immunoglobulin-Domänen aufgebaut. Diese erfüllen unterschiedliche Funktionen: Über die variablen Domänen (V-Domänen) erfolgt die Antigenerkennung und -bindung. Die konstanten Domänen (C-Domänen) erfüllen eine Effektorfunktion, die andere Moleküle und Zellen des Immunsystems mobilisiert, wenn der Antikörper an das Pathogen gebunden hat (Janeway & Travers, 1997). Darüber hinaus stabilisieren sie den Antikörper durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Domänen.

Die konstanten Domänen sind evolutionär eng verwandte Proteine, die durch Genduplikation entstanden sind (Davies & Metzger, 1983). Trotzdem weisen die Domänen C_{H2} und C_{H3} nur noch 39,4 % Homologie bzw. 24,2 % Identität zueinander auf. Es erfolgten aber vorwiegend konservative Aminosäureaustausche, die das Verhältnis von hydrophilen zu hydrophoben bzw. basischen zu sauren Resten weitgehend unangetastet lassen. Auch die Tryptophane sind konserviert und verleihen beiden Proteinen durch ihre Nähe zur Disulfidbrücke bzw. ihre Lösungsmittelzugänglichkeit die charakteristischen spektroskopischen Eigenschaften. Die Position der die Disulfidbrücke bildenden Cysteine ist identisch. Dieses weist auf die Wichtigkeit dieser kovalenten Verbindung für die Stabilität dieser Faltungseinheit (Janeway & Travers, 1997; Goto & Hamaguchi, 1979; Rudikoff & Pumphrey, 1986; Frisch *et al.*, 1996; Bell, 1997; Proba *et al.*, 1997; Wörn & Plückthun, 1998).

Das Erlangen der nativen Konfiguration von Peptidyl-Prolyl-Bindungen ist bei der Proteinfaltung oft ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt, da deren Isomerisierung eine hohe Aktivierungsenergie erfordert (Schmid, 1993). Die Aminosäuresequenzen von C_{H2} und C_{H3} sind reich an Prolinen (9,1 % bzw. 8,3 %), wobei einige aufgrund des vorangehenden Restes im nativen Protein in der *cis*-Konfiguration vorliegen können (Reimer *et al.*, 1998). Bei C_{H2} liegen diese jedoch in relativ flexiblen Bereichen in N- und C-terminalen Regionen des Proteins. Es ist also unwahrscheinlich, dass die *trans*→*cis*-Isomerisierung der entsprechenden Peptidbindung einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit der C_{H2}-Faltung hat. Dagegen weist C_{H3} in seiner nativen Konformation - die Kristallstruktur von C_{H3} konnte mit einer Auflösung von 2,2 Å gelöst werden (Thies *et al.*, 1999) - ein *cis*-Prolin (Pro35) auf, dessen Isomerisierung ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Faltung von C_{H3} ist (Mayer, 1998). Dieser ist aufgrund seiner Sequenzposition in einem *loop* zwischen den beiden β-Faltblättern ein integraler Bestandteil der Proteinstruktur und beeinflusst die Bildung des *immunoglobulin fold* in besonderem Maße. Pro35 bildet in *cis*-Position eine Wasserstoffbrücke mit dem Rest His90 aus und stabilisiert so das β-Faltblatt. In der *trans*-Konfiguration besteht diese Verbindung nicht.

Der *immunoglobulin fold* ist bei C_{H2} und C_{H3} unterschiedlich kompakt ausgebildet. Die Kristallstruktur zeigt, dass C_{H3} ein globuläres Protein ist, dessen hydrophobe Reste im Inneren des Proteins verborgen sind. Besonders die Assoziation der C_{H3}-Monomere zu einem Dimer trägt hierzu bei. Dagegen sind bei rekombinantem C_{H2} hydrophobe Reste dem Lösungsmittel zugewandt. Die Form des Proteins scheint gestreckter als das C_{H3}-Monomer. Hier macht sich der Verlust des Zuckerrestes gegenüber authentischem MAK33-C_{H2} bemerkbar, der hydrophobe Bereiche abzuschirmen vermag und die Interaktion zwischen den beiden schweren Ketten des Antikörpers im Bereich dieser Domäne sicherstellt (Deisenhofer, 1981).

4.2. Stabilität

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten deutlich, dass die Stabilität der Antikörperdomänen stark von der Assoziation abhängig ist. Im Antikörper werden die Untereinheiten und damit das gesamte Immunglobulin-Molekül dadurch stabilisiert, dass Heterodimere (im Fall des Fv- bzw. des Fab-Fragmentes) sowie Homodimere (C_{H3} bzw. Fc) ausgebildet werden. Unterstützt wird die Assoziation durch intermolekulare Disulfidbrücken (Alzari *et al.*, 1988). So ergaben Untersuchungen an dem scFv-Fragment des Antikörpers hu4D5-8, dass die Aggregation verhindert wird, wenn die instabilen, disulfidfreien Domänen soweit gefaltet sind, dass über die ausgebildete Kontaktfläche die beiden Untereinheiten miteinander interagieren können (Ramm *et al.*, 1999). Eine zusätzlich, zwischen konservierten *framework*-Positionen der V_L - und V_H -Domäne eingeführte Disulfidbrücke kann das Heterodimer weiter stabilisieren (Reiter *et al.*, 1995). Aus dem obengenannten Grund unterscheiden sich monomeres C_{H2} und dimeres C_{H3} deutlich in ihrer Stabilität gegenüber chemischer und thermischer Denaturierung. Beide zeigen einen kooperativen GdmCl-Denaturierungsübergang, der keine Gleichgewichtsintermediate erkennen lässt und deshalb nach dem Zwei-Zustands-Modell ausgewertet werden kann. Die Entfaltung von C_{H3} ist, wie erwartet, konzentrationsabhängig. Untersuchungen an einer humanen C_{H3} -Domäne ergaben das gleiche Ergebnis (Isenman *et al.*, 1979; Sumi & Hamaguchi, 1982). Für die C_{H3} -Domäne des Antikörpers MAK33 wurde ein freie Stabilisierungsenthalpie von $\Delta G_{U \rightarrow N}^0 = -66,5 (\pm 1,5) \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet (Mayer, 1998). Damit liegt der Wert im Bereich von -42 und -113 kJ mol^{-1} , der typisch für dimere Proteine ist (Neet & Tim, 1994). Die Stabilität von MAK33- C_{H2} liegt dagegen bei einem Wert von $\Delta G_{U \rightarrow N}^0 = -11,2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Auch im Vergleich zu C_L - und V_L -Domänen, die ebenfalls als Monomer auftreten, ist C_{H2} ein instabiles Protein (Sumi & Hamaguchi, 1982; Rowe & Tanford, 1973) (Tab. 4.2.1.). Rekombinantes C_{H2} zeigt hydrophobe Bereiche, die sonst von dem verknüpften Oligosaccharidrest verdeckt werden

(Edelmann & Gall, 1969; Deisenhofer, 1981), und nun lösungsmittlexponiert vorliegen. Das Abschirmen einer großen hydrophoben Oberfläche durch die Assoziation der beiden C_{H3}-Monomere bringt einen zusätzlichen entropischen Beitrag zur freien Stabilisierungsenthalpie. Wird die Dimerisierung durch Mutationen in der Dimerkontaktfläche gestört, wirkt sich dieses negativ auf die Stabilität des Proteins aus (Dall'Acqua *et al.*, 1998).

	C _{H2} _{red}	C _{H2} _{ox}	C _{H3} _{red} ^{a*}	C _{H3} _{ox} ^{b*}	C _L _{red} ^c	C _L _{ox} ^c
C_m [M GdmCl]	-	1,1	0,3 (0,2 μM) 0,31 (1,6 μM) 0,35 (4,1 μM)	0,75 (0,2 μM) 0,9 (1,6 μM) 1 (4,1 μM)	0,4	1,2
ΔG⁰_{U→N} [kJ mol⁻¹]	0	-11,2	-	-66,5	-7,1	-23,8
Reversibilität [%]	-	100	50-60	100	-	-
Assoziations- zustand	-	Monomer	Dimer	Dimer	Monomer	Monomer

Tab. 4.2.1.: Stabilitätsdaten verschiedener Antikörperdomänen, gewonnen aus GdmCl-induzierten Gleichgewichtsdenaturierungsübergängen. ^a Bell, 1997; ^b Mayer, 1993; ^c Goto & Hamaguchi, 1979. * Konzentrationsangaben gelten für das Dimer.

Die Stabilität von teilgefalteten Proteinstrukturen, wie des *molten globule* und des *alternatively folded state*, spielt eine wichtige Rolle bei dem Versuch, Modelle zur Beschreibung des Faltungsweges von Proteinen aufzustellen. Diese Konformationen sind sowohl in thermodynamischen als auch in kinetischen Experimenten zur Proteinfaltung gefunden worden (Mann & Matthews, 1993; Ptitsyn & Uversky, 1994; Oliveberg & Fersht, 1996). Entsprechend dieser vom denaturierten Zustand ausgehenden Faltungsmodelle stellt der *molten globule* das erste Faltungsintermediat dar, das aufgrund von Sekundärstrukturbildung und Kompaktierung der Polypeptidkette gebildet wird (Ikeguchi *et al.*, 1986; Roder *et al.*, 1988; Kuwajima, 1989). Es steht im Gleichgewicht mit dem denaturierten

Zustand. Der *molten globule* wie auch der *a state* (eine Säure-induzierte *molten globule*-Struktur) sind jedoch instabile Proteinkonformationen. Anders verhält es sich bei Antikörpern, die bei pH-Werten unter pH 3 eine nicht-native, aber stabile Struktur annehmen können (Buchner *et al.*, 1991; Vlasov *et al.*, 1996; Welfle *et al.*, 1999). Diese wird oft als *alternatively folded state* bezeichnet (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995; Mayer, 1998; Kammermeier, 1999). Der Zustand des *alternatively folded state* ist durch Sekundärstrukturelemente sowie den Verlust an Tertiärstruktur gekennzeichnet. Nichtsdestotrotz zeigt diese Proteinkonformation hochkooperative thermische und chemische Entfaltungsübergänge. Für den *a state* wird dieses Verhalten dagegen nicht beobachtet.

Ein interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist, dass oligomeres, unter sauren Lösungsmittelbedingungen gebildetes C_{H3} eine Stabilität aufweist, die mit der des nativen Proteins vergleichbar ist, ja sie sogar übersteigt (Tab. 4.2.2.). So entfaltet sogenanntes *alternatively folded* C_{H3} bei 80 °C, während C_{H3} bei pH 8 seinen T_m -Wert bei 75 °C hat (Kammermeier, 1999). Hier scheint die Oligomerisierung, vermittelt über hydrophobe Wechselwirkungen, stabilisierend zu wirken. Das Fab-Fragment von MAK33 hält bei pH 2 seine alternativ-gefaltete Struktur nur aufrecht, wenn aufgrund von Domänenkontakten zwischen der schweren und der leichten Kette die Assoziation zum Heterodimer möglich ist. Dieses wird hier durch die intermolekulare Disulfidbrücke gewährleistet (Lilie & Buchner, 1995). Monomeres C_{H2} hingegen liegt unter vergleichbaren Bedingungen vollständig entfaltet vor. Es zeigt sich, dass die Ausbildung einer Quartärstruktur eine Voraussetzung für die Stabilität des *alternatively folded state* ist. Im Fall von C_{H3} reichen die starken hydrophoben Wechselwirkungen aus, um eine Quartärstruktur aufrecht zu erhalten. Das Fab-Fragment ist auf eine zusätzliche kovalente Verknüpfung angewiesen.

C_{H2} entfaltet unter *alternatively folded state*-Bedingungen. Für die leichte Kette des Antikörpers MAK33 wurde ebenfalls berichtet, dass das Protein unter diesen Bedingungen

denaturiert. Die Ausbildung der alternativen Konformation war jedoch möglich, nachdem entweder die Ionenstärke der Lösung erhöht oder die intramolekularen Disulfidbrücken reduziert worden waren (H. Lilie, pers. Mitteilung). Durch die Reduktion der Disulfidbrücke wird die konformationelle Freiheit der Polypeptidkette erweitert, wodurch ein Umfalten erleichtert wird. Säuredenaturiertes C_{H2} konnte auf diesem Weg aber nicht in eine gefaltete Konformation überführt werden. Um unter diesen Lösungsmittelbedingungen eine gefaltete Struktur aufrecht zu erhalten, darf die Stabilität des nativen Proteins anscheinend einen bestimmten Wert nicht unterschreiten.

	C _{H3} _{ox} ^{a*}	C _{H3} _{afs} [*]
C _m [M GdmCl]	0,75 (0,2 μM)	1,0 (0,8 μM)
	0,9 (1,6 μM)	1,7 (4,1 μM)
	1 (4,1 μM)	1,7 (8,2 μM)
ΔG ⁰ _{U→N} [kJ mol ⁻¹]	-66,5	-
Reversibilität [%]	100	70
Assoziationszustand	Dimer	12-14

Tab. 4.2.2.: Ein Vergleich der Stabilitätsdaten von nativem C_{H3} (C_{H3ox}) und C_{H3} im *alternatively folded state* (C_{H3afs}). ^a Mayer, 1993. Berechnet wurden die Daten aus GdmCl-induzierten Gleichgewichtsdenaturierungsübergängen. ^{*} Dimerkonzentrationen.

Die intramolekulare Disulfidbrücke der Antikörperdomänen kann ein einschränkender Faktor beim Umfalten eines Proteins von der einen Konformation in die andere sein. Auf der anderen Seite ist diese kovalente Verbindung ein Garant für die Stabilität dieser Faltungseinheiten (Goto & Hamaguchi, 1979; Rudikoff & Pumphrey, 1986; Frisch *et al.*, 1996; Bell, 1997; Proba *et al.*, 1997; Wörn & Plückthun, 1998). C_{H3} toleriert die Reduktion der Disulfidbrücke. Das reduzierte Protein besitzt dann allerdings eine leicht veränderte Sekundärstruktur, bildet jedoch nach wie vor Dimere (Bell, 1997). Im Vergleich zur oxidierten Form von C_{H3} ist die Stabilität gegenüber GdmCl deutlich herabgesetzt (Tab.

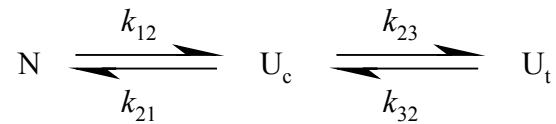
4.2.1.). Auch ging die Konzentrationsabhängigkeit der Entfaltung weitgehend verloren, was darauf hindeutet, dass der Beitrag der Dimerisierung zur Stabilität von reduziertem C_{H3} wesentlich geringer ist. Womöglich bewirkt die abgewandelte Sekundärstruktur eine Veränderung der Dimerkontaktfläche, so dass die Wechselwirkungen zwischen den C_{H3}-Monomeren nicht mehr so intensiv sind wie bei intakter Disulfidbrücke. Bei der monomeren C_{H2}-Domäne, die im oxidierten Zustand geringe thermodynamische Stabilität aufweist, führt die Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücke zum totalen Strukturverlust. Die ebenfalls monomere C_L-Domäne zeigt dagegen in ihrer reduzierten Form eine unveränderte Sekundärstruktur. Allerdings ist dieses Protein im oxidierten Zustand wesentlich stabiler als C_{H2}, so dass der Stabilitätsverlust durch die Reduktion der Disulfidbrücke kompensiert werden kann (Goto & Hamaguchi, 1979) (Tab. 4.2.1.).

Der Stabilitätsvergleich der beiden strukturell homologen Antikörperdomänen C_{H2} und C_{H3} zeigt, wie sehr die konformationelle Stabilität von der Minimierung hydrophober Oberflächen und damit dem Entropiegewinn abhängt. Zum einen wird dieses durch die Ausbildung einer Quartärstruktur erreicht, zum anderen durch das Verbergen hydrophober Reste im Inneren des Proteins. Fehlt wie im Fall von C_{H2} mit dem Zuckerrest ein integraler Bestandteil der Struktur, zieht dieses einen beträchtlichen Stabilitätsverlust nach sich. Ein Vergleich mit authentischem C_{H2} ist deshalb in Zukunft noch vorzunehmen, um aus dem Vergleich mit rekombinantem C_{H2} aus *E.coli* den Stabilitätsbeitrag des Zuckerrestes zu gewinnen.

4.3. Faltung

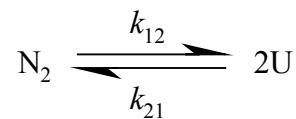
In der vorliegenden Arbeit wurde der Faltungsprozess der C_{H2} und der C_{H3}-Domäne des Antikörpers MAK33 untersucht. Diese kleinen Proteine stellen interessante Modelle für die β -Faltblattfaltung und – im Fall von C_{H3} – Assoziation dar. Aber auch die Entfaltung von C_{H2} und C_{H3} birgt interessante Aspekte.

Die Denaturierung der beiden Proteine verläuft unterschiedlich. Der Entfaltungsvorgang von C_{H2} gleicht einem „Sprengen“ der nativen Konformation. Bei Kontakt mit dem Denaturierungsmittel (GdmCl) verliert das Protein schlagartig über 50 % seiner Struktur mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k > 2000 \text{ s}^{-1}$. Der gesamte Prozess ist innerhalb von 50 s abgeschlossen, was die kinetische Instabilität der C_{H2}-Domäne aufzeigt. Dieses Verhalten gleicht dem des C_L-Fragmentes des Bence-Jones-Proteins Nag (leichte Immunoglobulinkette vom Typ λ) (Goto & Hamaguchi, 1982a). Allerdings sind hier 100 % der Signaländerung mit spektroskopischen Mitteln erfassbar. Wie bei C_L ist die Entfaltung von C_{H2} bei geringen GdmCl-Konzentrationen nur mit einer zweiphasigen Kinetik beschreibbar (Pirkl, 1996). Mit steigender Konzentration des Denaturierungsmittels nimmt die Amplitude der langsamen Phase kontinuierlich ab. Oberhalb von 1,8 M GdmCl ist sie nicht mehr nachweisbar. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der beiden Phasen sind abhängig von der GdmCl-Konzentration. Nach einem theoretischen Modell, das bereits bei RNase A Anwendung fand (Hagerman & Baldwin, 1976), lässt sich dieses Verhalten damit erklären, dass C_{H2} in denaturierter Form in zwei verschiedenen Zuständen vorliegt, die sich hinsichtlich der Konfiguration von Xaa-Pro-Peptidbindungen unterscheiden. Somit tritt im Bereich niedriger GdmCl-Konzentrationen neben der Entfaltungsreaktion auch eine mit einer Faltungsreaktion gekoppelten Prolinisomerisierung als geschwindigkeitsbestimmender Vorgang in Erscheinung (auch als *kinetic coupling* bezeichnet (Kiefhaber, 1995); C_{H2} besitzt zwei potentielle *cis*-Proline).



Gl. 4.3.1.: Mechanismus der Entfaltung von C_{H2}. N steht für das native Protein (Proline in *cis*), U_c für das entfaltete Protein mit den Prolinen in nativer Konfiguration und U_t für den entfalteten Zustand mit den Prolinen in *trans*. Mit k_{xx} sind die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten bezeichnet.

Die Entfaltung von C_{H3} hingegen ist ein einphasiger Prozess (Mayer, 1993; Mayer, 1998), der mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k_e^N = 2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ wesentlich langsamer abläuft. Hier ist zu vermuten, dass die hohe Stabilität aufgrund der starken Wechselwirkungen zwischen den C_{H3}-Monomeren (Isenman *et al.*, 1979), ausschlaggebend ist. Ein Faltungsintermediat von C_{H3}, das vermutlich weitgehend nativ gefaltet, aber monomer ist, entfaltet schneller ($k_e^I = 3,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).



Gl. 4.3.2.: Mechanismus der Entfaltung von C_{H3}. N steht für das native Protein, U für den entfalteten Zustand. Der Einfluss der Prolin-Isomerisierung auf die Entfaltung ist nicht sichtbar.

β-Faltblattfaltung ist ein entropisch höchst anspruchsvoller Vorgang. Aminosäurereste, weit entfernt in der Primärstruktur, müssen miteinander in Kontakt treten, um stabilisierende Wechselwirkungen eingehen zu können (Clark *et al.*, 1997). Abhängig von der Länge der Polypeptidkette zwischen den entsprechenden Resten und somit von den Freiheitsgraden, die zur Verfügung stehen, können mehrere Versuche nötig sein, die native Konformation zu erlangen. Die Faltung von komplexen β-Faltblattstrukturen, wie dem *immunoglobulin fold* der C_{H2} und C_{H3}-Domäne, ist darum viel langsamer als die Bildung von α-Helices.

Nichtsdestotrotz werden auch hier sehr schnelle Faltungsphasen gefunden, die zum Teil in der Totzeit zeitlich hochauflösender Messmethoden stattfinden können. Diese als *burst phase* bezeichneten Faltungsphasen sind bei der Renaturierung der C_{H2}- und der C_{H3}-Domäne zu beobachten. Der Signalverlust beträgt im Fall von C_{H3} 10 % (Mayer, 1998). Ein hydrophober Kollaps als Grund dafür kann ausgeschlossen werden, da keine Bindung bzw. Freisetzung von ANS gemessen wurde. Die kleinen β -Faltblattproteine Tendamistat und CspB zeigen während der Faltung ebenfalls keinen Verlust an Signal, der auf einen solchen Kollaps schließen ließe (Schönbrunner *et al.*, 1997a; Jacob *et al.*, 1997). Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass ein hydrophober Kollaps nicht essentiell für die Proteinfaltung sein muss, was gegen das sogenannte *hydrophobic collapse model* sprechen würde (Dill, 1990; Jaenicke, 1996). Darüber hinaus ist vielfach die Signaldifferenz zwischen denaturiertem Protein und den ersten Messpunkten auf die Veränderung der Lösungsmittelbedingungen beim Verdünnen des denaturierten Proteins in den Rückfaltungspuffer zurückzuführen (Qi *et al.*, 1998). Im Fall der C_{H3}-Domäne kann der Signalverlust zu Anfang der Rückfaltung aber auch anders erklärt werden. So zeigt die Analyse der *triple jump*-Experimente, dass nach der Totzeit der Messung bereits 4 % des Proteins nativ sind. Schnelfaltende C_{H3}-Moleküle gelangen also auf einem parallelen Faltungsweg zum nativen Zustand.

Bei C_{H2} macht dieser Signalverlust 29 % der Differenz zwischen denaturiertem und nativem Zustand aus. Dieses entspricht dem häufig in der Literatur zitierten Wert für eine *burst phase* (Matthews, 1993). Die Auswertung der Renaturierungskinetiken deutet darauf hin, dass der mathematische Fit im Anfangsbereich der Kinetik leichte Abweichung von den Messdaten zeigt. Die schnelle Phase der Kinetik wird also wohl nicht voll erfasst, so dass ein Teil in der Totzeit der Messung abläuft. Zudem ergaben die N-Test-Experimente, dass zu Anfang der Messung bereits 10 % des C_{H2} in der nativen Konformation vorliegt und somit für einen Teil des Signalverlustes verantwortlich sein kann. Im Gegensatz zu C_{H3}, wo die

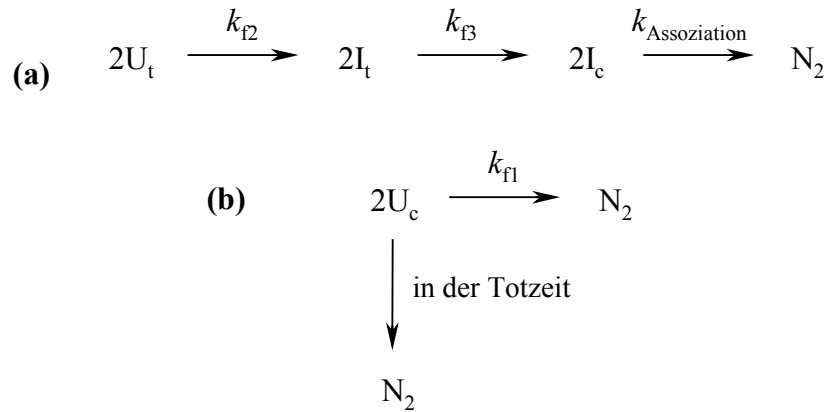
Faltungskinetiken, gemessen mit Fluoreszenz und CD, übereinstimmende Ergebnisse liefern, ist die Ausbildung der Sekundärstruktur bei C_{H2} nach der Totzeit der Messung bereits abgeschlossen ($k > 2000 \text{ s}^{-1}$). Fluoreszenzkinetiken dauern im Vergleich dazu über zwei Stunden. Eine Erklärung für diese Diskrepanz wäre, dass bei C_{H2} im ersten Schritt der Faltung die Sekundärstruktur bei gleichzeitiger Kompaktierung gebildet wird. Anschließend erfolgt die „evolutionäre“ Ausbildung der Tertiärstruktur (Nath & Udgaonkar, 1997). Die Bildung dieses Intermediates mit nativ-ähnlicher Sekundärstruktur könnte somit ebenfalls zum Signalverlust zu Beginn der Kinetik beitragen. Die Annahme eines frühen Faltungsintermediates wird auch durch das Abflachen der schnellen Faltungsphase von C_{H2} bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen untermauert (Ikai & Tanford, 1973; Tanford *et al.*, 1973; Khorasanizadeh *et al.*, 1996; Wildegger & Kiefhaber, 1997; Schönbrunner *et al.*, 1997). Ein ähnliches Szenario wird auch für RNase T₁ angenommen. Wie im Fall von C_{H2} belegen Fern-UV-CD-Messungen, dass ein Intermediat mit Sekundärstruktur sehr schnell am Anfang der Faltung erzeugt wird (Kiefhaber *et al.*, 1990b).

Die Analyse der detektierbaren Faltungskinetiken von kleinen β -Faltblattproteinen ergab, dass diese den nativen Zustand in einer Ein-Schritt-Reaktion innerhalb von Millisekunden erreichen können, wenn keine *cis/trans*-Isomerisierungen von Peptidyl-Prolyl-Bindungen oder Assoziationsreaktionen den Faltungsprozess beeinflussen (Schönbrunner *et al.*, 1997a; Jacob *et al.*, 1997). Ab einer bestimmten Länge der Polypeptidkette scheint der Strukturbildungsprozess jedoch nicht mehr nach diesem einfachen Mechanismus ablaufen zu können. Die Faltung von Immunoglobulin-Domänen ist ein wesentlich zeitaufwändigerer Prozess. So benötigt die C_L-Domäne unter Bedingungen, bei denen die Prolinisomerisierung keine Rolle spielt, bereits einige Sekunden zur Faltung (Goto & Hamaguchi, 1982a). Im Gegensatz dazu faltet C_{H3} nach Kurzzeitdenaturierung bei Raumtemperatur innerhalb von 200 Sekunden in den nativen Zustand (Mayer, 1998), die Faltung von C_{H2} beansprucht das

20-fache der Zeit (Pirkkl, 1996). Dieses zeigt, dass die Bildung des *immunoglobulin fold* in strukturell hoch homologen Proteinen mit sehr unterschiedlichen Kinetiken ablaufen kann.

C_{H2} und C_{H3} besitzen *cis*-Peptidyl-Prolyl-Bindungen im nativen Zustand (Deisenhofer, 1981). Der Isomerisierungsvorgang übt jedoch einen unterschiedlich starken Einfluss auf den Faltungsprozess aus. Die Prolin-Isomerisierung ist der geschwindigkeitsbestimmende Faktor bei der Faltung von C_{H3}. Der Hauptfaltungsweg zum nativen Zustand – zu ihm gehören die Geschwindigkeitskonstanten k_{f2} und k_{f3} – führt über ein Faltungsintermediat, das sich durch die langsame *trans*→*cis*-Isomerisierung der Phe34-Pro35-Bindung (k_{f3}) anhäuft. Die Mehrheit der C_{H3}-Moleküle (96 % liegen mit dem Pro35-Rest in der *trans*-Konfiguration im denaturierten Zustand vor, 4 % falten direkt zur nativen Konformation (Mayer, 1998)) braucht nun 60 Minuten bei 20 °C bzw. fünf Stunden bei 4 °C, um den nativen Zustand zu erreichen. Die Prolin-Isomerisierung ist mit ihrer hohen Aktivierungsenergie von 80 kJ mol⁻¹ (Schmid, 1993) besonders temperaturabhängig und verlangsamt sich entsprechend. Die Reaktion lässt sich jedoch erheblich beschleunigen, indem das Enzym Peptidyl-Prolyl-Isomerase (PPI) zum Reaktionsansatz hinzugegeben wird. Das Faltungsintermediat verschwindet bei Anwesenheit von PPI fast vollständig. Die Katalyse durch PPI ist sehr effektiv, da der entsprechende Prolinrest gut zugänglich für das Enzym an der Oberfläche von C_{H3} zu finden ist. Die Abhängigkeit der Prolin-Phase in der Faltung von C_{H3} deutet darauf hin, dass mit der Isomerisierung eine Änderung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des Proteins verbunden ist. Ein Vergleich mit C_L-Domäne zeigt, dass das bei der Faltung von Antikörperdomänen nicht immer der Fall sein muss (Goto & Hamaguchi, 1982a). Im Fall von C_{H3} sind diese strukturellen Änderungen aber die Voraussetzung für die Assoziation der beiden Monomere. Das Dimer bildet sich also erst, wenn die Phe34-Pro35-Peptidbindung in der *cis*-Konfiguration ist. Ein Blick in die Kristallstruktur zeigt deutlich, dass Pro35 nur in der *cis*-Konfiguration eine Wasserstoffbrücke mit dem Rest His90 ausbilden und dadurch die

Dimerkontaktfläche stabilisieren kann. Bestätigung findet dieses eindrucksvoll darin, dass die Dimerisierung durch Zugabe von PPI beschleunigt wird. Die Faltung der C_{H3}-Domäne lässt sich nach diesen Überlegungen mit folgendem Modell beschreiben:

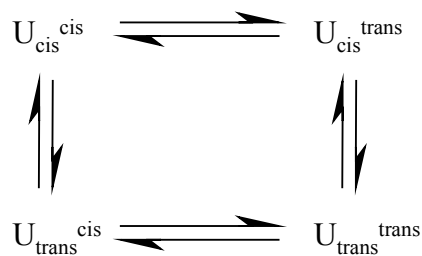


Gl. 4.3.3.: Faltungswege von C_{H3}. (a) Langsamer Faltungsweg, auf dem 96 % der Moleküle den native Zustand erreichen. (b) Schnelle Faltungswege, ausgehend vom denaturierten Protein mit Pro35 in nativer Konfiguration. U_t steht für das entfaltete C_{H3} mit Pro35 in *trans*-Konfiguration, U_c für den entfaltenen Zustand mit Pro35 in *cis*. I ist ein Faltungsintermediat, N₂ das native, dimere Protein. Angegeben ist die zu jedem Schritt dazugehörige Geschwindigkeitskonstante. $k_{\text{Assoziation}}$ ist die schnelle, kinetisch nicht messbare Assoziation zum C_{H3}-Dimer.

Der Hauptteil des Proteins – mit Pro35 in *trans* – bildet über eine schnelle Faltungsreaktion (k_{f2}) ein Faltungsintermediat, das sich aufgrund der nachfolgend langsamen Prolin-Isomerisierung (k_{f3}) anhäuft. Diese Reaktion ist die Voraussetzung dafür, dass die Assoziation zum C_{H3}-Dimer stattfinden kann. Daneben existieren noch mindestens zwei parallele, schnelle Faltungswege, die von denaturierten Zuständen mit Pro35 in *cis*-Konfiguration ausgehen. Der eine wird durch die Geschwindigkeitskonstante k_{f1} beschrieben, der andere wird in der Totzeit der Messung durchlaufen.

Obwohl C_{H2} *cis*-Prolinreste in seiner nativen Struktur hat, scheint deren *trans*→*cis*-Isomerisierung nicht geschwindigkeitsbestimmend in der Faltung zu sein. Experimente in Anwesenheit von PPI zeigen keine Änderung der Geschwindigkeitskonstanten. Bei *double*

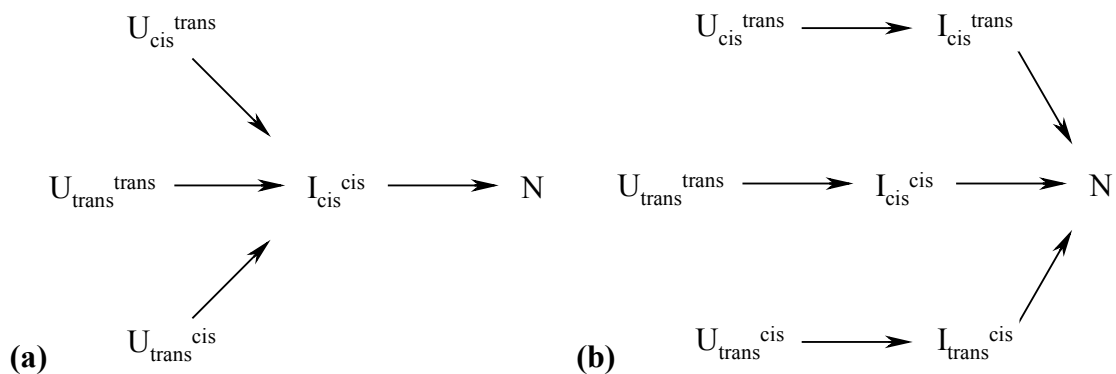
jump-Versuchen wird nur k_{f2} leicht beschleunigt. Auffallend ist jedoch, dass die Gesamtamplitude der messbaren Faltungsreaktion in Anwesenheit von PPI auf 40 %, bei *double jumps* sogar auf 16 % des Ausgangswertes abnimmt (Pirkl, 1996). Somit befände sich eine Prolin-Faltungsphase in der Totzeit der Messung, die aber keinen Einfluss auf den nachfolgenden Faltungsprozess von C_{H2} hat. Dass Prolin-Isomerisierung nicht die Faltungskinetik selbst, wohl aber den Faltungsweg des Proteins prägen kann, zeigen Experimente, die die Entstehung von nativem C_{H2} verfolgen können (N-Test). Die Konfiguration von Peptidyl-Prolyl-Bindungen bestimmt in diesem Fall die Struktur des denaturierten Zustandes. Dadurch entstehen verschieden entfaltete Konformationen des Proteins, die unterschiedliche Faltungswege beschreiten können (Brandts *et al.*, 1975; Schmid & Baldwin, 1978). Bei Annahme von zwei in der nativen Konformation von C_{H2} vorkommenden *cis*-Prolinen – Strukturuntersuchungen deuten darauf hin – ergeben sich vier verschiedene Ausgangspunkte für die Faltung (Gl. 4.3.4.).



Gl. 4.3.4.: Modell für die Heterogenität des denaturierten Zustandes von C_{H2} . U steht für den entfalteten Zustand. Die tief- und hochgestellten Indizes geben die Prolin-Konfiguration des entsprechenden Restes an. *cis* ist das native Isomer.

Dieses Modell der C_{H2} -Rückfaltung auf parallelen Faltungswegen ist anhand der Ergebnisse eindeutig von einem strikt sequentiellen Faltungsmechanismus zu unterscheiden, der über ein teilgefaltetes Intermediat verläuft. Bei diesem Mechanismus müsste eine Phase in der N-Test-Kinetik auftreten, in der die Menge an nativem Protein zu Beginn konstant bleibt. Die Kinetik sollte also einen sigmoidalen Verlauf zeigen. Dieses ist bei der Entstehung von nativem C_{H2}

nicht zu beobachten. Allerdings ist bei C_{H2} wie im Fall von RNase T₁ bereits nach der Totzeit natives Protein zu finden (C_{H2} : 10 %) (Kiefhaber *et al.*, 1990). Dieser Wert entspricht dem Anteil an schnellfaltenden Spezies in der Population von denaturiertem C_{H2} . Somit kann angenommen werden, dass für C_{H2} mindestens drei verschiedene Faltungswege existieren: Ein langsamer, auf dem 66 % des Proteins den nativen Zustand erreichen, einer mit einer mittleren Geschwindigkeitskonstanten (24 %) und ein schneller Faltungsweg (10 %). Die Faltung zu nativem C_{H2} läuft allem Anschein nach über ein frühes Faltungsintermediat, das sich durch nativ-ähnliche Sekundär-, aber kaum vorhandene Tertiärstruktur auszeichnet. Je nachdem, ob die Prolin-Isomerisierung gleichzeitig mit der Bildung dieses Intermediates stattfindet oder erst danach erfolgt, führen die oben postulierten Faltungswege über ein gemeinsames oder mehrere getrennte Zwischenstufen (Gl. 4.3.5.).



Gl. 4.3.5.: C_{H2} -Faltungsmodell. (a) Faltung über ein gemeinsames Intermediat mit nativer Prolin-Konfiguration. **(b)** Getrennte Intermediate. Die *trans*→*cis*-Isomerisierung der Proline erfolgt erst nach der Bildung der Intermediate. Nicht dargestellt ist der direkte Faltungsweg von U_{cis}^{cis} zu N. N ist das native Protein, U der entfaltete Zustand. I steht für das frühe Faltungsintermediat. Die tief- und hochgestellten Indizes geben die Prolin-Konfiguration des entsprechenden Restes an. *cis* ist das native Isomer.

Nur Faltungsmodell b würde die Anzahl der Geschwindigkeitskonstanten aus den C_{H2} -Rückfaltungskinetiken erklären. Die verschiedenen Intermediate falten aufgrund ihrer voneinander abweichenden Konformationen unterschiedlich schnell, aber Prolin-unabhängig zum nativen Zustand. Obwohl eine Prolin-Isomerisierung erfolgt, ist diese nicht

geschwindigkeitsbestimmend, da die entsprechenden Reste nicht integraler Bestandteil der gefalteten Struktur von C_{H2} sind. Anhand des Faltungsmodells a ließe sich aber besser die Abnahme der detektierbaren Amplitude in Anwesenheit von PPI oder bei *double jump*-Experimenten erklären. Die Prolin-Isomerisierung würde hier in der Totzeit der Messung stattfinden. Das gebildete Intermediat würde anschließend Prolin-unabhängig zum nativen Zustand falten. Allerdings entspräche dieser Schritt der in der Totzeit der Messung ablaufenden, parallelen Faltungsreaktion und wäre somit nicht messbar. Um die beiden Modelle zu vervollständigen, müsste diese noch zusätzlich formuliert werden. Zur Unterscheidung beider Faltungsmodelle bedarf es aber noch weitergehender Studien.

Die Mehrheit der Protein-Faltungsuntersuchungen hat sich bis heute entweder mit disulfidfreien oder mit Proteinen beschäftigt, deren Disulfidbrücken während der Renaturierung intakt gelassen wurden (Kim & Baldwin, 1990; Radford *et al.*, 1992; Sosnick *et al.*, 1992). Dagegen wurden nur bei wenigen Proteinen, wie BPTI, RNase T₁, α -Lactalbumin und RNase A, Studien über die oxidative Faltung durchgeführt (Creighton, 1974; Weissman & Kim, 1991; Ruoppolo & Freedman, 1994; van den Berg *et al.*, 1999a,b; Frech & Schmidt, 1995; Creighton & Ewbank, 1994; Peng *et al.*, 1995; Wu & Kim, 1998; Rothwarf & Scheraga, 1993; Xu *et al.*, 1996). Auch im Fall der C_{H3}-Domäne von MAK33 sind solche Untersuchungen von Bedeutung. So basiert die Stabilität des *immunoglobulin fold* zu einem Großteil auf der die beiden β -Faltblätter verknüpfenden Disulfidbrücke (Goto & Hamaguchi, 1979; Rudikoff & Pumphrey, 1986; Frisch *et al.*, 1996; Bell, 1997; Proba *et al.*, 1997; Wörn & Plückthun, 1998). Diese scheint aber auch einen Einfluss auf den Faltungsprozess zu haben. Die Oxidation von C_{H3} unter denaturierenden Bedingungen führt zu einem Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Oxidationsstufen des Proteins. Vollständig oxidiertes C_{H3} wird nur zu 40 % gebildet. Werden bei der C_{H3}-Domäne Oxidation und Faltung jedoch gleichzeitig initiiert, so werden am Ende der Reaktion 100 % natives,

oxidiertes Protein erhalten. Allerdings ist der gleichzeitig zur Faltung ablaufende Oxidationsprozess bei C_{H3} mit drei Stunden Dauer sehr langsam. Weist C_{H3} bereits vor der Oxidation Sekundär- und Tertiärstruktur auf, so wird die oxidative Verknüpfung der beiden Cysteine weiter gehemmt. Die Bildung der nativen Proteinkonformation und damit das Verbergen der beteiligten Cysteine im Proteininneren behindert eine rasche Oxidation (Lilie *et al.*, 1994; Wedemeyer *et al.*, 2000). Die Proteinstruktur schützt darüber hinaus die Disulfidbrücke jedoch auch vor der destabilisierenden Reduktion. Dieses liegt einerseits an den sterischen Verhältnissen, die ein Vordringen des Oxidations- bzw. Reduktionsmittels zum Wirkungsort verlangsamen, zum anderen am hydrophoberen Umfeld, so dass die Bildung der reaktiven Thiolat-Anionen erschwert ist. Andererseits wiederum begünstigt die räumliche Nähe der Cysteine zueinander den Oxidationsprozess.

Die Simulation der Faltung von Modell-Proteinen mit und ohne Disulfidbrücken zeigte, dass der Effekt einer stabilisierenden Disulfidbrücke auf die Faltungskinetik abhängig ist von deren Position in der Proteinstruktur (Abkevich & Shakhnovich, 2000). C_{H3}-Fluoreszenzkinetiken zeigen, dass das Vorhandensein der Disulfidbrücke den Faltungsprozess entscheidend beeinflusst. Die Faltung, ausgehend vom denaturierten, reduzierten C_{H3}, ist viel langsamer als die des Proteins mit intakter Disulfidbrücke. Der gesamte Prozess der Faltung und Oxidation dauert mehr als 12 Stunden (die Faltung des oxidierten C_{H3} braucht fünf Stunden). Ist die Disulfidbrücke jedoch bereits ausgebildet, wird der konformationelle Raum der Polypeptidkette eingeschränkt und die Faltung zum nativen Protein verläuft gezielter (Creighton, 1997; Abkevich & Shakhnovich, 2000). Außerdem wird die native C_{H3}-Struktur am Ende der Faltung stabilisiert (siehe oben). Eine Entfaltung ist dann nicht mehr so leicht möglich.

5. Zusammenfassung

Nicht nur in biotechnologischer Hinsicht, auch für das grundsätzliche Verständnis der Faltung komplexer Faltblattproteine ist die Untersuchung der Strukturbildung von Antikörpern, deren Fragmenten und Domänen wichtig. Im Mittelpunkt dieser Arbeit lag der Vergleich der beiden konstanten Domänen C_{H2} und C_{H3} des monoklonalen Antikörpers MAK33. Dazu wurden eingehende Struktur-, Stabilitäts- und Faltungsuntersuchungen an den beiden Proteinen durchgeführt. Trotz einer nicht sehr großen Übereinstimmung auf Aminosäureebene falten C_{H2} und C_{H3} in das gleiche Faltungsmotiv, den *immunoglobulin fold*. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine sind weitgehend gleich. Jedoch führt bei C_{H2} die Lösungsmittel-Exponiertheit großer hydrophober Oberflächen zu Stabilitätseinbußen. Im Fall von C_{H3} werden diese durch die Assoziation der Monomere verborgen und sorgen somit für eine zusätzliche entropische Stabilisierung des Proteins. C_{H3} besitzt eine freie Stabilisierungsenthalpie von $-66,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, die 6-mal größer ist als die von monomerem C_{H2}. Das Dimer besitzt einen Schmelzpunkt von 75 °C, während C_{H2} schon bei physiologischen Temperaturen zu entfalten beginnt. Die Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücke führt bei beiden Proteinen zu einer Verringerung der Stabilität. Jedoch kann nur C_{H3} dieses durch den Stabilitätsbeitrag, den die Dimerisierung liefert, kompensieren. C_{H2} entfaltet nach der Reduktion der Disulfidbrücke vollständig. Gegenüber extremen Lösungsmittelbedingungen, wie pH 2, erweist sich C_{H3} ebenfalls resistenter. Es nimmt unter diesen Bedingungen bei erhöhter Ionenstärke eine Konformation an, die als *alternatively folded state* bezeichnet wird. Dieses umgefaltete Protein besitzt kaum noch Tertiär-, aber Sekundärstruktur, die vermutlich einen höheren helikalen Anteil als das Protein bei pH 8 aufweist. Zudem assoziieren diese Moleküle zu höheren Oligomeren, die aus 12-14 Untereinheiten bestehen können. Diese Oligomerisierung ist bei Anhebung des pH-Wertes

umkehrbar. *Alternatively folded* C_{H3} zeichnet sich durch eine Stabilität gegenüber Denaturierung aus, die mit dem des nativen Proteins vergleichbar ist.

Hinsichtlich der Kinetik der Faltung unterscheiden sich C_{H2} und C_{H3} ebenfalls. Ein Großteil der Renaturierung von C_{H2} läuft in der Totzeit der Messungen ab. Darüber hinaus erfolgt die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstruktur nicht gleichzeitig, wie dieses bei C_{H3} beobachtet wurde. Dieses führt zu der Vermutung, dass am Anfang der Rückfaltung ein Intermediat mit nativ-ähnlicher Sekundärstruktur entsteht, das erst im weiteren Verlauf der Faltung die Tertiärstruktur des nativen Proteins ausbildet. Demgegenüber wird im Verlauf der Faltung von C_{H3} ein Faltungsintermediat populiert, dessen Anhäufung aufgrund der langsamen *trans*→*cis*-Isomerisierung des Restes Pro35 stattfindet. Diese Isomerisierung ist auch die Voraussetzung dafür, dass zwei C_{H3}-Monomere zum Dimer assoziieren können. Für C_{H3} existieren mindestens drei verschiedene Faltungswege. Ein langsamer Weg führt über das Faltungsintermediat. Ein zweiter paralleler Weg kommt ohne die Prolinisisomerisierung aus. Ein dritter Pfad wird in der Totzeit der Messungen durchlaufen. C_{H2} besitzt zwar auch *cis*-Proline in der nativen Konformation. Jedoch scheint deren *trans*→*cis*-Transformation nicht geschwindigkeitsbestimmend in der C_{H2}-Faltung zu sein. Unterschiedliche Konfigurationen dieser Reste im denaturierten Zustand führen dazu, dass verschiedene parallele Faltungswege zum nativen C_{H2} beschritten werden. Jedoch ist die Natur dieser Faltungswege und deren Verhältnis zueinander noch nicht ganz aufgeklärt.

Die Faltung und Oxidation der reduzierten C_{H3}-Domäne zeigten, dass die Geschwindigkeit der Disulfidbrückenbildung den Faltungsprozess stark beeinflusst. Ist die Disulfidbrücke bereits ausgebildet, wird der konformationelle Raum der Polypeptidkette eingeschränkt und die Faltung zum nativen Protein verläuft gezielter. Der Vorgang der Oxidation selbst wird durch die räumliche Nähe der beteiligten Cysteine begünstigt. Auf der anderen Seite ist eine ausgeprägte Proteinstruktur für die Oxidation hinderlich, da dadurch durch die Flexibilität und

die Zugänglichkeit der Cysteine für Redoxreagenzien ins hydrophobe Innere des Proteins eingeschränkt wird.

Die während dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergänzen frühere Studien am MAK33 Fab-Fragment. Die Kristallstruktur der C_{H3}-Domäne wurde gelöst, während für C_{H2} eine erste Struktursimulation vorliegt. Der *alternatively folded state* konnte im Fall von C_{H3} nachgewiesen werden. Ferner wurde die außerordentliche Stabilität dieses Faltungszustandes bestätigt, was zum Teil auch auf einen neu entdeckten oligomeren Zustand der C_{H3}-Domäne zurückzuführen ist. Es existiert nun eine genauere Vorstellung der Faltung und Assoziation der C_{H3}-Domäne. Im Bereich der Aufklärung der C_{H2}-Faltung konnten substantielle Fortschritte erzielt werden. Stabilitätsuntersuchungen unter verschiedenen Bedingungen wurden durchgeführt. Allerdings sind in diesem Bereich noch weiterführende Untersuchungen nötig, um den komplexen C_{H2}-Faltungsmechanismus zu verstehen. Die hier gesammelten Ergebnisse über Faltung und Oxidation der beiden Domänen C_{H2} und C_{H3} werden in hoffentlich nicht allzu ferner Zukunft zur Aufklärung der Faltung von Antikörpern beitragen können.

6. Literaturverzeichnis

- Abkevich, V.I. & Shakhnovich, E.I. (2000). *J. Mol. Biol.* 300: 975-985.
- Alzari, P.M., Lascombe, M.-B. & Poljak, R.J. (1988). *Ann. Rev. Immunol.* 6: 555-558.
- Amzel, L.M. & Poljak, R.J. (1979). *Ann. Rev. Biochem.* 48: 961-993.
- Anfinsen, C.B. (1973). *Science* 181: 223-230.
- Anson, M.L. & Mirsky, A.E. (1925). *J. Gen. Physiol.* 9: 169-179.
- Anson, M.L. & Mirsky, A.E. (1939). *J. Phys. Chem.* 35: 145.
- Baldwin, R.L. (1995). *J. Biomolec. NMR* 5: 103-109.
- Baldwin, R.L. (1997). *Nat. Struct. Biol.* 4: 965-966.
- Baldwin, R.L. & Rose, G.D. (1999). *Trends Biochem. Sci.* 24: 26-33.
- Bardwell, J.C.A. (1997). in: Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts (Hrsg.: Gething, M.-J.), *Oxford University Press*, Oxford, UK: 499-506.
- Bardwell, J.C.A., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991). *Cell* 67: 581-589.
- Barrick, D., Hughson, F.M. & Baldwin, R.L. (1994). *J. Mol. Biol.* 237: 588-601.
- Beißinger, M. & Buchner, J. (1998). *Biol. Chem.* 379: 245-259.
- Bell, S. (1997). Expression und Charakterisierung rekombinant erzeugter Antikörperdomänen, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- van den Berg, B., Chung, E.W., Robinson, C.V. & Dobson C.M. (1999a). *J. Mol. Biol.* 290: 781-796
- van den Berg, B., Chung, E.W., Robinson, C.V., Mateo, P.L. & Dobson C.M. (1999b). *EMBO J.* 18: 4794-4803.
- Bergmann, L.W. & Kuehl, M.W. (1979). *J. Biol. Chem.* 254: 5690-5694.
- Bieri, O., Wirz, J., Hellrung, B., Schutkowski, M., Drewello, M. & Kiefhaber, T. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9597-9601.
- Blanco, F.J., Rivas, G. & Serrano, L. (1994). *Nat. Struct. Biol.* 1: 535-542.
- Bolivar, F., Backman, K. (1979). *Methods Enzymol.* 68: 245-267.
- Bork, P., Hahn, L. & Sander, C. (1994). *J. Mol. Biol.* 242: 309-320.
- Bowden, G.A. & Georgiou, G. (1990). *J. Biol. Chem.* 265: 16760-16766.
- Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D. (1969). *J. Mol. Biol.* 41(3): 459-472.
- Braakman, L., Hoover-Litty, H., Wagner, K.R. & Helenius, A. (1991). *J. Cell. Biol.* 114: 401-411.
- Braakman, L., Helenius, J. & Helenius, A. (1992). *EMBO J.* 11: 1717-1722.
- Brandts, H.F., Halvorson, H.R. & Brennan, M. (1975). *Biochemistry* 14: 4953-4963.
- Buchner, J. (1987). Renaturierung eines monoklonalen Antikörpers (κ -IgG1), *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Buchner, J. (1996). *FASEB J.* 10: 10-19.
- Buchner, J., Renner, M., Lilie, H., Hinz, H.J., Kiefhaber, T. & Jaenicke, R. (1991). *Biochemistry* 30: 6922-6929.
- Bulleid, N.J. & Freedman, R.B. (1988). *Nature* 355: 649-651.
- Cai, H., Wang, C.C. & Tsou, C.C. (1994). *Biol. Chem.* 269: 24550-24552.
- Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980). *Biophysical Chemistry 2*, W.H. Freeman & Co, San Francisco: 374-451.
- Chan, H.S. & Dill, K.A. (1998). *Proteins: Struct. Func. Genet.* 30: 2-33.
- Chen, B.-L., Baase, W.A., Nicholson, H. & Schellmann, J.A. (1992). *Biochemistry* 31: 1464-1476.
- Chen, B.-L. & Schellmann, J.A. (1989). *Biochemistry* 28: 685-691.
- Chothia, C., Novotny, J., Bruccoleri, R. & Karplus, M. (1985). *J. Mol. Biol.* 186: 651-663.
- Cooper, T.G. (1981). *Biochemische Arbeitsmethoden*, de Gruyter, Berlin.

- Clark, P.L., Liu, Z.-P., Rizo, J. & Gierasch, L.M. (1997). *Nat. Struct. Biol.* 4: 883-886.
- Cremer, A., Knittler, M.R. & Haas, I.G. (1993). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374: 224.
- Creighton, T.E. (1974). *J. Mol. Biol.* 87: 579-602.
- Creighton, T.E. (1986). *Methods Enzymol.* 131: 83-106.
- Creighton, T.E. (1989). in: *Protein Structure: A Practical Approach* (Hrsg.: Creighton, T.E.), IRL Press, Oxford, New York, Tokyo: 155-167.
- Creighton, T.E. (1997). *Biol. Chem.* 378: 731-744.
- Creighton, T.E. & Ewbank, J.J. (1994). *Biochemistry* 33: 1534-1538.
- Dall'Acqua, W., Simon, A.L., Mulkerrin, M.G. & Carter, P. (1998). *Biochemistry* 37: 9266-9273.
- Damaschun, G., Damaschun, H., Gast, K. & Zirwer, D. (1999). *J. Mol. Biol.* 291: 715-725.
- Darby, N.J., Kemmink, J. & Creighton, T.E. (1996). *Biochemistry* 35: 10517-10528.
- Davies, D.R. & Metzger, H. (1983). *Ann. Rev. Immunol.* 1: 87-117.
- Demarest, S.J., Boice, J.A., Fairman, R. & Raleigh, D.P. (1999). *J. Mol. Biol.* 294: 213-221.
- Deisenhofer, J. (1981). *Biochemistry* 20: 2361-2370.
- de Vos, A.M., Ultsch, M. & Kossiakoff, A.A. (1992). *Science* 255: 306-312.
- Dill, K.A. (1990). *Biochemistry* 29: 7133-7155.
- Dill, K.A. & Chan, H.S. (1997). *Nat. Struct. Biol.* 4: 10-19.
- Dobson, C.M. (1992). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 6-12.
- Dobson, C.M. (1994). *Curr. Biol.* 4: 636-640.
- Dobson, C.M., Evans, P.A. & Radford, S.E. (1994). *Trends Biochem. Sci.* 19: 31-37.
- Edelmann, G.M. & Gall, W.E. (1969). *Biochemistry* 38: 415-466.
- Ellis, J. (1987). *Nature* 328: 378-379.
- Ellman, G.L. (1958). *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.
- Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H. (1971). *Biochemistry* 10: 2606-2617.
- Fersht, A.R. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10869-10873.
- Fink, A.L. (1995). *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 495-522.
- Fink, A.L., Calciano, L.J. & Goto, Y. (1994). *Biochemistry* 33: 12504-12511.
- Finkelstein, A.V. (1991). *Proteins: Struct. Func. Genet.* 9: 23-27.
- Fischer, G. (1994). *Angew. Chem. Int. Ed.* 33: 1415-1436.
- Fischer, G., Bang, H. & Mech, C. (1984). *Biomed. Biochim. Acta* 43: 1101-1111.
- Fischer, G. & Schmid, F.X. (1990). *Biochemistry* 29: 2205-2212.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986). *Anal. Biochem.* 155: 83-88.
- Frech, C. & Schmid, F.X. (1995). *J. Mol. Biol.* 251: 135-149.
- Freedman, R.B. (1984). *Trends Biochem. Sci.* 9: 438-441.
- Freedman, R.B. (1991). in: *Conformation and Forces in Protein Folding* (Hrsg.: Nall, B.T. & Ill, K.A.), *American Association for the Advancement in Science*, Washington, D.C., USA: 204-214.
- Freedman, R.B., Hirst, T.R. & Tuite, M.F. (1994). *Trends Biochem. Sci.* 19: 331-336.
- Frisch, C., Kolmar, H., Schmidt, A., Kleemann, G., Reinhardt, A., Pohl, E., Uson, L., Schneider, T.R. & Fritz, H.J. (1996). *Fold. Des.* 1: 431-440.
- Galat, A., & Metcalfe, S.M. (1995). *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 63: 67-118.
- Georgopoulos, C.P. & Welch, W.J. (1993). *Ann. Rev. Cell. Biol.* 9: 601-634.
- Gething, M.-J. (1997). in: *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts* (Hrsg.: Gething, M.-J.), *Oxford University Press*, Oxford, UK: 59-65.
- Gething, M.-J. & Sambrook, J.F. (1992). *Nature* 355: 33-45.
- Ghosh, G., Van Duyn, G., Ghosh, S. & Sigler, P.B. (1995). *Nature* 373: 303-310.
- Gilbert, H.F. (1998). *Methods Enzymol.* 290: 26-50.
- Goldberg, M.E. (1985). *Trends Biochem. Sci.* 10: 388-391.

- Goldberg, M.E., Semistonov, G.V., Friguet, B., Kuwajima, K., Ptitsyn, O.B. & Sugai, S. (1990). *FEBS Lett.* 263: 51-56.
- Goto, Y., Calciano, L.J. & Fink, A.L. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 573-577.
- Goto, Y. & Fink, A.L. (1989). *Biochemistry* 28: 945-952.
- Goto, Y., Hagihara, Y., Hamada, D., Hoshino, M. & Nishii, I. (1993). *Biochemistry* 32: 11878-11885.
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1979). *J. Biochem.* 86: 1433-1441.
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982a). *J. Mol. Biol.* 156: 891-910.
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982b). *J. Mol. Biol.* 156: 911-926.
- Gray, W.R. (1993). *Protein Sci.* 2: 1732-1748.
- Gutte, B. & Merryfield, R.B. (1971). *J. Biol. Chem.* 246: 1922-1941.
- Haas, I.G. & Wabl, M. (1983). *Nature* 306: 387-389.
- Haase-Pettingel, H. & King, J. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 4977-4983.
- Hagerman, P.J. & Baldwin, R.L. (1976). *Biochemistry* 15: 1462-1473.
- Hagihara, Y., Oobatake, M. & Goto, Y. (1994a). *Protein Sci.* 3: 1418-1429.
- Hagihara, Y., Tan, Y. & Goto, Y. (1994b). *J. Mol. Biol.* 237: 336-348.
- Hanahan, D. (1983). *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hanahan, D. (1985). in: DNA cloning 1 (Hrsg.: Glover, D.M.), IRL Press, Oxford, New York, Tokyo: 109-135.
- Harrison, R.K. & Stein, R.L. (1990). *Biochemistry* 29: 3813-3816.
- Harrison, S.C. & Durbin, R. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4028-4030.
- Hartl, F.U. (1996). *Nature* 381: 571-579.
- Hawkins, H.C. & Freedman, R.B. (1991). *Biochem. J.* 275: 335-339.
- Hawkins, H.C., deNardi, M. & Freedman, R.B. (1991). *Biochem. J.* 275: 341-348.
- Hendershot, L., Bole, D., Kohler, G. & Kearney, J.F. (1987). *J. Cell. Biol.* 104: 761-767.
- Hendrik, R.W. & Hartl, F.U. (1993). *Ann. Rev. Biochem.* 62: 349-384.
- Hestekamp, T., Hauser, S., Lütcke, H. & Bukau, B. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4437-4441.
- Heukeshofen, J. & Dernick, R. (1988). *Elektrophoresis* 9: 28.
- Holmgren, A. & Bränden, C.-I. (1989). *Nature* 342: 248-251.
- Huber, A.H., Wang, Y.E., Bieber, A.J. & Bjorkman, P.J. (1994). *Neuron* 12: 717-731.
- Huppa, J.B. & Ploegh, H.L. (1998). *Cell* 92: 145-148.
- Hurtley, S.M. & Helenius, A. (1989). *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 277-307.
- Huston, J.S., McCartney, J., Tai, M.S., Mottola-Hartshorn, C., Jin, D., Warren, F., Keck, P. & Oppermann, H. (1993). *Int. Rev. Immunol.* 10: 195-217.
- Ikai, A. & Tanford, C. (1971). *Nature* 230: 100-102.
- Ikai, A. & Tanford, C. (1973). *J. Mol. Biol.* 73: 145-163.
- Ikeguchi, D.E., Kuwajima, K., Mitani, M. & Sugai, S. (1986). *Biochemistry* 25: 6965-6972.
- Isenman, D.E., Lancet, D. & Pecht, I. (1979). *Biochemistry* 18: 3327-3336.
- Jackson, S.E. & Fersht, A.R. (1991). *Biochemistry* 30: 10436-10443.
- Jacob, M., Schindler, T., Balbach, J. & Schmid, F.X. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5622-5627.
- Jaenicke, R. (1987). *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 49: 117-237.
- Jaenicke, R. (1991). *Biochemistry* 30: 3147-3161.
- Jaenicke, R. (1996). *Curr. Topics Cell. Regul.* 34: 209-314.
- Jaenicke, R. & Buchner, J. (1993). *Chemtracs* 4: 1-30.
- Jaenicke, R. & Rudolph, R. (1989). in: Protein Structure: A Practical Approach (Hrsg.: Creighton, T.E.), IRL Press, Oxford, New York, Tokyo: 191-223.
- Janeway, C.A. & Travers, P. (1997). in: *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.

- Jeng, M.F. & Englander, S.W. (1991). *J. Mol. Biol.* 221: 1045-1061.
- Johnstone, A. & Thorpe, R. (1987). in: *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific, Oxford: 55-59.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1075-1078.
- Kammermeier, R. (1999). Stabilität und Faltung der C_{H3}-Domäne des monoklonalen Antikörpers MAK33, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Karplus, M. & Šali, A. (1995). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 58-73.
- Kehoe, J.M. & Capra, J.D. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2019-2021.
- Klein, C. & Schulz, G.E. (1991). *J. Mol. Biol.* 217: 737-750.
- Khorasanizadeh, S., Peters, L.D. & Roder, H. (1996). *Nat. Struct. Biol.* 3: 193-205.
- Kiefhaber, T. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9029-9033.
- Kiefhaber, T. (1995). in: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 40: Protein Stability and Folding, Theory and Practice (Hrsg.: Shirley, B.A.), Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. & Schmid, F.X. (1990a). *Biochemistry* 29: 3053-3061.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. & Schmid, F.X. (1990b). *Biochemistry* 29: 3062-3070.
- Kiefhaber, T. & Schmid, F.X. (1992). *J. Mol. Biol.* 224: 231-240.
- Kim, P.S. & Balwin, R.L. (1982). *Ann. Rev. Biochem.* 51: 459-489.
- Kim, P.S. & Balwin, R.L. (1990). *Ann. Rev. Biochem.* 59: 631-660.
- Knarr, G., Gething, M.-J., Modrow, S. & Buchner, J. (1995). *J. Biol. Chem.* 270: 27589-27594.
- Kolvenbach, C., Narhi, L.O., Philo, J.S., Zhang, T.L. & Arakawa, T. (1997). *J. Peptide Res.* 50: 310-318.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985). *Ann. Rev. Biochem.* 54: 631-664.
- Kuwajima, K. (1989). *Proteins: Struct. Func. Genet.* 6: 87-103.
- Kuwajima, K., Hiraoka, Y., Ikeguchi, M. & Sugai, S. (1985). *Biochemistry* 24: 874-881.
- Kuwajima, K., Yamaha, H., Miwa, S., Sugai, S. & Nagamura, T. (1987). *FEBS Lett.* 221: 115-118.
- Kyle, J. & Doolittle, R.F. (1982). *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Lämmli, U.K. (1970). *Nature* 227: 680-685.
- Lang, K., Schmid, F.X. & Fischer, G. (1987). *Nature* 329: 268-270.
- Leahy, D.J., Hendrickson, W.A., Aukhil, I. & Erickson, H.P. (1992). *Science* 258: 987-991.
- Lesk, A.M. & Chothia, C. (1982). *J. Mol. Biol.* 160: 325-342.
- Levinthal, C.J. (1968). *J. Chem. Phys.* 65: 44-45.
- Lilie, H. (1995). Faltung und Assoziation des Fab-Fragments des monoklonalen Antikörpers MAK33, *Dissertation*, Universität Regensburg.
- Lilie, H. & Buchner, J. (1995). *FEBS Lett.* 362: 43-46.
- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R. & Buchner, J. (1993). *Protein Sci.* 2: 1490-1496.
- Lilie, H., McLaughlin, S., Freedman, R.B. & Buchner, J. (1994). *J. Biol. Chem.* 269: 14290-14296.
- Lilie, H., Rudolph, R. & Buchner, J. (1995a). *J. Mol. Biol.* 248: 194-201.
- Lilie, H., Rudolph, R. & Buchner, J. (1995b). *Protein Sci.* 4: 917-924.
- Lin, M.C. (1970). *J. Biol. Chem.* 245: 6726-6731.
- Lu, J. & Dahlquist, F.W. (1992). *Biochemistry* 31: 4749-4756.
- Lyles, M.M. & Gilbert, H.F. (1991). *Biochemistry* 30: 613-619.
- Main, A.L., Harvey, T.S., Baron, M., Boyd, J. & Campbell, I.D. (1992). *Cell* 71: 671-678.
- Mann, C.J. & Matthews, C.R. (1993). *Biochemistry* 32: 5282-5290.
- Marston, F.A.O. (1986). *Biochem. J.* 240: 1-12.
- Mascagni, P., Tonolo, M., Ball, H., Lim, M., Ellis, R.J. & Coates, A. (1991). *FEBS Lett.* 286: 201-203.
- Matheson, R.R. & Scheraga, H.A. (1978). *Macromolecules* 11: 819-829.

- Matouschek, A., Serrano, L. & Fersht, A.R.** (1992). *J. Mol. Biol.* 224: 819-835.
- Matthews, C.R.** (1993). *Ann. Rev. Biochem.* 62: 653-683.
- Mayer, J.** (1993). Reinigung und Charakterisierung der rekombinant erzeugten Antikörperdomäne C_{H3}, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Mayer, J.** (1998). Faltung und Assoziation der C_{H3}-Domäne des monoklonalen Antikörpers MAK33. *Dissertation*, Universität Regensburg.
- Melnick, J., Aviel, S. & Argon, Y.** (1992). *J. Biol. Biochem.* 267: 21303-21306.
- Mizuochi, T., Hamato, J. & Titani, K.** (1987). *Arch. Biochem. Biophys.* 257: 387-394.
- Morimoto, R.I., Tissières, A. & Georgopoulos, C.** (1994). in: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Hrsg.: Morimoto, R.I., Tissières, A. & Georgopoulos, C.), *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York: 1-30.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A.** (1987). *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Muñoz, V., Thompson, P.A., Hofrichter, J. & Eaton, W.A.** (1997). *Nature* 390: 196-199.
- Nath, U. & Udgaonkar, J.B.** (1997). *Curr. Science* 72: 180-191.
- Neet, K.E. & Tim, D.E.** (1994). *Protein Sci.* 3: 2167-2174.
- Neira, J.L., Davis, B., Ladurner, A.G., Buckle, A.M., de Prat Gay, G. & Fersht, A.R.** (1996). *Fold. Des.* 1: 189-208.
- Neri, D., Billeter, M., Wider, G. & Wüthrich, K.** (1992). *Science* 257: 1559-1563.
- Noiva, R., Kimura, H., Roos, J. & Lennarz, W.J.** (1991). *J. Biol. Chem.* 266: 19645-19649.
- Noiva, R. & Lennarz, W.J.** (1992). *J. Biol. Chem.* 267: 3553-3556.
- Oas, T.G. & Kim, P.S.** (1988). *Nature* 336: 42-48.
- Ohgushi, M. & Wada, A.** (1983). *FEBS Lett.* 164: 21-24.
- Oliveberg, M. & Fersht, A.R.** (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8926-8929.
- Otzen, D.E., Itzhaki, L.S., elMasry, N.F., Jackson, S.E. & Fersht, A.R.** (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10422-10425.
- Padlan, E.A., Cohen, G.H. & Davies, D.R.** (1987). *Mol. Immunol.* 23: 951-960.
- Park, S.T., Aldape, R.A., Futer, O., DeCenso, M.T. & Livingston, D.J.** (1992). *J. Biol. Chem.* 267: 3316-3324.
- Peng, Z., Wu, L.C. & Kim, P.S.** (1995). *Biochemistry* 34: 3248-3252.
- Peters, T. & Davidson, L.K.** (1982). *J. Biol. Chem.* 257: 8847-8853.
- Phizackerley, R.P., Wishner, B.C., Bryant, S.H., Amzel, L.M., Lopez de Castro, J.A. & Poljak, R.J.** (1979). *Mol. Immunol.* 16: 841-850.
- Pirkl, F.** (1996). Reinigung und Charakterisierung der rekombinant erzeugten Antikörperdomäne C_{H2}, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Proba, K., Honegger, A. & Plückthun, A.** (1997). *J. Mol. Biol.* 265: 161-172.
- Ptitsyn, O.B.** (1992). in: *Protein Folding* (Hrsg.: Creighton, T.E.), *Freeman*, New York: 243-300.
- Ptitsyn, O.B.** (1995). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 74-78.
- Ptitsyn, O.B.** (1995a). *Adv. Prot. Chem.* 47: 83-229.
- Ptitsyn, O.B.** (1995b). *FEBS Lett.* 20: 376-379.
- Ptitsyn, O.B., Pain, R.H., Semistonov, G.V., Zerovnik, E. & Razgulyaev, O.I.** (1990). *FEBS Lett.* 262: 20-24.
- Ptitsyn, O.B. & Rashin, A.A.** (1975). *Biophys. Chem.* 3: 1-20.
- Ptitsyn, O.B. & Uversky, V.N.** (1994). *FEBS Lett.* 341: 15-18.
- Qi, P.X., Sosnick, T.R. & Englander, S.W.** (1998). *Nat. Struct. Biol.* 5: 882-884.
- Radford, S.E., Dobson, C.M. & Evans, P.A.** (1992). *Nature* 358: 302-307.
- Rahfeld, J.-U., Rücknagel, K.P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K. & Fischer, G.** (1994). *FEBS Lett.* 352: 180-184.
- Rahfeld, J.-U., Schierborn, A., Mann, K. & Fischer, G.** (1994). *FEBS Lett.* 343: 65-69.
- Ramirez-Alvarado, M., Kortemme, T., Blanco, F.J. & Serrano, L.** (1999). *Bioorg. Med. Chem.* 7: 93-103.

- Ramm, K., Gehrig, P. & Plückthun, A. (1999). *J. Mol. Biol.* 298: 535-546.
- Redfield, C., Schulman, B.A., Milhollen, M.A., Kim, P.S. & Dobson, C.M. (1999). *Nat. Struct. Biol.* 6: 948-952.
- Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1998). *J. Mol. Biol.* 279: 449-460.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Jung, S.H., Pastan, I. & Lee, B. (1995). *Protein Eng.* 8: 1323-1331.
- Richardson, J.S. (1981). *Adv. Protein Chem.* 34: 176-339.
- Roder, H., Elöve, G. & Englander, S.W. (1988). *Nature* 335: 700-704.
- Rothwarf, D.M. & Scheraga, H.A. (1993). *Biochemistry* 32: 2671-2679.
- Rowe, E.S. & Tanford, C. (1973). *Biochemistry* 12: 4822-4827.
- Rudikoff, S. & Pumphrey, J.G. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 7875-7878.
- Ruoppolo, M. & Freedman, R.B. (1994). *Biochemistry* 33: 7654-7662.
- Saab-Rincon, G., Froebe, C.L. & Matthews, C.R. (1993). *Biochemistry* 32: 13981-13990.
- Sambrook, J.F., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schmid, F.X. (1983). *Biochemistry* 22: 4690-4696.
- Schmid, F.X. (1986). *Methods Enzymol.* 131: 70-82.
- Schmid, F.X. (1989). *Protein Structure: A Practical Approach* (Hrsg.: Creighton, T.E.), IRL Press, Oxford, New York, Tokyo: 251-286.
- Schmid, F.X. (1993). *Ann. Rev. Biophys. Biomed.* 22: 123-142.
- Schmid, F.X. & Baldwin, R.L. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4764-4768.
- Schönbrunner, N., Koller, K.-P. & Kiefhaber, T. (1997a). *J. Mol. Biol.* 268: 526-538.
- Schönbrunner, N., Pappenberger, G., Scharf, M., Engels, J. & Kiefhaber, T. (1997b). *Biochemistry* 36: 9057-9065.
- Schreiber, S.L. (1991). *Science* 251: 283-287.
- Semistionov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F. & Gilmanshin, R.I. (1991). *Biopolymers* 31: 119-128.
- Serrano, L., Matouschek, A. & Fersht, A.R. (1992). *J. Mol. Biol.* 224: 805-818.
- Shevchik, V.E., Condemine, G. & Robert-Baudouy, J. (1994). *EMBO J.* 13: 2007-2012.
- Shortle, D. (1996). *FASEB J.* 10: 27-34.
- Sosnick, T.R., Mayne, L., Hiller, R. & Englander, S.W. (1992). *Nat. Struct. Biol.* 1: 149-156.
- Stein, R.L. (1993). *Adv. Protein Chem.* 44: 1-24.
- Stoller, G., Rücknagel, K.P., Nierhaus, K.H., Schmid, F.X., Fischer, G. & Rahfeld, J.-U. (1995). *EMBO J.* 14: 4939-4948.
- Stryer, L. (1965). *J. Mol. Biol.* 13: 482-495.
- Sumi, A. & Hamaguchi, K. (1982). *J. Biochem.* 92: 823-833.
- Sunde, M. & Blake, C.C.F. (1998). *Quart. Rev. Biophys.* 31: 1-39.
- Tachibana, C. & Stevens, T.H. (1992). *Mol. Cell Biol.* 12: 4601-4611.
- Tanford, C. (1968). *Protein Chem.* 23: 221-282.
- Tanford, C., Aune, K.C. & Ikai, A. (1973). *J. Mol. Biol.* 73: 185-197.
- Thies, M.J.W. (1997). Expression, Renaturierung und Charakterisierung der C_H2-Domäne des monoklonalen Antikörpers MAK33, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg.
- Thies, M.J.W., Mayer, J., Augustine, J.G., Frederick, C.A., Lilie, H. & Buchner, J. (1999). *J. Mol. Biol.* 293: 67-79.
- Thies, M.J.W. & Pirkl, F. (2000). *J. Chromatogr. B* 737: 63-69.
- Thornton, J.M. & Sibanda, B.L. (1983). *J. Mol. Biol.* 167: 443-460.
- Torella, C., Ruoppolo, M., Marino, G. & Pucci, P. (1994). *FEBS Lett.* 352: 301-306.
- Tsong, T.Y., Baldwin, R.L. & Elson, E.L. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2712-2715.

- Tsunenaga, M., Goto, Y., Kawata, Y. & Hamaguchi, K. (1987). *Biochemistry* 26: 6044-6051.
- Udgaonkar, J.B. & Baldwin, R.L. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8187-8201.
- Valent, Q.A., Kendall, D.A., High, S., Kusters, R., Oudega, B. & Luirink, J. (1995). *EMBO J.* 14: 5494-5505.
- Vlasov, A.P., Kravchuk, Z.I. & Martsev, S.P. (1996). *Biokhimiia* 61: 212-235.
- Voet, D. & Voet, J.G. (1995). *Biochemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons Inc., New York.
- Wang, C.C. (1998). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 864: 9-13.
- Wang, C.C. & Tsou, C.L. (1993). *FASEB J.* 7:1515-1517.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E., Narayan, M. & Scheraga, H.A. (2000). *Biochemistry* 39: 4207-4216.
- Weissmann, J.S. & Kim, P.S. (1991). *Science* 253: 1386-1393.
- Weissmann, J.S. & Kim, P.S. (1993). *Nature* 365: 185-188.
- Welfle, K., Misselwitz, R., Hausdorf, G., Hohne, W. & Welfle, H. (1999). *Biochim. Biophys. Acta* 1431: 120-131.
- Wels, J.A., Word, C.J., Rimm, D., Der-Balan, G.P., Martinez, H.M., Tucker, P.W. & Blattner, F.R. (1984). *EMBO J.* 3: 2041-2046.
- Wetlaufer, D.B. (1962). *Adv. Prot. Chem.* 17: 303-309.
- Wetlaufer, D.B. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 697-701.
- Wildegger, G. & Kiefhaber, T. (1997). *J. Mol. Biol.* 270: 294-304.
- Williams, A.F. & Barclay, A.N. (1988). *Ann. Rev. Immunol.* 6: 381-405.
- Wörn, A. & Plückthun, A. (1998). *FEBS Lett.* 427: 357-361.
- Wolynes, P.G., Onuchi, J.N. & Thirumalai, D. (1995). *Science* 267: 1619-1620.
- Wu, L.C. & Kim, P.S. (1998). *J. Mol. Biol.* 280: 175-182.
- Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1993). *Protein Sci.* 2: 717-726.
- Xu, X., Rothwarf, D.M. & Scheraga, H.A. (1996). *Biochemistry* 35: 6406-6417.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). *Gene* 33: 103-119.
- Yao, Y., Zhou, Y.C. & Wang, C.C. (1997). *EMBO J.* 16: 651-658.
- Yutani, K., Ogasahara, K. & Kuwajima, K. (1992). *J. Mol. Biol.* 228: 347-350.

7. Abkürzungen

Amp	Ampicillin
ANS	8-Anilino-1-Naphthalensulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
C _{H2}	C _{H2} -Domäne, oxidiert
C _{H3} /C _{H3} _{red}	C _{H3} -Domäne, oxidiert/reduziert
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithio-bis-Nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreit
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antikörperfragment, enthält die variablen Dömanen
(Fab) ₂ '	Dimer von F _{ab} , disulfidverbrückt
Fc	Antikörperfragment, dimer, enthält C _{H2} und C _{H3}
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
GSH/GSSG	Glutathion, reduziert/oxidiert
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
<i>HPLC</i>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAA	Iodacetamid
Ig	Immunoglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
Kana	Kanamycin
K-PO ₄	Kaliumphosphat
M	molar
mA	Milliampere
mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie: ESI: Elektrospray-Ionisation MALDI: Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisation

M_r	relative molekulare Masse
Nadoc	Natriumdesoxycholat
OD	optische Dichte
PDI	Proteindisulfidisomerase
PPI	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
p.A.	pro Analysis
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Units (Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VIS	sichtbar
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

8. Publikationsliste

1. Thies, M.J.W., Mayer, J., Augustine, J.G., Frederick, C.A., Lilie, H. & Buchner, J. (1999). Folding and Association of the Antibody Domain C_H3: Prolyl Isomerization Precedes Dimerization. *J. Mol. Biol.* 293: 67-79.
2. Thies, M.J.W. & Pirkl, F. (2000). Chromatographic Purification of the C_H2 Domain of the Monoclonal Antibody MAK33. *J. Chromatogr. B* 737: 63-69.
3. Thies, M.J.W., Kammermeier, R., Richter, K. & Buchner, J. (2001). The Alternatively Folded State of the Antibody C_H3 Domain. eingereicht.

Folding and Association of the Antibody Domain C_H3: Prolyl Isomerization Precedes Dimerization

Michael J. W. Thies¹, Josef Mayer¹, John G. Augustine²
Christin A. Frederick², Hauke Lilie³ and Johannes Buchner^{1*}

¹*Institut für Organische Chemie und Biochemie Technische Universität München, Lichtenbergstrasse 4 85747, Garching, Germany*

²*Dana Farber Cancer Institute Harvard Medical School 44 Binney Street, Boston MA, 02115, USA*

³*Institut für Biotechnologie Universität Halle, Kurt Motheustrasse 3, 06120, Halle Germany*

The simplest naturally occurring model system for studying immunoglobulin folding and assembly is the non-covalent homodimer formed by the C-terminal domains (C_H3) of the heavy chains of IgG. Here, we describe the structure of recombinant C_H3 dimer as determined by X-ray crystallography and an analysis of the folding pathway of this protein.

Under conditions where prolyl isomerization does not contribute to the folding kinetics, formation of the β -sandwich structure is the rate-limiting step. β -Sheet formation of C_H3 is a slow process, even compared to other antibody domains, while the subsequent association of the folded monomers is fast. After long-time denaturation, the majority of the unfolded C_H3 molecules reaches the native state in two serial reactions, involving the re-isomerization of the Pro35-peptide bond to the *cis* configuration. The species with the wrong isomer accumulate as a monomeric intermediate. Importantly, the isomerization to the correct *cis* configuration is the prerequisite for dimerization of the C_H3 domain. In contrast, in the Fab fragment of the same antibody, prolyl isomerization occurs after dimerization demonstrating that within one protein, comprised of highly homologous domains, both the kinetics of β -sandwich formation and the stage at which prolyl isomerization occurs during the folding process can be completely different.

© 1999 Academic Press

Keywords: crystal structure; antibody; protein folding; C_H3 domain; PPIase

*Corresponding author

Introduction

Folding can be viewed as a hierarchical process starting with local, non-covalent interactions of amino acid residues to form elements of secondary structure, followed by the merging of these elements which finally leads to a unique tertiary structure (Jaenicke, 1987; Baldwin & Rose, 1999). This sequential pathway is especially evident for α -helical proteins where units of secondary structure are defined by interactions of amino acid side-chains close in sequence. In contrast, β -sheet struc-

tures originate from interactions of residues far apart in the amino acid sequence. For these proteins, the smallest stable unit of secondary structure seems to be a β -hairpin, i.e. two β -strands connected by a loop (Muñoz *et al.*, 1997; Schönbrunner *et al.*, 1997b; Ramirez-Alvarado *et al.*, 1999). In some proteins, however, the complete tertiary β -sheet structure is required to stabilize the individual β -strands (Goto & Hamaguchi, 1982a; Pham *et al.*, 1998). This implies that the formation of individual regions of secondary structure must be closely coupled to that of native, tertiary structure. Consistent with these varied requirements, the kinetics of formation of β -sheet structures have been shown to cover a wide range, from hours to milliseconds, indicating that, despite the complexity of the reaction, β -sheet formation is not intrinsically slow. Examples of fast-folding β -sheet proteins include interleukin 1 β which acquires 90% of its native conformation within 25 ms (Varley *et al.*, 1993) and cold shock proteins the

Abbreviations used: ANS, 8-anilino-1-naphthalen sulfonic acid; C_H3, third constant domain of the antibody heavy chain; Fab, fragment of MAK33, containing V_L, V_H, C_L and C_H1; GdmCl, guanidine hydrochloride; NaDoc, sodium desoxycholate; PPIase, peptidyl-prolyl isomerase of the cyclophilin type; MAK33, monoclonal antibody from mouse of the subtype κ /IgG1; NCS, non-crystallographic symmetry.

E-mail address of the corresponding author: johannes.buchner@ch.tum.de

folding process of which is diffusion-controlled (Jacob *et al.*, 1997).

Protein folding has been studied predominantly with small monomeric, one-domain proteins, the unfolding of which is completely reversible (Kim & Baldwin, 1992). In comparison, the quantitative kinetic analysis of the folding reaction of larger and multimeric proteins is often hampered by aggregation as the major irreversible side reaction (Jaenicke, 1987). The mechanism of protein association is far from clear and remains an area of conflicting viewpoints with suggestions ranging from "induced fit" to "lock-and-key" reactions (Shakhnovich, 1999).

Antibodies and their constituent domains which consist of two antiparallel β -sheets linked by a buried disulfide bond (Huber *et al.*, 1976; Deisenhofer, 1981), provide an excellent system to study the folding and assembly of an all β -sheet protein. The folding process of the C_L domain, i.e. the constant part of the immunoglobulin light chain, has been studied extensively by Goto & Hamaguchi (1982a,b). In the intact antibody, this domain associates with the C_H1 domain of the heavy chain. Structure formation of the isolated C_L domain is fast in principle, however slow folding phases occur due to the isomerization of proline-peptide bonds which are in the *cis* configuration in the native state (Goto *et al.*, 1979). This reaction has a high energy barrier and has been identified as a rate-limiting reaction in the folding of a number of proteins (Garel & Baldwin, 1973; Schmid, 1998). Lateron is a class of enzymes that catalyze this isomerization reaction during protein folding (Fischer *et al.*, 1984; Lang *et al.*, 1987; Schmid, 1998).

To further analyze antibody folding we have embarked on studying the structure formation process of the murine monoclonal antibody MAK33. The antibody is directed against the muscle-specific isoform of human creatine kinase (E.C.2.7.3.2.: CK-MM) (Buckel *et al.*, 1987). Using the Fab fragment of MAK 33 (which consists of the entire light chain and the two N-terminal domains of the heavy chain) we wished to know how folding and association are coupled in this system (Lilie *et al.*, 1995). We found that the two chains of the Fab can associate at different stages of folding depending on the isomerization state of the *cis* proline residues and the disulfide bonds between the chains. Specifically, association could precede prolyl isomerization. However, a more detailed analysis was not possible due to the complex pairwise interactions of the four different domains. Furthermore, unfolding is not completely reversible, thus hindering spectroscopic analyses.

In order to further address the relationship between folding and association of antibody domains, we decided to use the C_H3 dimer, the most simple natural model system available. While the domain interactions in the Fab fragment involve two different pairs of domains (V_L-V_H and C_L-C_H1, respectively), the C-terminal domains of the heavy chains (C_H3) associate non-covalently to

form a homodimer. Previously, it had been shown that the C_H3 dimer can be isolated by limited proteolysis (Isenman *et al.*, 1979). Refolding of the unfolded dimer is completely reversible and involves a step which is limited by the isomerization of a proline-peptide bond (Isenman *et al.*, 1979) which is in the *cis* configuration in the native state.

To further investigate β -sheet folding and association in this model system, we cloned the C_H3 fragment of the antibody MAK33 and expressed it recombinantly in *Escherichia coli*. The three-dimensional structure of the recombinant C_H3 dimer was solved by X-ray crystallography. The structure provides an additional means of analyzing the solution data with respect to the protein environment of key residues involved in the folding process of immunoglobulin domains. The kinetic analysis of the folding process allowed us to ask whether intermediates are involved in the folding process and at which stage prolyl isomerization occurs.

Results

The three-dimensional structure of the C_H3 domain of the antibody MAK33

The three-dimensional structure of the C_H3 domain was determined using the molecular replacement method. Crystallographic data and refinement statistics are listed in Table 1. The protein exists in the crystal as a dimer, the overall structure of which is shown in Figure 1(a). Each monomer is crystallographically independent and exhibits the tertiary structure found in the C1 subset of constant domains as defined by Williams & Barclay (1988). The root-mean-square (rms) deviation for the superposition of the two monomers of the dimer, using only all C α atoms or all atoms of the two monomers, is 0.14 Å and 0.34 Å, respectively (the first three residues are excluded in both cases). The C_H3 monomer consists of two β -sheets composed of strands A, B, E, D and strands G, F, C, C', respectively. The two sheets are connected by a canonical intradomain disulfide linkage between Cys28 of strand B and Cys86 of strand F. As in other immunoglobulin domains, the disulfide bond is buried within the protein molecule and is surrounded by numerous hydrophobic residues, in particular, Val9, Ile30, Val40, Trp42, and Val88, all of which lie within van der Waals contact distance (<4.5 Å) to either of the cysteine residues. The fluorescence of Trp42 is quenched as a consequence of its proximity to this intramolecular disulfide bridge under native conditions. From the structure it is clear that displacement of Trp42 from the immediate environment of the disulfide linkage, resulting in a marked increase in the fluorescence intensity, destabilizes the protein and thus provides a marker for the unfolded state in solution studies.

Table 1. Data collection and refinement statistics

A. Data collection	
Space group	P21
Unit-cell dimensions: (a, b, c) (Å)	48.74, 42.78, 50.46
B (deg.)	105.93
Resolution range (Å)	50.0 - 2.2
Unique reflections	10,340
Redundancy	5.58
Completeness (%)	93.4 (83.6)
R _{merge} (%) ^a	10.4 (27.3)
I/s	10.1 (3.2)
B. Refinement	
No. of protein atoms	1622
No. of water molecules	88
Resolution range (Å)	8.0 - 2.2
Unique reflections	9338
Completeness (%)	92.5
R-factor (%) ^b	20.5
Free R-factor (%) ^c	25.7
rmsd from ideal values ^d : bond length (Å)	0.006
rmsd from ideal values ^d : bond angles (deg.)	1.15
Temperature factor: all atoms	32.25
Temperature factor: main-chain atoms	30.84
Temperature factor: side-chain atoms	38.07
Temperature factor: water molecules	43.30

Values in parenthesis correspond to the highest resolution shell (2.20-2.26Å).

^a $R_{\text{merge}} = S|I - \langle I \rangle|/S\langle I \rangle$.

^b $R\text{-factor} = S|F_o - F_c|/S|F_o|$.

^c Free R is as for R-factor but calculated for a test set of 5% comprising reflections not used in the refinement.

^d Root-mean-squared deviations (rmsd) are given from ideal values.

Another hallmark of immunoglobulin domains is the presence of at least one *cis*-proline residue. As mentioned above, the isomerization of this proline-peptide bond from a *trans* to a *cis* configuration is a rate-limiting step in the folding of Ig domains (Isenman *et al.*, 1979). It has recently been shown that the immediate environment surrounding the proline residue in the antibody domains influences the rate of isomerization catalyzed by prolyl peptidyl *cis/trans* isomerase (Lilie *et al.*, 1995). In C_{H3}, a *cis*-proline peptide bond is found at residue 35 located in the loop connecting strands B and C (Figure 1(a)). This residue is located in a small pocket on the surface of the protein, and within a 3.2 Å radius there are two bulky hydrophobic side-chain residues, Phe34 and His90. Also, the side-chain of Glu91 lies over the main-chain of the proline residue, forming an additional barrier to isomerization.

Based on the sequence alignment of more than 75 different immunoglobulin domains only one of them, gc3 from mouse, does not have a proline residue (it has a serine residue instead) at the corresponding C_{H3} *cis*-proline position (Wels *et al.*, 1984). A survey of six immunoglobulin structures indicates that, like in the C_{H3} structure, this proline residue is always found in the *cis* configuration in the intact heavy chain. The *cis*-proline in all cases stacks on the preceding hydrophobic residue, which is usually a Phe or Tyr.

The dimeric interface (Figure 1(b), (c) and (d)) between the two monomers is composed of conserved residues found within the A, B, E, D β-sheet. Salt bridges at the ends of the dimeric interface are formed between the acidic residues of loop DE of each monomer and basic residues of loop AB of the opposing monomer (Figure 1(d)). Highly conserved hydrophobic residues found on strand F of each monomer stack in the middle of the interface. These include the three bulky hydrophobic residues Phe66, Tyr68 and Lys70.

The stability of recombinant C_{H3}

The stability of the recombinant C_{H3} domain was analyzed by guanidine hydrochloride (GdmCl)-induced unfolding/refolding transitions. The shift of the equilibrium between native and denatured states was monitored both by fluorescence and CD spectroscopy. Because the C_{H3} domain is a homo-dimer under native conditions, the denaturation process of C_{H3} comprises both dissociation and unfolding reactions.

We studied the denaturation process at different C_{H3} concentrations. Upon unfolding, the fluorescence emission wavelength of C_{H3} was red-shifted (343 nm → 353 nm) and the fluorescence intensity increased threefold. As shown in Figure 2, at a C_{H3} dimer concentration of 0.3 μM or higher, no significant change in signal occurred at GdmCl concentrations lower than 0.4 M GdmCl. The complete loss of tertiary structure was reached at GdmCl concentrations higher than 1.4 M GdmCl. Between 0.4 and 1.3 M GdmCl, the protein undergoes a cooperative conformational transition with the respective midpoints depending on the protein concentration. A 20-fold increase in protein concentration (6.1 μM C_{H3} dimer) caused a shift of the transition midpoint from 0.75 M to 1.0 M GdmCl. In addition to tertiary structure, we monitored the loss of secondary structure during unfolding by CD measurements. The transition from the native to the unfolded protein was again cooperative, with a midpoint at 1.0 M GdmCl at 4.1 μM dimeric C_{H3} (Figure 2). This agrees well with the results from the fluorescence measurements performed at the same protein concentration. The identical results obtained from the transitions measured by fluorescence and CD are an indication of a two-state equilibrium unfolding transition. An isoemissive point observed for the fluorescence spectra of the native and the denatured protein confirms this two-state behavior (data not shown). Since it is very unlikely that more than two species exhibit the same fluorescence intensity at this wavelength, the denaturation equilibrium of C_{H3} can be described by a two state transition, according to equation (1):



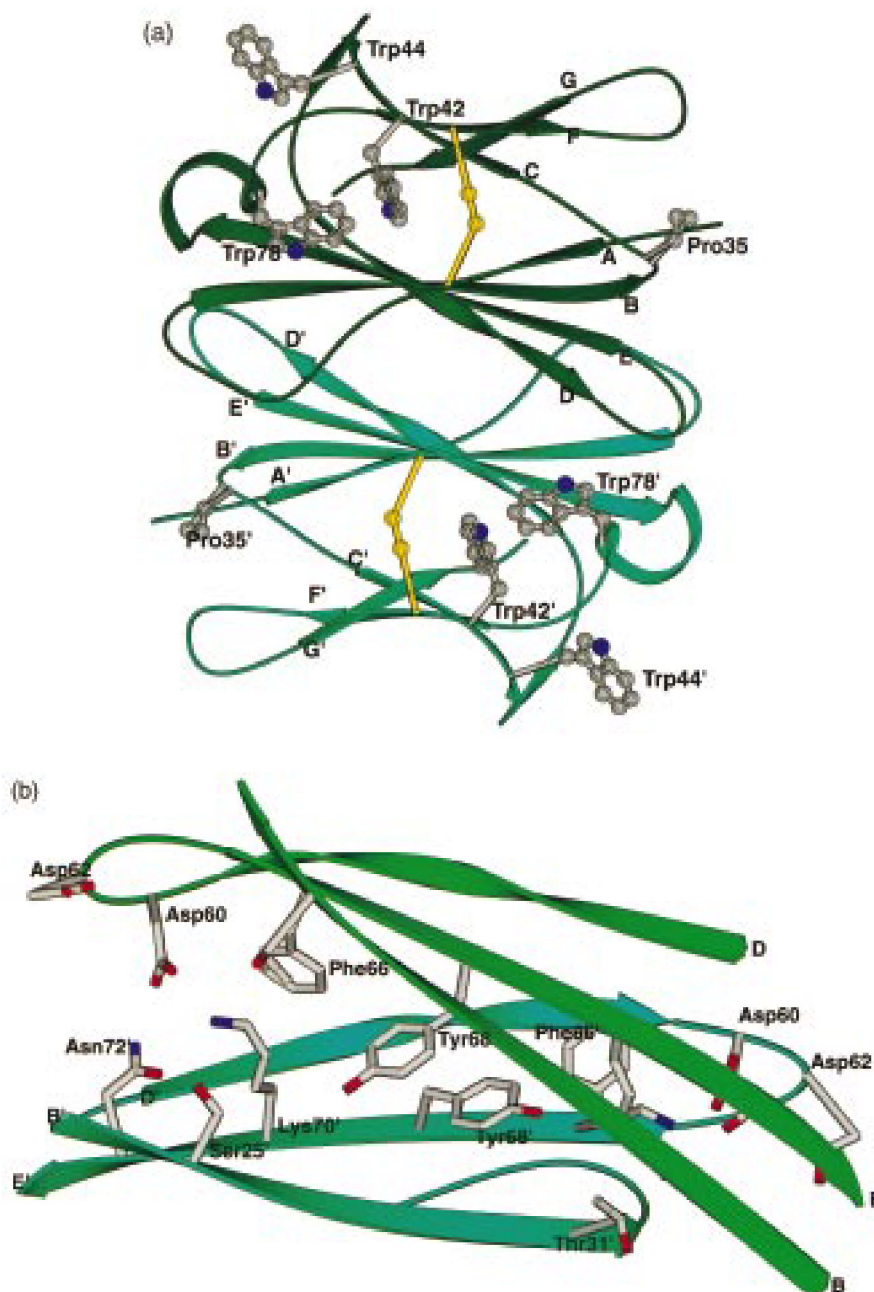


Figure 1 (legend opposite)

with N_2 representing the native, dimeric C_{H3} , and U the unfolded monomer.

Taken together, the results show that the unfolding of C_{H3} is completely reversible. It was not possible to detect any intermediates at equilibrium conditions due to the highly cooperative nature of the transitions. Calculating the stability for C_{H3} by linear extrapolation according to Neet & Tim (1994) from the data shown in Figure 2 resulted in a value for $\Delta G_{U \rightarrow N}$ of $-66.5(\pm 1.5)$ kJ mol $^{-1}$.

Folding of C_{H3} is not concentration-dependent

To investigate the folding process of C_{H3} , the protein was first completely denatured in 6 M GdmCl at room temperature for two hours. Then, folding and reassociation were initiated by a 240-fold dilution of the denaturant at 4 °C. The acquisition of the native conformation, as monitored by fluorescence and CD, is slow and can be described adequately only by three exponential phases

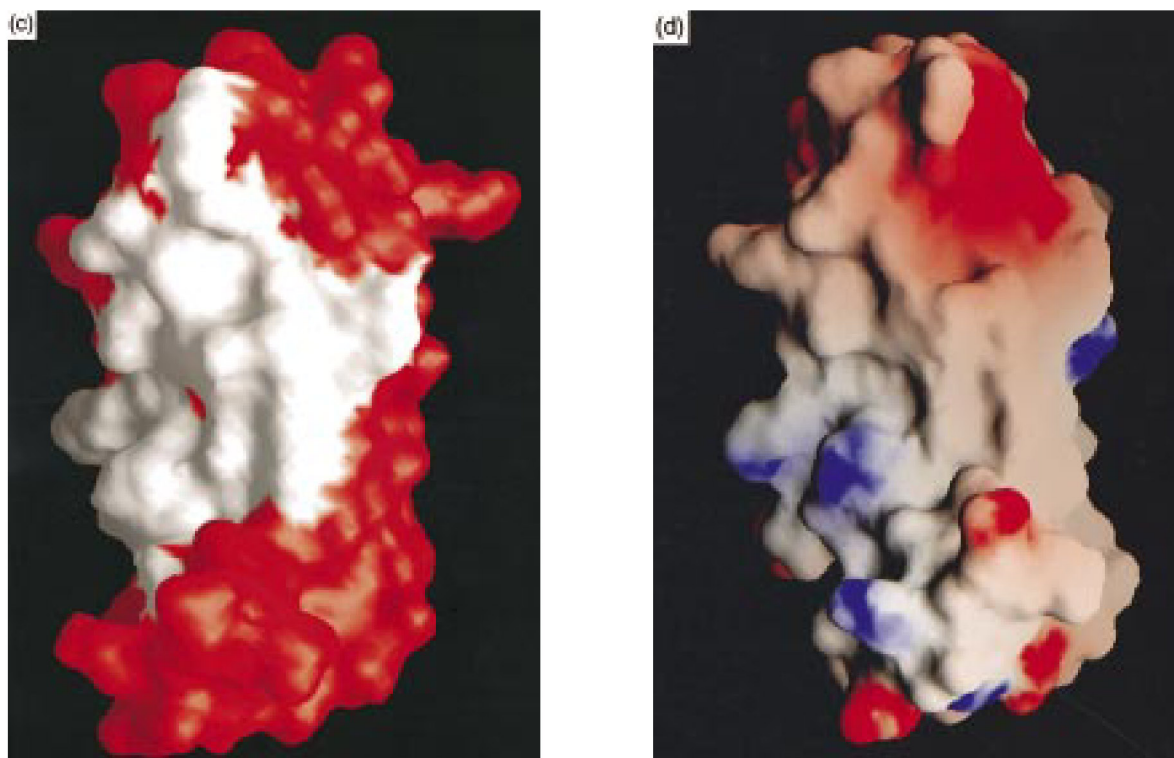


Figure 1. Diagram and GRASP model of the C_{H3} domain. (a) Overall dimeric model of C_{H3}. The tryptophan and *cis*-proline residues are in ball-and-stick representation. The disulfide bridge connecting the sheets of each monomer is highlighted in yellow. This Figure was generated in SETOR (Evans, 1993). (b) Interface of the C_{H3} dimer. The residues interacting within the dimeric interface are indicated in stick representation. This Figure was generated in SETOR (Evans, 1993). (c) A representation of a C_{H3} monomer with the dimerization interface in white. (d) A surface representation of the dimeric interface of a C_{H3} monomer showing positive (in blue), negative (in red) and neutral (in white) charged surfaces. This model was made using GRASP (Nicholls & Honig, 1991).

(Figure 3(a) and (b)). The first exponential phase had an apparent rate constant of $k_1 = 1.1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ and accounted for 14% of the fluorescence signal. The rates of the other folding phases were $k_2 = 5.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $k_3 = 1.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ with an amplitude of reaction of 86%. The folding steps characterized by k_2 and k_3 are consecutive and the reaction with the rate of k_1 occurs in parallel (see below).

In Figure 3, the signal of the refolding kinetics is compared to the signal of the native and the denatured protein. These data show that 82% of the total change in signal could be detected by fluorescence and 80% by CD. Since the manual mixing experiments have a dead time of about five seconds, these results imply that the lacking signal represents changes in secondary or tertiary structure which occur during this time span. To further analyze the initial folding reactions, stopped-flow fluorescence experiments with a dead time of 2 ms were performed. Here, 10% of the change in signal occurred in the dead time of the measurement suggesting that there may be some rapid structural changes upon initiation of refolding. Whether

some C_{H3} molecules reach the native state in a fast folding reaction or whether a common intermediate is formed is not resolved by these experiments.

Since C_{H3} is a dimer even at a concentration as low as 10^{-10} M (Isenman *et al.*, 1979), the protein concentration could have an effect on the folding kinetics if association of C_{H3} is rate limiting. The analysis of refolding kinetics performed at different C_{H3} concentrations showed that none of the three phases were influenced, suggesting that either dimerization is not rate limiting during refolding, or that this process did not cause any change in signal. Since we know from the crystal structure that there is no tryptophane residue in the dimer interface, a direct influence of association on the fluorescence properties of C_{H3} was not expected (Figure 1(a) and (b)).

Taken together, the folding kinetics of C_{H3} can be described by three rate constants (k_1 , k_2 and k_3). Additionally, part of the change in signal (10% in stopped-flow measurements) could be either attributed to rapid reactions on one folding pathway or to the general formation of a fast folding species of C_{H3}.

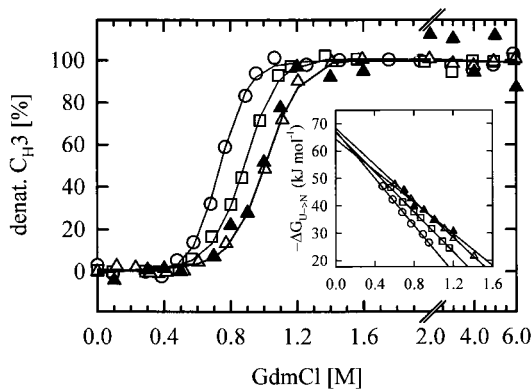


Figure 2. GdmCl-dependent unfolding and refolding transitions of C_{H3}. Samples were incubated for six days at 20 °C in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) and varying GdmCl concentrations. For the fluorescence measurements the excitation wavelength was set to 280 nm. Spectra were recorded from 290 to 400 nm and analyzed at 355 nm. The C_{H3} dimer concentration was 0.2 μM (○), 1.6 μM (□) and 4.1 μM (△), respectively. For the CD experiment, the ellipticity was recorded at 213 nm (▲) at a protein concentration of 4.1 μM. All measurements were carried out at 20 °C.

Prolyl isomerization is a rate-limiting step in C_{H3} folding

The isomerization of the Xaa-Pro peptide bond is a rate-limiting step in C_{H3} folding (Isenman *et al.*, 1979). To analyze which phase of the folding reaction is affected by prolyl isomerization, we decided to use a peptidyl-prolyl isomerase (PPIase) of the cyclophilin type ($k_{\text{cat}}/K_m = 6.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) to catalyze this step (Lilie *et al.*, 1993). In its native structure, C_{H3} contains one *cis* proline residue (Pro35) which is part of an exposed loop (Figure 1(a)). Therefore, this residue should be accessible to the folding catalyst. To determine the contribution of proline *cis-trans* isomerization during folding of C_{H3}, refolding experiments were performed in the presence of a fivefold molar excess of PPIase. As shown in Figure 3(a), addition of PPIase strongly accelerated the folding process. A further increase of the PPIase concentration had no additional effect on the refolding kinetics. Analyzing the rate constants of the folding kinetics showed that one of the slow reactions was accelerated markedly in the presence of PPIase. This result was confirmed by double-jump experiments (data not shown). In these experiments, C_{H3} was unfolded for only a few seconds. This is sufficient to completely dissolve secondary and tertiary structure, but the isomeric state of the Pro-peptide bond remains unchanged (Schmid, 1986). Furthermore, the slow phase depended on prolyl isomerization as well as the GdmCl concentration (data not shown), suggesting that the isomerization is linked to a change in the conformation of the pro-

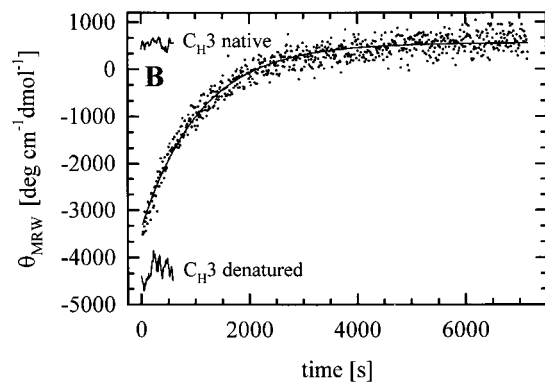
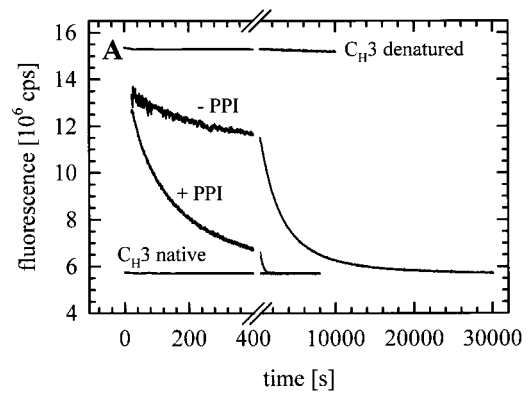


Figure 3. Refolding kinetics of C_{H3}. (a) The regain of native fluorescence were monitored at a C_{H3} dimer concentration of 0.3 μM by tryptophan fluorescence in 0.1 M Tris-HCl, 25 mM GdmCl (pH 8.0), at 4 °C. The excitation wavelength was set to 295 nm. Emission was detected at 355 nm. C_{H3} was denatured for two hours in 6 M GdmCl at room temperature. Acceleration of the folding reaction was achieved by addition of fivefold molar excess of PPIase. (b) CD kinetics were performed in the same buffer at the same temperature. Ellipticity was recorded at 213 nm. The concentration of dimeric C_{H3} was 8.2 μM.

tein. The other two phases are not influenced by prolyl isomerization. Since the two slow reactions are very similar in their rate constants, it was not possible to assign the prolyl isomerization to one of these reactions based on this experiment only. Therefore, a more detailed analysis, directly measuring the population of a proline-determined folding intermediate, was performed.

Refolding of denatured C_{H3} is decelerated by an intermediate

The major folding pathway of C_{H3} involves at least one kinetically trapped folding intermediate. To investigate the appearance of this intermediate, we carried out triple-jump experiments. In these experiments, the C_{H3} domain was first completely unfolded. Then the protein was allowed to refold

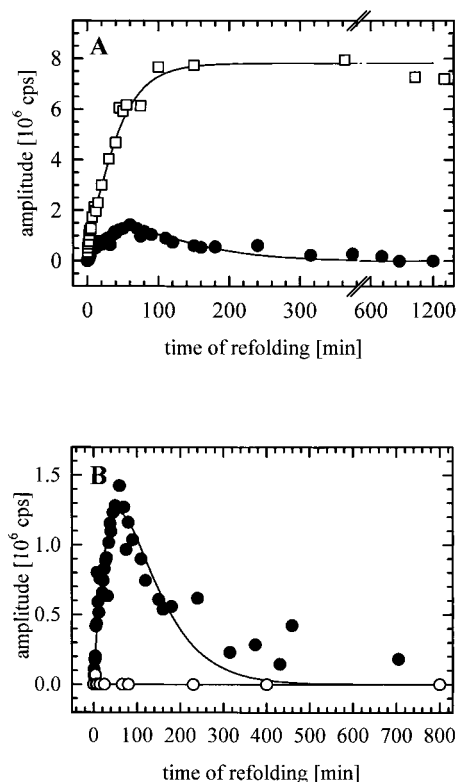


Figure 4. Population of a C_{H3} folding intermediate. For the triple-jump experiments, refolding was carried out in 0.1 M Tris-HCl, 25 mM GdmCl (pH 8.0), at 4 °C. The dimer concentration of C_{H3} was 0.3 μM. At different points of time, the unfolding reaction was initiated by adding GdmCl to a final concentration of 2.5 M. The final protein concentration was 0.2 μM. Fluorescence kinetics were monitored at 355 nm. The excitation wavelength was 295 nm. (a) Amplitude distribution of the formation of native C_{H3} (□) and of the population of the folding intermediate (●). (b) Population of the intermediate in the presence (○) and absence (●) of a five-fold molar excess of PPIase.

and, after different times (0 - 1440 minutes), GdmCl was added to initiate unfolding. This procedure allows us to measure the amount of native C_{H3} and the folding intermediate by their stability as determined by GdmCl-induced unfolding (Schmid, 1986). Whereas unfolding of native C_{H3} can be described by a mono-exponential fit, unfolding of refolded C_{H3} in triple-jump experiments yielded denaturation kinetics which consist of two phases (data not shown). The rate constant for the slow phase ($k_u^s = 2.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) corresponds to the unfolding of native C_{H3}, whereas the fast one ($k_u^f = 3.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) represents the denaturation of a folding intermediate. Figure 4(a) shows the amplitude distribution for the formation of native C_{H3} and the population of the intermediate during refolding. Importantly, there is no lag phase in the formation of native protein (represented by open squares) as would be expected for a serial mechanism. Instead, at the beginning of the folding process

native C_{H3} is formed more rapidly than the intermediate, clearly indicating a parallel folding pathway. Compared with the rate constants obtained from the renaturation kinetics (k_1 , k_2 , k_3), the formation of the native C_{H3} domain as determined from the amplitude distribution can be described adequately by the same mechanism with the same rate constants $k_1^t = 1.0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_2^t = 1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $k_3^t = 5.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (the exponent t indicates that these values were obtained from triple-jump experiments). Furthermore, this experiment confirmed that some C_{H3} molecules reach the native state in a fast reaction (Figure 4(a); compare also Figure 3(a) and (b)). The second curve in Figure 4(a) (described by the filled circles) represents the population of the intermediate during folding. The intermediate appeared with the rate constant $4.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (k_a) and subsequently disappeared with the rate constant $5.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (k_d). These results imply that the slow rate constants (k_2 , k_3) obtained from the refolding experiments are due to the formation and disappearance of this folding intermediate, because they are very similar to the values of k_a and k_d , respectively.

To test whether prolyl isomerization is involved in the formation of the intermediate, we performed triple-jump experiments in the presence of PPIase. In Figure 4(b), the amplitude distributions of the intermediate in the presence and absence of PPIase are compared. In the presence of PPIase, only a small amount of intermediate could be detected in the early beginning of the refolding process. Moreover, the time course of formation and disappearance is altered markedly. The maximum accumulation of the intermediate is shifted to about two minutes compared to 60 minutes in the absence of PPIase. This implies that mainly the reaction which is responsible for the disappearance of the intermediate must be accelerated by PPIase causing the low accumulation of the intermediate.

Based on these data, simulations were performed supposing that the folding process can be described by a sequence of reactions which starts from the denatured state, comprises the formation of the intermediate (with the respective rate constant k_a) and the subsequent regain of the native state. A mechanism consisting of two serial folding reactions ($U \rightarrow I \rightarrow N$) failed to describe the kinetics of C_{H3} formation and intermediate population adequately. However, a fit considering an additional parallel pathway gave excellent agreement with the experimentally determined rate constants (see Materials & Methods). Additionally, extrapolation of the amplitude of the native C_{H3} to 0 minute refolding resulted in a small fraction of an additional folding species (about 5%). This might indicate a fast-folding species which reached the native state within the dead time of the experiment.

Notably, these results show that the majority of C_{H3} molecule folds *via* an intermediate to the native state (equation (2a)). This intermediate is

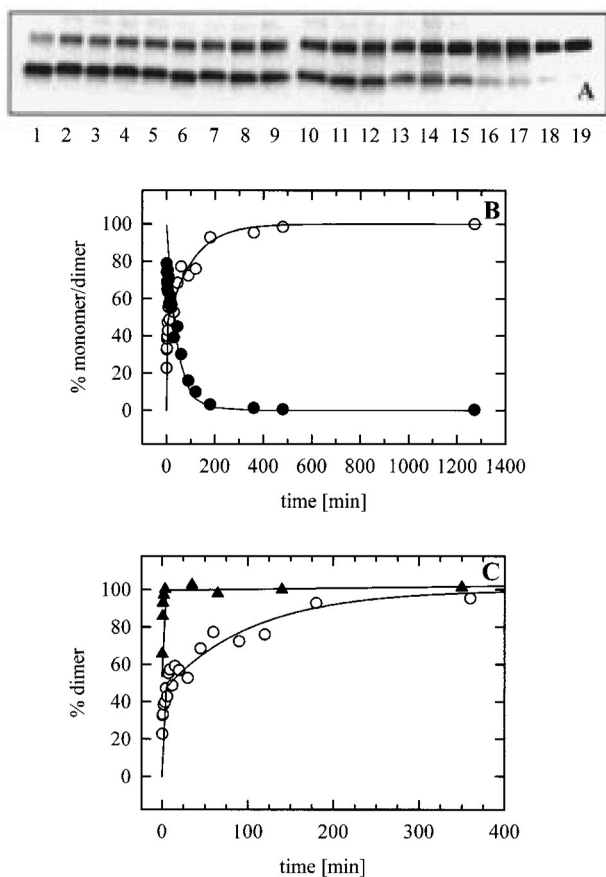


Figure 5. Dimerization of C_{H3} during refolding. Crosslinking experiments were carried out in 50 mM Hepes (pH 8.0), at 4°C. The C_{H3} dimer concentration was 0.3 μ M. During refolding, samples of 5 μ g protein were taken, crosslinked with glutaraldehyde and precipitated. (a) Coomassie-stained SDS gel. (b) Time course for the formation of the C_{H3} dimer (○) and for the disappearance of the monomer (●). (c) Influence of PPIase on the time course of association of C_{H3} . Dimer formation without PPIase (○) is compared to the association in the presence of PPIase (▲).

mined to be only -23 kJ mol^{-1} which is comparable to the stabilities of the C_L (Sumi & Hamaguchi, 1982) and the V_L domain (Rowe & Tanford, 1973). This value was obtained from a calculation using the binding model for denaturants according to Tanford (1970) and Pace & Vanderburg (1979). This model was developed for monomeric proteins. Therefore the calculation may have yielded an underestimated ΔG^0 value for human C_{H3} . Calculating ΔG^0 for C_{H3} from MAK33 in the same way as for human C_{H3} resulted in a lower stability of -30 kJ mol^{-1} . Thus, the suggestion that antibody domains exhibit similar thermodynamic stabilities (Sumi & Hamaguchi, 1982), may be true only for monomeric domains. Since the C_{H3} dimer clearly deviates from this behavior, association seems to contribute significantly to the stabilization by additional non-covalent intermolecular interactions (Figure 1(b)). In agreement with this sug-

gestion, amino acid side-chains forming a patch at the center of the dimerization interface of C_{H3} have been shown to be the energetic key residues in domain dissociation and unfolding (Dall'Acqua *et al.*, 1998). These well-defined interactions between the two monomers may be responsible for the slow denaturation of the domain compared to other proteins of the same size (Sumi & Hamaguchi, 1982; Iseman *et al.*, 1979).

The β -sheet folding is an entropically ambitious event. Amino acid residues, which are far apart in the polypeptide chain, must interact correctly in the three-dimensional space to form stabilizing interactions (Clark *et al.*, 1997). Dependent on the length of the polypeptide chain between the corresponding residues, several trials may be necessary to achieve a stable "native" interaction. Therefore, the overall folding process of complex β -sheets, such as the β -barrel of C_{H3} , is much slower than α -helix formation. Nevertheless, in addition to the spectroscopically accessible folding phases, a fast "burst phase" reaction which could not be resolved even by stopped-flow techniques is also part of the folding pathway of C_{H3} . In contrast to the literature, in which burst phase values of about 30% of the entire amplitude (Matthews, 1993) were reported, we could only detect a small burst phase (10%) for the folding of C_{H3} . This burst phase during C_{H3} folding was not caused by a hydrophobic collapse, since no ANS binding could be observed. Interestingly, the small β -sheet proteins tendamistat and Csp showed no loss in signal due to a hydrophobic collapse (Schönbrunner *et al.*, 1997a; Jacob *et al.*, 1997). These results indicate that rapid chain collapse is not an essential step in protein folding. In the case of C_{H3} , it might be that the loss of signal represents a fast-folding species reaching the native state in the dead time of the measurement. Also, a contribution to this change in signal could be the dilution of the denaturant and therefore the altered solvent environment (Qi *et al.*, 1998). We suggest that a minority of fast-folding molecules reach the native state during the dead time of the measurement on an additional, parallel folding pathway in agreement with the finding that about 5% of the C_{H3} molecules become native in the dead time of the triple-jump experiment.

Analyzing the accessible kinetics of β -sheet protein folding revealed that small β -sheet proteins, in which folding is not influenced by prolyl isomerization and association reactions, reaches the native state in an apparent one-step reaction within milliseconds (Schönbrunner *et al.*, 1997a; Jacob *et al.*, 1997). In contrast, folding of immunoglobulin domains seems to be a more time-consuming process than folding of simple β -sheet proteins. The refolding kinetics of the monomeric C_L domain take a few seconds after short-time denaturation where the *cis/trans* prolyl isomerization does not contribute to the folding kinetics (Goto & Hamaguchi, 1982a). In contrast, folding of short-time denatured C_{H3} is completed within about 200

seconds at room temperature. Thus, even in the absence of prolyl isomerization, folding of C_{H3} is much slower than that of the C_L domain. Since dimerization is not rate limiting under these conditions, the results imply that the kinetics of β -barrel formation is significantly different in the two highly homologous antibody domains.

After long-time denaturation, where proline re-isomerization contributes to the refolding kinetics, C_L folds much slower to the native state than after short-time denaturation. The refolding kinetics consisted of two phases and was completed after 150 seconds at 25 °C (Goto & Hamaguchi, 1982a). In contrast, folding of the C_{H3} after long-time denaturation takes 60 minutes at 20 °C and five hours at 4 °C, respectively. Focussing on this slow pathway (determined by the rate constants k_2 and k_3), we found that the majority of the C_{H3} molecules fold *via* an intermediate to the native state. This majority originates from the equilibrium between C_{H3} molecules with Pro35 in *trans* and molecules with Pro35 in the native *cis* configuration in the denatured state. We found that upon long-time denaturation, about 95% of the molecules contain a *trans* Pro35-peptide bond. The reason for the population of the folding intermediate and the rate-limiting step of the entire folding reaction is the isomerization of this Pro35-peptide bond from the *trans* to the *cis* configuration (represented by the rate constant k_3). Altering the velocity of this reaction by changing the temperature or by addition of PPIase confirmed that this reaction is responsible for the appearance and disappearance of the intermediate. The subsequent dimerization is a fast reaction, both in short-time denatured C_{H3}, where Pro35 remains in the native configuration or when prolyl isomerization is catalyzed by PPIase. The activation energy of prolyl isomerization reactions of about 80 kJ mol⁻¹ (Schmid, 1998) is a high barrier in protein folding which many proteins must overcome to reach the native state. Especially in antibodies, which contain many *cis* proline residues in the native structure (Huber *et al.*, 1976; Deisenhofer, 1981), the isomerization process is often rate limiting in folding (Goto & Hamaguchi, 1982a; Lang *et al.*, 1987; Lilie *et al.*, 1993, 1995; Freund *et al.*, 1996; Jaeger & Plückthun, 1997) and the reason for the accumulation of folding intermediates.

Prolyl isomerization can be accompanied by changes of the secondary and tertiary structure of the protein. This becomes evident when the rate of isomerization is influenced by the presence of a denaturant. In antibody domains this is not always the case. For the C_L domain, the isomerization reaction was not influenced by GdmCl (Goto & Hamaguchi, 1982a). In agreement with this finding, we had previously shown that in MAK33 Fab, re-isomerization of the *cis*-proline-peptide bond is not a prerequisite for association of the monomers during the folding process (Lilie *et al.*, 1995). Association occurred regardless of the isomeric state. Interestingly, the isomerization reaction

could be efficiently catalyzed by PPIase even in the dimeric folding intermediate (Lilie *et al.*, 1993). In contrast, C_{H3} can only dimerize when the Pro35-peptide bond is in the *cis* configuration. Since this isomerization reaction is GdmCl-dependent, it is reasonable to assume that structural changes are involved which are necessary to form the association-competent domain interface. The crystal structure suggests that Pro35 is engaged in a hydrogen bond with His90 and may thus contribute to the stabilization of the β -sheet. In the absence of this interaction (i.e. in the *trans* configuration of the Pro35-peptide bond), His90 could move around and disrupt the packing.

Taken together, our results imply that for highly homologous antibody domains, both the kinetics of β -sheet formation and the relationship between prolyl isomerization and association are completely different. The molecular basis for these differences remains to be elucidated.

Materials and Methods

Reagents

PPIase (Cyclophilin A from human T-cells) was a kind gift from Dr Kurt Lang (Roche Diagnostics). Polymyxin B sulfate was from Sigma.

Protein expression and purification

The *E. coli* strain JM83 containing the plasmid pSM20 was used for the expression and periplasmic secretion of C_{H3}. The cells were grown in SB medium at 26 °C. A 1 mM sample of IPTG was added to start the expression and 2 mM GSSG to create an oxidizing environment required for disulfide bond formation. After 24 hours, the cells were harvested and the pellet was resuspended in 50 mM NaCl, 20 mM Mops (pH 7.5) followed by an additional centrifugation step. The periplasmic protein contents were extracted by treating the cells with 10 mM Mops, 5 mM EDTA (pH 7.0) and 1 mg/ml polymyxin-B sulfate (Storm *et al.*, 1977). The solution was shifted to pH 5.0 and loaded onto a SP Sepharose column (Amersham Pharmacia). Bound protein was eluted with a linear salt gradient (0 to 0.5 M NaCl) in 50 mM sodium phosphate, 50 mM Tris-HCl (pH 5.0). After the pH was shifted to 8.0 and the solution was dialyzed against 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), the protein was loaded on a Superdex 75 pg gel filtration column (Amersham Pharmacia). The purity of the eluted protein was confirmed by silver-stained SDS-Page.

Crystallization and data collection

Crystals were grown from sitting drops containing equal volumes of 10 mg/ml C_{H3} (0.4 mM dimer concentration) and reservoir solution containing 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) and 2.0 M ammonium sulfate at 18 °C. Large (0.15 mm \times 0.04 mm \times 0.08 mm), single crystals grew within one week. Diffraction data were collected at room temperature from CuK α radiation generated by a Rigaku RTP500 RC rotating-anode generator using a Mar imaging plate. The crystals belong to space group *P*21 with cell dimensions $a = 48.74 \text{ \AA}$, $b = 42.78 \text{ \AA}$, $c = 50.46 \text{ \AA}$ and $B = 105.93^\circ$. The crystallographic asymmetric unit

contains two monomers and approximately 41% solvent with a Matthews Coefficient of 2.1 Å³/Da and a cell volume of 100,982 Å³ (Collaborative Computational Project, 1994). Reflection files were indexed using the program DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) and subsequently scaled by the program SCALEPACK(2). A summary of data collection statistics is shown in Table 1.

Structure determination and model refinement

The structure of the C_{H3} domain was solved by the molecular replacement method using a monomeric sub-unit of the human Fc2 immunoglobulin gamma-1 chain (Deisenhofer, 1981), the amino acid sequence is 61% identical with that of C_{H3}, as a search model in the AMoRe program (Navaza, 1994). The rotation function calculation yielded one prominent peak with a correlation coefficient of 9.6 as opposed to 7.2 for the next highest peak. The first-body translation search found two solution vectors with correlation coefficients of 29.8 and 27.3 as opposed to the next highest solution with a correlation coefficient of 19.2. The rotation functions found within the two highest translation peak solutions correspond with the first and fifth rotation peaks, respectively. A second-body translation search confirmed these two solutions from the first-body translation. The human Fc2 input model was then transformed using the two rotation and translation vectors to yield the "C_{H3} molecule" model. After an initial rigid body refinement a $2F_o - F_c$ map was calculated yielding a strong electron density and the molecular packing was checked showing no conflicts between symmetry-related molecules. Side-chains of the solution were then mutated and rebuilt into the initial C_{H3} molecule model with the program O (Jones *et al.*, 1991). In the subsequent position and B-factor refinements utilizing XPLOR (Brünger, 1992), non-crystallographic symmetry (NCS) restraints and solvent flattening were applied. After three rounds of refinement, the NCS restraints were removed and water molecules were finally added to the model using the wARP program (Perrakis *et al.*, 1997). The first three residues of each monomer gave no traceable electron density, so they were not included in the final refinement and model. Of the non-glycine residues, 93.2% are in the most favored regions, while no residues lie in the energetically disallowed regions of the Ramachandran plot. Overall refinement statistics are given in Table 1.

Guanidine hydrochloride denaturation measurements

Guanidine hydrochloride (GdmCl) denaturation transitions were measured at different protein concentrations in the case of the fluorescence experiments, and at a C_{H3} dimer concentration of 4.1 μM in the circular dichroism (CD) experiments. All experiments were carried out in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), at 20°C and different GdmCl concentrations. The samples were incubated for six days at room temperature to achieve equilibrium. The fluorescence excitation wavelength was set to 280 nm. The emission spectra were recorded from 290 to 400 nm and analyzed with regard to the shift of the fluorescence maximum and the change in the intensity at 355 nm. The ellipticity was detected at 213 nm. The exact GdmCl concentration of the samples was calculated from the respective refraction indices (Schmid, 1989). The free energies of the unfolding transitions were fitted as

described by Neet & Tim (1994), Tanford (1970) and Pace & Vandenburg (1979).

Spectroscopic techniques

Circular dichroism (CD) spectra and kinetics were recorded in a Jasco J 715 spectropolarimeter with a PTC 343 peltier unit. The experiments were carried out in quartz cuvettes of 0.1 and 0.5 cm pathlength. Far-UV CD spectra were recorded from 190 to 250 nm in 50 mM KH₂PO₄ (pH 8), at 20°C. All spectra were buffer-corrected. Kinetics were measured at 213 nm in 0.1 M Tris-HCl (pH 8), at 4°C.

The fluorescence of C_{H3} was determined using a Spex FluoroMax-2 fluorimeter and a 1 cm stirred and thermostated cell. The excitation wavelength was set to 280 or 295 nm. Spectra were recorded from 290 to 400 nm. For kinetics, the fluorescence emission was detected at a wavelength of 355 nm. The spectral bandwidths were 2 nm for excitation and 7 nm for emission, respectively.

Stopped-flow measurements

Stopped-flow experiments were performed in a SX-18MV stopped-flow spectrofluorimeter (Applied Photophysics) with a thermostated cell. The conditions were the same as described for the fluorescence measurements.

Triple-jump experiments

This type of experiment is based on the different stability of folding intermediates and the native state of a protein against denaturation. First, C_{H3} was completely unfolded in 6 M GdmCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 8) for two hours at 20°C. Then, folding was initiated by diluting the denaturant ([GdmCl] = 25 mM, [C_{H3} dimer] = 0.3 μM). After different times (0 - 1440 minutes) unfolding was initiated by increasing the GdmCl concentration to 2.5 M ([C_{H3}] = 0.2 μM). Folding intermediates which were formed during the time range of refolding, unfold with different kinetics due to their intrinsic stability. Since unfolding of C_{H3} is characterized by one rate constant, folding intermediates can be detected by the occurrence of additional folding phases and rate constants, respectively. The folding and unfolding reactions were followed by the change in fluorescence (see above) at 4°C.

Chemical crosslinking and densitometry

Crosslinking was carried out as described by Jaenicke & Rudolph (1989). During renaturation, crosslinking experiments were performed in 50 mM Hepes (pH 8.0); 80 mM glutaraldehyde was added at different time points and, after two minutes at 37°C, the reaction was stopped with 80 mM NaBH₄ in 0.1 M NaOH. The protein was precipitated with sodium desoxycholate (NaDoc) and trichloric acid (TCA) (Bensadoun & Weinstein, 1976), resolubilized in Laemmli-buffer and separated on SDS-PAGE. Additionally, refolding and crosslinking experiments were carried out in the presence of PPIase.

The amount of monomers and dimers of C_{H3} present in the crosslinked samples was quantified by densitometry of Coomassie-stained gels with a Sharp JX-330 scanner. The digitized protein bands were analyzed

using the Image Master 1D Prime software (Amersham Pharmacia Biotech).

Kinetic simulations and curve fits

Renaturation kinetics and triple jump results were simulated and fitted by least-squares calculations with the following equation system using the Sigma Plot software (Jandel Scientific):

$$\begin{aligned}d[U]/dt &= -k_1[U] \\d[U]/dt &= -k_2[U] \\d[I]/dt &= -k_2[U] - k_3[I] \\d[N]/dt &= -k_3[I]\end{aligned}$$

with the unfolded C_H3 [U]₀ = 100, the intermediate [I]₀ = 0, the native protein [N]₀ = 0 and 0 < k₁ < 1, 0 < k₂ < 1 and 0 < k₃ < 1 at the start of the reaction. The underlying model was:



Unfolding kinetics were fitted according to the following model:

$$d[N]/dt = -k_u[N]$$

with 0 < k_u < 1.

Fitting the denaturation kinetics of the triple-jump experiments were achieved by using a fit including two parallel unfolding reactions:

$$d[N]/dt = -k_u^N[N] \quad (\text{for the reaction } N \rightarrow U)$$

$$d[N]/dt = -k_u^I[I] \quad (\text{for the reaction } I \rightarrow U)$$

where I represents an intermediate (0 < k_u < 1, 0 < k_u^I < 1).

Protein Data Bank accession number

The coordinates of the C_H3 dimer have been deposited in the Brookhaven Protein Data Bank with the accession code 1CQK.

Acknowledgments

We thank Holger Grallert for stimulating discussions and Helmut Lenz for support throughout the years. Work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, the European Union and the Fonds der chemischen Industrie.

References

- Baldwin, R. L. & Rose, G. D. (1999). Is protein folding hierarchic? *Trends Biochem. Sci.* **24**, 26-33.
- Bensadoun, A. & Weinstein, W. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 241-250.
- Brünger, A. T. (1992). *XPLOR Version 3.1: A System for X-ray Crystallography and NMR*, Yale University Press, New Haven, CT.
- Buckel, P., Huebner-Parajsz, C., Mattes, R., Lenz, H., Haug, H. & Beaucamp, K. (1987). Cloning and

nucleotide sequence of heavy and light-chain cDNAs from a creatin-kinase-specific monoclonal antibody. *Gene*, **51**, 13-19.

- Clark, P. L., Liu, Z.-P., Rizo, J. & Gierasch, L. M. (1997). Cavity formation before stable hydrogen bonding in the folding of a beta-clam protein. *Nature Struct. Biol.* **4**, 883-886.
- Collaborative Computational Project Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallog. sect. D.* **50**, 760-763.
- Dall'Acqua, W., Simon, A. L., Mulkerrin, M. G. & Carter, P. (1998). Contribution of domain interface residues to the stability of antibody C_H3 domain homodimers. *Biochemistry*, **37**, 9266-9273.
- Deisenhofer, J. (1981). Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9 and 2.8 Å resolution. *Biochemistry*, **20**, 2361-2370.
- Evans, S. V. (1993). SETOR: hardware lighted three-dimensional solid model representations of macromolecules. *J. Mol. Graph.* **11**, 134-138.
- Fischer, G., Bang, H. & Mech, C. (1984). Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta* **43**, 1101-1111.
- Freund, C., Honegger, A., Hunziker, P., Holak, T. A. & Plückthun, A. (1996). Folding nuclei of the scFv fragment of an antibody. *Biochemistry*, **35**, 8457-8464.
- Garel, J. R. & Baldwin, R. L. (1973). Both the fast and slow folding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **70**, 3347-3351.
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982a). Unfolding and refolding of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *J. Mol. Biol.* **156**, 891-910.
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982b). Unfolding and refolding of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the intrachain disulfide bond. *J. Mol. Biol.* **156**, 911-926.
- Goto, Y., Azuma, T. & Hamaguchi, K. (1979). Refolding of the immunoglobulin light chain. *J. Biochem.* **85**, 1427-1438.
- Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P. M., Matsushima, M. & Palm, W. (1976). Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature*, **264**, 415-420.
- Isenman, D. E., Lancet, D. & Pecht, I. (1979). Folding pathways of immunoglobulin domains. The folding kinetics of the C_H3 domain of human IgG1. *Biochemistry*, **18**, 3327-3336.
- Jacob, M., Schindler, T., Balbach, J. & Schmid, F. X. (1997). Diffusion control in an elementary protein folding reaction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 5622-5627.
- Jaeger, M. & Plückthun, A. (1997). The rate-limiting steps for the folding of an antibody scFv fragment. *FEBS Letters*, **418**, 106-110.
- Jaenicke, R. (1987). Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237.
- Jaenicke, R. & Rudolph, R. (1989). Folding proteins. In *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T. E., ed.), pp. 191-223, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of

- errors in these models. *Acta Crystallog. sect. A*, **47**, 110-119.
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1992). Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 247-265.
- Lang, K., Schmid, F. X. & Fischer, G. (1987). Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**, 268-270.
- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R. & Buchner, J. (1993). Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Protein Sci.* **2**, 1490-1495.
- Lilie, H., Rudolph, R. & Buchner, J. (1995). Association of antibody chains at different stages of folding: prolyl isomerization occurs after the formation of quaternary structure. *J. Mol. Biol.* **248**, 190-201.
- Matthews, C. R. (1993). Pathways of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 653-683.
- Muñoz, V., Thompson, P. A., Hofrichter, J. & Eaton, W. A. (1997). Folding dynamics and mechanism of β -hairpin formation. *Nature*, **390**, 196-199.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallog. sect. A*, **50**, 157-163.
- Neet, K. E. & Tim, D. E. (1994). Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.* **3**, 2167-2174.
- Nicholls, A. & Honig, B. (1991). A rapid finite difference algorithm utilizing successive over-relaxation to solve the Poisson-Boltzmann equation. *J. Comp. Chem.* **12**, 435-445.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Pace, C. N. & Vanderburg, K. E. (1979). Determining globular protein stability: guanidine hydrochloride denaturation of myoglobin. *Biochemistry*, **18**, 288-292.
- Perrakis, A., Sixma, T. K., Wilson, K. S. & Lamzin, V. S. (1997). wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple refined dummy atomic models. *Acta Crystallog. sect. D*, **53**, 448-455.
- Pham, T.-N., Koide, A. & Koide, S. (1998). A stable single-layer β -sheet without a hydrophobic core. *Nature Struct. Biol.* **5**, 115-119.
- Privalov, P. L. & Khechinashvili, N. N. (1974). A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J. Mol. Biol.* **86**, 665-684.
- Qi, P. X., Sosnick, T. R. & Englander, S. W. (1998). The burst phase in ribonuclease A folding and solvent dependence of the unfolded state. *Nature Struct. Biol.* **5**, 882-884.
- Ramirez-Alvarado, M., Kortemme, T., Blanco, F. J. & Serrano, L. (1999). β -hairpin and β -sheet formation in designed linear peptides. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 93-103.
- Rowe, E. S. & Tanford, C. (1973). Equilibrium and kinetics of the denaturation of a homogeneous human immunoglobulin light chain. *Biochemistry*, **12**, 4822-4827.
- Schmid, F. X. (1986). Fast-folding and slow-folding forms of unfolded proteins. *Methods Enzymol.* **131**, 70-82.
- Schmid, F. X. (1989). Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T. E., ed.), IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Schmid, F. X. (1998). Catalysis of protein folding by prolyl isomerases. In *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins* (Fink, A. L. & Goto, Y., eds), pp. 361-389, Marcel Dekker Inc. New York.
- Schönbrunner, N., Koller, K.-P. & Kiefhaber, T. (1997a). Folding of the disulfide-bonded β -sheet protein Tendamistat: rapid two-state folding without hydrophobic collapse. *J. Mol. Biol.* **268**, 526-538.
- Schönbrunner, N., Pappenberger, G., Scharf, M., Engels, J. & Kiefhaber, T. (1997b). Effect of preformed correct tertiary interactions on rapid two-state Tendamistat folding: evidence for hairpins as initiation sites for β -sheet formation. *Biochemistry*, **36**, 9057-9065.
- Shakhnovich, E. I. (1999). Folding by association. *Nature Struct. Biol.* **6**, 99-102.
- Storm, D. R., Rosenthal, K. S. & Swanson, P. E. (1977). Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 723-763.
- Sumi, A. & Hamaguchi, K. (1982). Denaturation by guanidine hydrochloride of the Fc(t) and pFc' fragments of human immunoglobulin G¹. *J. Biochem.* **92**, 823-833.
- Tanford, C. (1970). Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Advan. Protein Chem.* **24**, 1-95.
- Varley, P., Gronenborn, A. M., Christensen, H., Wingfield, P. T., Pain, R. H. & Clore, G. M. (1993). Kinetics of folding of the all-beta sheet protein interleukin-1 beta. *Science*, **260**, 1110-1113.
- Wels, J. A., Word, C. J., Rimm, D., Der-Balan, G. P., Martinez, H. M., Tucker, P. W. & Blattner, F. R. (1984). Structural analysis of the murine IgG3 constant region gene. *EMBO J.* **3**, 2041-2046.
- Williams, A. F. & Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily-domains for surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 381-405.

Edited by A. R. Fersht

(Received 6 July 1999; received in revised form 11 August 1999; accepted 20 August 1999)

Chromatographic purification of the C_H2 domain of the monoclonal antibody MAK33

Michael J.W. Thies, Franziska Pirkl

Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität München,
Lichtenbergstrasse 4, 85747 Garching, Germany

Fax: +49 89 289 13345

Phone +49 89 289 13371

email: michael.thies@ch.tum.de

Keywords: antibody; C_H2; MAK33; gel permeation chromatography; hydrophobic interaction chromatography; inclusion bodies; protein folding.

Abstract

The C_H2 domain, one of the constant domains of the murine monoclonal antibody MAK33 (immunoglobulin subtype κ/IgG1), was expressed in *E.coli* forming insoluble inclusion bodies (IBs) and purified by a three step process including a denaturation / renaturation step, hydrophobic interaction and gel permeation chromatography.

After disrupting the cells, the soluble protein fraction was removed by several centrifugation steps. The isolation of the IBs from the cell fragments was achieved by solubilizing the IBs with 6 M guanidinium hydrochloride (GdmCl) and 0.1 M 1,4-dithioerythrit (DTE) to reduce all disulfide bonds. After refolding the C_H2 domain, 1.5 M (NH₄)₂SO₄ was added to the protein solution in order to precipitate contaminations. Then the protein was loaded on a butyl-Sepharose *fast flow* column and eluted with a linear gradient (1.5-0 M (NH₄)₂SO₄). As the last purification step a gel permeation chromatography was run

on a Superdex 75 *prep grade*. Finally, the purity of the C_{H2} protein was determined by a silver-stained sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE). We achieved a typical yield of 0.5 mg pure protein per 1 g of wet cells.

1. Introduction

In contrast to the folding of α -helices, the folding processes which lead to the formation of β -sheet structures are still enigmatic. In this context, an interesting subject of research are all- β proteins such as immunoglobulins. The members of the immunoglobulin superfamily exhibit a modular structure. This allows to dissect the immunoglobulins into heavy and light chains and each of these chains into homologous regions which independently fold to single compact domains. These folding units associate specifically via non-covalent interactions of domain interfaces. Therefore, this protein family represents an ideal model system for analyzing the folding of β -sheet structures.

The domains of immunoglobulins display a folding motif called β -barrel. It consists of two antiparallel β -sheets linked by

a buried disulfide bond forming a hydrophobic core. Investigations on the structure formation of several antibody domains have demonstrated that in principle this process is fast. However, during antibody folding the isomerization of proline peptide bonds to the native-state *cis* configuration [1] which is a slow process is the rate-limiting step for the entire folding reaction [2][3].

The most important prerequisite for the investigation of protein folding is the ability to obtain sufficient quantities of highly pure and native protein. The expression and subsequent export of recombinant proteins into the periplasm have proved to be a successful way for getting soluble native proteins in large amounts. Up to now, this method was used for the production of several antibodies and their fragments in *E.coli* bacterial strains [4][5][6]. In contrast to the cytoplasm, the higher redox potential in the periplasm favors the formation of disulfide bridges stabilizing the domain structure of antibodies. Furthermore, antibodies which are toxic for the *E.coli* cells cannot be attacked by proteases [7][8][9], a process which would diminish the yield.

As an alternative for proteins that do not get expressed well in the periplasm the

expression can be achieved in the cytoplasm of *E.coli* by the production of inclusion bodies (IBs) [8]. This method requires a subsequent extraction removing cell debris and the *in vitro* refolding of the protein aggregates [10]. In general, the protein has to show a reversible unfolding transition. Otherwise native protein cannot be obtained. Moreover, several refolding conditions (temperature, buffer mixture, redox system) have to be tested in order to achieve the best result. If these prerequisites are fulfilled and if the expressed IBs are very homogenous, only few purification steps are necessary yielding soluble and pure protein [10]. The Fab fragment of the monoclonal antibody MAK33 was successfully expressed in IBs and refolded [11], whereas the attempt to obtain native Fv fragment (a heterodimer composed of the V_H and the V_L antibody domain) did not succeed [5][12].

In the most cases, solubilization and refolding of IBs do not lead to the pure protein of interest straight away because of several contaminants enclosed in the expressed protein aggregates. Chromatography offers a number of techniques which differ in the kind of binding and separation of proteins. Most

proteins bind to hydrophobic interaction chromatography (HIC) material. Because of the high capacity of HIC adsorbents this way of chromatography is suitable as a capture step for use at an early stage in a purification scheme [13]. Polishing of proteins can be achieved with gel permeation chromatography, a separation technique which was described as early as in 1955 by Lathe and Ruthven [14].

To further investigate β -sheet folding and association in this model system, we cloned the C_{H2} fragment (M_r = 11279.7) of the murine monoclonal antibody MAK33 and recombinantly expressed it in the cytoplasm of *E.coli*. MAK33 is directed against the muscle-specific isoform of human creatine kinase (E.C.2.7.3.2.: CK-MM). It was one of the first antibodies to be cloned and expressed in *E.coli* [15]. *In vivo*, the C_{H2} domain contains a carbohydrate moiety that interacts with the carbohydrate of the other C_{H2} domain in the antibody. Recombinantly produced C_{H2} lacks this feature resulting in monomeric state. Therefore, this domain is an ideal model system to investigate folding without association processes.

In this study, we report on a method for purification of recombinant C_{H2} applying

inclusion body preparation and a two step purification by hydrophobic and gel permeation chromatography. Importantly, this is the first time that this domain is available in large amounts allowing intensive thermodynamic and kinetic investigations.

2. Experimental

2.1. Materials

Gene amplification and cloning were performed by using enzymes and buffers from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Super broth (SB) medium was composed of 20 g/l Bacto Trypton, 10 g/l Yeast Extract (both from Difco Laboratories, Detroit, USA), 5 g/l NaCl, 2.5 g/l K₂HPO₄ and 1 g/l MgSO₄•7H₂O, pH 7.5. Ampicillin, canamycin and acrylamide were obtained from Roth (Karlsruhe, Germany). Lysozyme and DNase I were from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Triton X-100 was from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Construction of the C_{H2} expression plasmid

The C_{H2} gene was obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification. The reaction was performed in 0.5 ml PCR tubes

from Biozym (Oldendorf, Germany) in a Primus thermo-cycler from MWG (Ebersberg, Germany). We used the cDNA of the MAK33 γ_1 chain [15] as a template. The primers prC_{H2}exp5 and prC_{H2}exp3 were designed by working with the program PRIMER DESIGN 1.02 (Scientific & Educational Software, 1990). Thereafter, the C_{H2} gene was cloned into a T5 expression vector via NdeI and XbaI and transformed into the *E.coli* strain HB101 [16][17].

2.3. Expression and isolation of inclusion bodies containing C_{H2}

The *E.coli* strain HB101 containing the plasmid pAkF-T5/C_{H2}c+12 was used for the expression of C_{H2}. The cells were grown in SB medium additionally containing ampicillin and canamycin at 37 °C. The expression was started by the addition of 1 mM isopropyl β -D-thio-galactopyranoside (IPTG). After 4 h, the cells were harvested by centrifugation (4000 g) and an inclusion body preparation was performed according to [10]. The cell pellet was resuspended in 100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7 at 4 °C. Disruption of the cells was carried out by incubation with lysozyme (1.5 mg/g cells) for 30 min at 4 °C and

subsequent high pressure treatment. The DNA was removed by the addition of 10 µg/ml DNase I, 3 mM MgCl₂ and incubation for 30 min at room temperature. Thereafter, 0.5 volume of 60 mM EDTA, 6 % Triton X-100, 1.5 M NaCl, pH 7 were added and the mixture was incubated for further 30 min at 4 °C. Finally, removal of the soluble protein fraction was achieved by centrifugation (40,000 g). Washing the IB pellet with 100 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 7 yielded the C_{H2} IBs together with the insoluble cell fragments.

2.4. Inclusion body solubilization [10]

The IB pellet was resuspended in a small volume (1-2 ml/50 mg pellet) of 100 mM Tris/HCl, 6 M GdmCl, 100 DTE, pH 8. After 2 h of incubation at 25 °C, the pH was shifted to a value of 2 by the addition of 1 M HCl. The removal of insoluble cell fragments was carried out by a centrifugation step (40,000 g). Then, the solution was dialyzed against 4 M GdmCl, pH 2 at 4 °C and the protein concentration was determined.

2.5. Refolding of C_{H2} inclusion bodies

The C_{H2} domain was refolded in 0.7 M Tris/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM oxidized glutathione (GSSG), pH 8 at 10 °C. We applied the pulse renaturation method which is

based on the stepwise increase of the protein concentration after each hour. The final C_{H2} concentration was 200 µg/ml. Fluorescence (FluoroMax-2 fluorimeter with a 1 cm stirred and thermostated cell; Spex, Edison, USA) and circular dichroism (J 715 spectropolarimeter with a PTC 343 Peltier unit; Jasco, Tokyo, Japan) measurements were performed to check whether refolding was successful and the antibody domain had regained its native conformation.

2.6. Chromatographic purification

As first column we chose a butyl-Sepharose *fast flow* column (volume 15 ml, diameter 1.6 cm, length 7.5 cm) from Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden). Therefore, ammonium sulfate was added to the solution containing refolded C_{H2} until a final concentration of 1.5 M was reached. The column was equilibrated with 100 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 1.5 M ammonium sulfate, pH 7. Elution of bound C_{H2} was performed by a linear gradient from 1.5 to 0 M ammonium sulfate.

Pure C_{H2} was obtained after a gel permeation chromatography run on a Superdex 75 *prep grade* column (volume 120 ml, diameter 1.6 cm, length 60 cm) from

Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden). The buffer was 100 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 300 mM NaCl, pH 7. All the column runs were carried out on a HighLoad system from Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden) at 4 °C.

2.7. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

To test the purity of the C_{H2} domain SDS-PAGE was performed after each purification step. We used a LKB 2050 Midget gel electrophoresis unit connected to a EPS 600 power supply, both from Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden). The size of the gels was 7 x 6 cm with a thickness of 0.75 mm. The acrylamide quota in the collecting gel was 5 % and in the separation gel 15 %. Gels were run at a constant current of 25 mA and at room temperature. The running buffer contained 25 mM Tris/HCl, 200 mM glycine and 0.1 % SDS (pH 8.8). After the run the silver-staining procedure was performed according to [18].

3. Results and discussion

3.1. Expression of C_{H2} in *Escherichia coli*

For the preparative production of the antibody domain C_{H2}, the *E.coli* strain HB101 [16][17]

containing a plasmid with the C_{H2} gene under the control of a T5 promoter was grown in 2 l SB medium with additional amounts of ampicillin and canamycin. This medium proved to be better than normal Luria Broth (LB) medium [19] since higher cell densities and therefore higher yields of C_{H2} could be achieved. The domain was cloned with twelve additional polar or charged amino acids at the C-terminus to increase the solubility of the protein. Expression was achieved by the addition of 1 mM IPTG at 37 °C. Since the temperature causes a high expression rate and the cytosol of *E.coli* represents a reducing environment, disulfide bonds cannot be formed and the protein is produced as inclusion bodies. Hence, proteases which occur in the cytosol are not able to attack the C_{H2} domain. Moreover, the protein is not toxic for the cells because of the fast aggregation [7][8][9]. After 4 h the expression rate could not be increased any more (Fig. 1A). The amount of C_{H2} was 25 % with respect to the entire protein amount of the *E.coli* cell. This value was even obtained for other proteins produced in IBs [20]. Analyzing the soluble and the insoluble protein fraction showed that

the C_{H2} domain was present as insoluble IBs (Fig. 1B).

3.2. Isolation and solubilization of inclusion bodies

Since IBs have a relatively high density, it is possible to separate them from the soluble protein fraction and the cell fragments by centrifugation. Maximum cell disruption can avoid the co-sedimentation of IBs and cell fragments. Therefore, cells were opened by treatment with lysozyme, a subsequent high pressure disruption and finally by the addition of tensides such as Triton X-100. This procedure proved to be very effective. Highly homogenic C_{H2}-IBs could be obtained.

In spite of the high amount of secondary structure, IBs are not soluble under physiological conditions. Therefore, solubilization was performed in the presence of a strong denaturing reagent as it is represented by GdmCl [10]. Urea solutions are not useful for denaturation in this context because they contain small amount of isocyanide which can react with lysine amino acid side chains. Since C_{H2} possesses one disulfide bridge and thus the IB aggregates are intermolecularly crosslinked via the cysteine residues, 100 mM DTE was added to break

these linkages. This reducing reagent was removed by dialysis afterwards. The yield of solubilized C_{H2} was 183 mg/l liquid culture ($OD_{600(HB101)} = 2.3$).

3.3. Refolding of C_{H2}

The renaturation of unfolded proteins can be achieved in two different ways. First, the dilution into native buffer is practicable if the protein does not tend to aggregate under physiological conditions. Removal of the denaturant by dialysis represents the other possibility. However, here, the protein is under denaturing conditions for a long time. Therefore, protein might be lost due to instable folding intermediates [10].

Refolding of the C_{H2} domain was initiated by the dilution into native buffer. Since the antibody domain contains one intramolecular disulfide bond, no native protein was obtained without any redox system in the refolding buffer (data not shown). The addition of 5 mM oxidized glutathione (GSSG) markedly increased the yield of native C_{H2} (Fig. 2A). However, additional amounts of reduced glutathione (GSH) in the solution did not have any effect (data not shown). Increasing the concentration of C_{H2} in the refolding buffer by the puls renaturation

method resulted in no significant loss of protein by aggregation (Fig. 2B). The best yield of native C_{H2} (25 %) was finally achieved by performing refolding at 200 µg/ml.

3.4. Purification of recombinant C_{H2}

Analyzing the amino acid composition of C_{H2} via looking at the DNA sequence demonstrated that this antibody domain contains a large number of hydrophobic residues. These amino acids form a large hydrophobic patch on the surface where the sugar moiety is supposed to be in natural C_{H2} [1]. Therefore, we chose a butyl-Sepharose *fast flow* column for the first purification step. This column proved to be more effective than phenyl-Sepharose (data not shown). During loading the column the C_{H2} domain completely bound to the column. C_{H2} was eluted by a linear salt gradient between 0.3 and 0 M ammonium sulfate (Fig. 3A). Only one band of higher relative molecular mass could be detected on a SDS-PAGE (Fig. 3C). Additionally, we could use this purification step for concentrating the refolding solution. For separating the C_{H2} domain from this one major contaminant, we performed gel permeation chromatography runs on a Superdex 75 *prep grade* column

because of the great difference in the relative molecular mass. Furthermore, changing the buffer conditions for purification steps by anion or cation exchange chromatography (data not shown) could be avoided by using this column. The identity of the C_{H2} domain was verified by Edman degradation [21].

Taken together, C_{H2} could be purified from inclusion bodies expressed in *E.coli*. Refolding and simultaneous formation of the intrachain disulfide bond was achieved with a yield of 25 %. Hydrophobic interaction chromatography, namely butyl-Sepharose, proved to be the most efficient step in this purification. This purification procedure yielded enough protein of sufficiently high purity to carry out the planned investigations in protein folding concerning the behavior of β-sheet structures and disulfide bond formation.

Acknowledgement

We thank Johannes Buchner for supporting these studies. Furthermore, we are grateful to Carolin Kleylein and Christian Mayr for stimulating discussions and critically reading the manuscript.

Tables and illustrations

Fig. 1. Expression of recombinant C_{H2}. **A** Expression kinetic of C_{H2} in *E.coli* HB101. (1) low relative molecular mass standard; (2) cell culture without the expression plasmid; (3) 1 h after induction; (4) 2 h; (5) 3 h; (6) 4 h; (7) 5 h; (8): 6 h; (9) 18 h; (10) cell culture without the expression plasmid. **B** Protein distribution after cell disruption: soluble (1) and insoluble (2) proteins (15 % polyacrylamide gel, silver-stained).

Fig. 2. Refolding yield of C_{H2} in dependence on different parameters. **A** Variation of the GSSG concentration. **B** Renaturation at different protein concentrations.

Fig. 3. Purification of C_{H2}. **A** shows the elution profile of the butyl-Sepharose *fast flow* column. The buffer conditions were 100 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 7. The column run was carried out at a flow rate of 2 ml/min at

4 °C. **B** Elution profile of the gel permeation chromatography run on a Superdex 75 *prep grade* column. The flow rate of the buffer containing 100 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA and 300 mM NaCl at pH 7 was 0.3 ml/min. The elution of protein was monitored by measuring the absorbance at 280 nm. **C** C_{H2} purification gel (15 %, silver-stained). (1) Protein content after cell disruption; (2) pool from the butyl-Sepharose; (3) pure C_{H2} after the gel permeation chromatography run.

References

- [1] J. Deisenhofer, *Biochemistry* 20 (1981) 2361-2370.
- [2] Y.Goto, K. Hamaguchi, *J. Mol. Biol.* 156 (1982) 891-926.
- [3] D.E. Isenman, D. Lancet, I. Pecht, *Biochemistry* 18 (1979) 3327-3336.
- [4] M. Better, C.P. Chang, R.R. Robinson, A.H. Horwitz, *Science* 240 (1988) 1041-1043.
- [5] A. Skerra, A. Plückthun, *Science* 240 (1988) 1038-1041.
- [6] A. Plückthun, A. Skerra, *Methods Enzymol.* 178 (1989) 497-515.
- [7] F. Baneyx, A. Ayling, T. Palumbo, D. Thomas, G. Georgiou, *Appl. Microbiol. Biotechnology* 36 (1991) 14-20.
- [8] S.C. Makrides, *Microbiol. Reviews* 90 (1996) 512-538.
- [9] J.R. Swartz, *in: Escherichia coli and Salmonella*, 2nd ed., F.C. Neidhardt (editor), ASM Press, Washington, DC (1996) 1693-1711.
- [10] R. Rudolph, *in: Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Analysis*, H. Tschesche (editor), Walter de Gruyter, Berlin (1990) 149-171.
- [11] J. Buchner, R. Rudolph, *Biotechnology* 9 (1991) 157-162.
- [12] A. Skerra, *Curr. Opin. Immunol.* 5 (1993) 256-262.
- [13] R.K. Scopes, *in: Protein purification, principle and practice*, Springer, New York (1982).
- [14] G.H. Lathe, C.R. Ruthven, *J. Biochem.* 60 (1955) xxxiv.
- [15] P. Buckel, C. Hübner-Parajsz, R. Mattes, H. Lenz, H. Haug, K. Beaucamp, *Gene* 51 (1987) 13-19.
- [16] H.W. Boyer, D. Roulland-Dussoix, *J. Mol. Biol.* 41 (1969) 459-472.
- [17] F. Bolivar, K. Backmann, *Methods Enzymol.* 68 (1979) 245-267.
- [18] J. Heukeshofen, R. Dernick, *Elektrophoresis* 9 (1988) 28.
- [19] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York (1989).
- [20] F.A.O. Marston, *Biochem. J.* 240 (1986) 1-12.
- [21] P. Edman, G. Berg, *Eur. J. Biochem.* 1 (1967) 80-97.

Figure 1

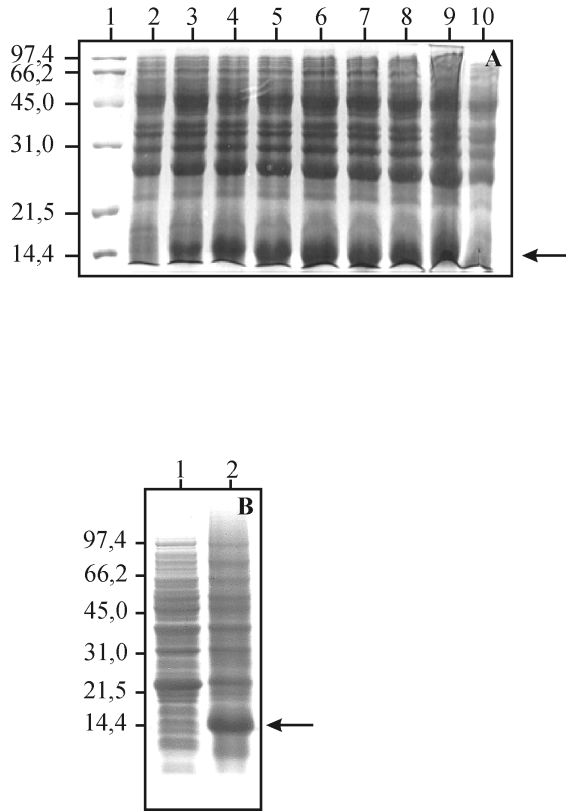


Figure 2

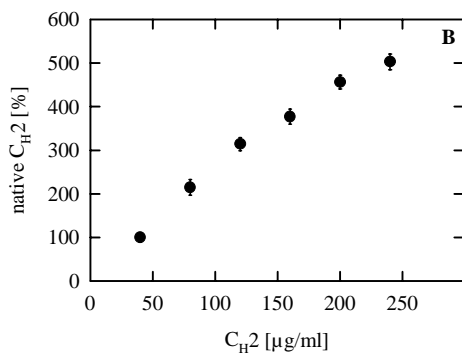
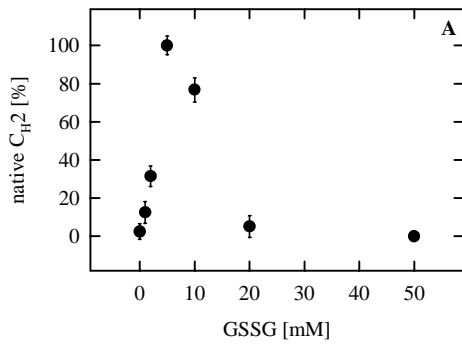
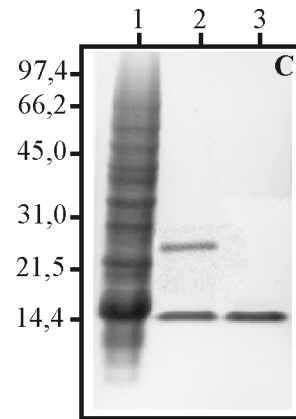
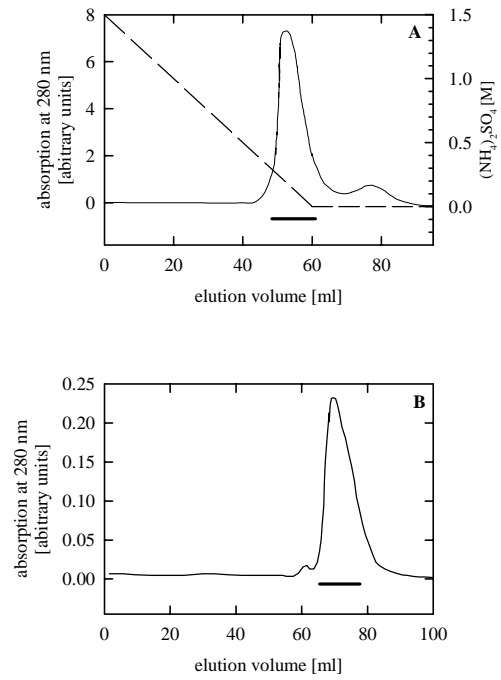


Figure 3



The alternatively folded state of the antibody C_H3 domain

Michael J.W. Thies, Robert Kammermeier, Klaus Richter and Johannes Buchner*

Institut für Organische Chemie & Biochemie, Technische Universität München,
Lichtenbergstr. 4, 85747 Garching, Germany

*corresponding author:

phone + 49 89 289 13340

fax +49 89 289 13345

email: johannes.buchner@ch.tum.de

keywords: antibody structure, folding, molten globule, protein stability, immunoglobulin fold, quaternary structure.

Abstract

The C_{H3} domain of antibodies is characterized by two anti-parallel β -sheets forming a disulfide-linked sandwich-like structure. At acidic pH values and low ionic strength, C_{H3} becomes completely unfolded. The addition of salt transforms the acid-unfolded protein into an alternatively folded state exhibiting a characteristic secondary structure. The transition from native to alternatively folded C_{H3} is a fast reaction. Interestingly, this reaction involves the formation of a defined oligomer consisting of 12 – 14 subunits. Association is completely reversible and the native dimer is quantitatively reformed at neutral pH. This alternatively folded protein is remarkably stable against thermal and chemical denaturation and the unfolding transitions are highly cooperative. With a T_m of 80 °C, the stability of the alternatively folded state is comparable to that of the native state of C_{H3}.

Introduction

Due to the cooperative nature of the folding process of proteins intermediates are normally not populated. Low pH-induced, partially folded conformations of proteins are seen as an equilibrium representation of kinetic intermediates (Kuwajima, 1989; Christensen & Pain, 1991; Ptitsyn, 1992; Barrick & Baldwin, 1993; Dobson, 1994; Oliveberg & Fersht, 1996). For these conformational states the term molten globule was coined (Ohgushi & Wada, 1983; Ptitsyn, 1992) suggesting that this state is representative for conformations formed during early steps of folding. Classic molten globules which were found for several proteins are characterized by the presence of secondary structure elements, fluctuating tertiary structure, solvent-accessible hydrophobic residues and uncooperative unfolding (Kuwajima, 1989; Goto & Fink, 1989; Ptitsyn, 1992; Sanz *et al.*, 1994; Redfield *et al.*, 1999).

Antibody domains have been used extensively as model systems to analyze the folding of all- β proteins (Goto *et al.*, 1979; Goto & Hamaguchi, 1982a,b). More recently, we have embarked on studying the structure and the folding process of the murine monoclonal antibody MAK33 (Buchner *et al.*, 1991; Lilie *et al.*, 1993; Lilie *et al.*, 1995; Thies *et al.*, 1999). This immunoglobulin of subclass IgG1 is directed against the muscle-specific isoform of human creatine kinase (E.C.2.7.3.2.: CK-MM; Buckel *et al.*, 1987). Under acidic conditions, MAK33 adopts a defined structure which differs significantly from the native state and shows several properties of the molten globule state (Buchner *et al.*, 1991). In contrast, however, the alternatively folded state exhibits an extraordinary stability against thermal unfolding with a T_m value of about 70 °C which is similar to values obtained for the native antibody at pH 7 (Buchner *et al.*, 1991). These findings were extended to the Fab fragment of MAK33. Here, the formation of a stable alternatively folded state depends on the presence of a disulfide bond which covalently

links the two constituent polypeptide chains (Lilie & Buchner, 1995). The existence of alternatively folded states was confirmed for other monoclonal antibodies with intact disulfide bonds (Vlasov *et al.*, 1996; Welfle *et al.*, 1999).

To further define the prerequisites for the formation of these remarkable structural rearrangements, we decided to test whether a single immunoglobulin domain could adopt the alternatively folded state. We choose to use the C_H3 domain of MAK33 because the three dimensional structure of the recombinant C_H3 dimer was solved by X-ray crystallography and the folding process starting from the completely unfolded oxidized protein was determined (Thies *et al.*, 1999). We show that C_H3 adopts an alternatively folded state similar to that of the complete antibody and the Fab fragment. Interestingly, alternatively folded C_H3 forms a defined oligomeric complex with high intrinsic stability in a reversible folding reaction.

Results

Structural characterization of the C_{H3} domain: native state vs. pH 2 state

The C_{H3} domain of the antibody MAK33 is a small protein consisting of 108 amino acids. Under native conditions, this polypeptide chain folds into a β -barrel consisting of a 3-stranded and a 4-stranded β -sheet which are connected by an intramolecular disulfide bridge (Deisenhofer, 1981; Thies *et al.*, 1999). The far-UV CD spectra of C_{H3} (Figure 1a) revealed a minimum at 222 nm ($-3000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$), which is normal characteristic for α -helical proteins. This shift of the minimum to a longer wavelength compared to that for a β -sheet protein (218 nm) may be due to the high content of aromatic residues (10.2 %).

Near-UV CD spectra (Figure 1b), which are indicative of the tertiary structure of a protein, showed a global minimum at 275 nm ($-225 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) and an additional one at 292 nm ($-120 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$), which is a characteristic property of antibodies and antibody fragments (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995). Fluorescence spectroscopy was used to further investigate tertiary interactions. Native C_{H3} exhibited a low fluorescence intensity with a maximum at 345 nm (Figure 1c). Upon unfolding, the tryptophan fluorescence intensity increased because it is no longer quenched by the disulfide bridge in the neighbourhood of the tryptophans (Thies *et al.*, 1999). The fluorescence maximum was shifted to 352 nm indicating that the fluorophors become solvent exposed.

It had been demonstrated that the monoclonal antibody MAK33 and the respective Fab fragment adopt a stably folded conformation under acidic conditions (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995). Therefore, we were interested to analyze whether low pH conformations also exist for the C_{H3} domain. For C_{H3}, incubation in acidic buffer (pH 2) led to the loss of secondary and tertiary structure (Figure 1a and b). The CD spectra of C_{H3} at pH 2 are indicative of an

unfolded protein. Fluorescence measurements revealed a slightly blue-shifted fluorescence maximum (347 nm) and a two-fold higher fluorescence intensity at pH 2 (Figure 1c). From these experiments we conclude that C_{H3} globally unfolds at pH 2.

The salt dependence of the formation of alternatively folded C_{H3}

It had been shown previously that anions are able to induce partial refolding of acid-unfolded small proteins (Uversky *et al.*, 1998a,b; Fink *et al.*, 1997; Fink, 1995; Goto *et al.*, 1990). To test whether this is also the case for the C_{H3} domain, we incubated the protein at pH 2 in the presence of anions. The near-UV CD and fluorescence spectra remained unchanged in the presence of anions indicating that no changes in tertiary structure occur. However, the far-UV CD spectra changed significantly in the presence of salts (Figure 1a). In the absence of salt, the far-UV CD spectrum of acid-unfolded C_{H3} had a negative ellipticity of $-6000 \text{ deg cm}^{-2} \text{ dmol}^{-1}$ at 200 nm, whereas the alternatively folded state (in the presence of salt) exhibited a two times higher ellipticity and a red-shifted minimum. Compared to the spectra of the native state of C_{H3}, the ellipticity was four times higher ($-12\,000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ at 213 nm). These findings suggest that ions are required for the formation of the alternatively folded state of C_{H3} which is characterized by the breakdown of the rigid tertiary structure and the presence of a defined secondary structure. To further analyze the salt dependence of the alternatively folded state, we varied both the salt concentration (0 mM up to 150 mM) and the anion. In the presence of increasing concentrations of NaCl, KCl or KClO₄ we measured highly cooperative transitions from the unfolded to the alternatively folded state (Figure 2). The concentration range of salt required for the transition varied for the different salts used. In the case of KClO₄, the value of the midpoint concentration of the transition (C_m) was 22 mM, whereas in the presence of KCl and NaCl the C_m value was

shifted to about 50 mM salt. Previously, it had been shown that the order of effectiveness of these anions in stabilizing low-pH conformations is perchlorate > chloride (Goto *et al.*, 1990). In the case of the alternatively folded C_{H3} domain these results could be confirmed.

The transition from native C_{H3} to the alternatively folded state

Acid-induced unfolding of C_{H3} is a fast process. The kinetics of this reaction could not be resolved by stopped flow fluorescence or CD measurements with a dead time of 2 ms ($k_u > 2000 \text{ s}^{-1}$). Immediately after dilution into the pH 2 buffer, the protein exhibited all the characteristics of the low pH conformation (data not shown). To determine at which pH value the transformation from the native state to the alternatively folded state occurs we performed equilibrium transition measurements (Figure 3). To exclude possible influences of different salt concentrations on the conformation of C_{H3} we performed these investigations at a constant ionic strength of 0.12 M. We found that the pH transition of the antibody domain is a highly cooperative process with a transition midpoint at pH 4.0. Within a range of 0.8 pH units, the molar ellipticity changed from -14 000 to 0 deg cm⁻² dmol⁻¹ at 213 nm (Figure 3). Between pH 10 and pH 4.5 the far-UV CD spectra were completely identical (data not shown). At pH values below 3.8 the C_{H3} domain adopted the alternatively folded conformation.

An important aspect in this context is whether the formation of the alternatively folded state can be reversed when the pH of the solution is shifted back to neutral values. To test this, we formed the alternatively folded state of C_{H3} at pH 2 and then changed the pH to pH 8. We found that both the fluorescence and CD spectra of the refolded protein were identical to that of the native protein (data not shown). Thus, the acid-induced structural rearrangements are completely reversible. However, refolding from the alternatively fold state of C_{H3} to the native state exhibited a

hysteresis with a transition midpoint at pH 5.8 (Figure 3). This indicates that the refolding process is different from that of acid-induced unfolding.

Acid-induced unfolded C_{H3} exhibits a significant thermodynamic stability

It had been shown previously, that the alternatively folded state of the antibody MAK33 and its Fab fragment exhibits remarkable stability against unfolding with T_m values corresponding to that of the native state (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995). Therefore, we wanted to know, whether the alternatively folded state of C_{H3} is equally stable against thermal and chemical unfolding. We carried out differential scanning calorimetry (DSC) experiments. These revealed a T_m value of 80 °C for C_{H3} at pH 2 with salt whereas native C_{H3} melts at 75 °C (Figure 4a). The DSC transitions cannot be described by a two-state model because of the significant asymmetry of the peaks. Since thermal unfolding of alternatively folded C_{H3} is not completely reversible, thermodynamical parameters could not be determined. Temperature transitions followed by far-UV CD spectroscopy gave similar results (data not shown).

To further analyze the underlying principles of the conformational stability of C_{H3} at pH 2 we performed equilibrium unfolding experiments in the presence of guanidinium hydrochloride (GdmCl; Figure 4b). At 200 µg/ml (8.2 µM dimer), alternatively folded C_{H3} shows a highly cooperative transition, which starts at 1.4 M GdmCl. At a concentration of 2.2 M of denaturant the low-pH conformation of C_{H3} is fully denatured. The midpoint of the transition (C_m) is at 1.7 M GdmCl (Table 2). Native C_{H3} analyzed at the same protein concentration unfolds between 0.6 M and 1.4 M GdmCl ($C_m = 1.0$ M; Thies *et al.*, 1999; Table 2). Denaturation of alternatively folded C_{H3} is not fully reversible preventing the calculation of the thermodynamic parameters for this transition. Interestingly, at pH 2, C_{H3} unfolds in a concentration-dependent way (Figure 4b;

Table 2). A small difference in the unfolding transition was detectable between 200 $\mu\text{g/ml}$ (8.2 μM dimer; $C_m = 1.7 \text{ M}$) and 100 $\mu\text{g/ml}$ (4.1 μM dimer; $C_m = 1.6 \text{ M}$). However, at a concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ (0.8 μM dimer), a significantly lower stability of alternatively folded C_{H3} was observed ($C_m = 1.0 \text{ M}$).

In summary, the alternatively folded state of C_{H3} exhibits a remarkable stability against thermal and chemical unfolding. Interestingly, at pH 2, C_{H3} is more resistant against chemical unfolding than C_{H3} at pH 8.

Formation of the alternatively folded state of C_{H3} leads to changes in the quaternary structure

To investigate whether the structural rearrangements influence the quaternary structure of the C_{H3} domain, we used analytical gelfiltration, analytical ultracentrifugation and dynamic light scattering (DLS). All methods employed confirmed that C_{H3} is a dimer under native conditions (Table 1; Thies *et al.*, 1999). In contrast, alternatively folded C_{H3} formed higher oligomers (Table 1). When the dimeric protein was incubated at pH 2, DLS measurements showed that these oligomers were formed in a second order reaction with a calculated rate constant of $k_a = 2.77 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a stands for association). The reaction was completed after 3 hours (Figure 5a and Table 1). After this period of time, two different species, the C_{H3} dimer (~10 %) and an oligomer with a relative molecular mass (M_r) of about 172 000 (~90 %), were in equilibrium. Analytical ultracentrifugation was used as an independent method to determine the mass of the higher oligomeric species. The equilibrium runs showed that the main component in the low pH state has a M_r value of 142 000. Analytical gelfiltration gave similar results (Table 1).

The native C_{H3} dimer is mainly stabilized by hydrophobic interactions (Thies *et al.*, 1999). To investigate whether hydrophobic interactions could be involved in the oligomerization of alternatively folded C_{H3} we performed studies using 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS), a compound with which solvent accessible hydrophobic surfaces of proteins can be detected. In the native C_{H3} dimer, hydrophobic surfaces are buried by association (Thies *et al.*, 1999). As expected the native state did not bind ANS (Figure 6). Under low pH conditions, however, ANS bound specifically to C_{H3} showing that in the alternatively folded state C_{H3} exposes hydrophobic side chains to the solvent (Figure 6).

Interestingly, the oligomerization of C_{H3} at low pH is completely reversible. After a 1:10 dilution into pH 8 buffer or increasing the pH by adding 1 M Tris/HCl, the C_{H3} dimer was quantitatively reformed as determined by analytical ultracentrifugation and gelfiltration (Figure 5b). This process is much faster than the oligomerization reaction (Figure 5a). Furthermore, dissociation seems to be a two step reaction because the analysis was only possible with a two-exponential fit. A fast step ($k_{d1} = 8.33 \text{ s}^{-1}$) was followed by a slower one with a rate constant of $9.48 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (k_{d2})(d stands for dissociation). In contrast to the transition from the native state to the alternatively folded state, we could resolve the regain of the native conformation of C_{H3} by stopped flow CD measurements (Figure 5c). Here, a short lag phase of 115 s in which no change in signal occurred was followed by a folding step with a rate constant of $3.61 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (k_f).

Discussion

Incubation of proteins at acidic pH can have a wide range of conformational consequences (Tanford, 1968). γ II-crystallin and RNase T1 for example retain their native conformation at acidic pH (Rudolph *et al.*, 1990; Kiefhaber *et al.*, 1990). Some proteins can adopt a non-native conformation, but enzymatic activity is still present (Jiang & London, 1990). In many cases, however, the native structure is lost. This may lead to complete denaturation (Tanford, 1968) or to partially folded structures. These partially folded structures are of interest since they can be seen as equilibrium representations of kinetic intermediates. The term 'molten globule' has been coined to describe the common structural features of acid-induced conformations (Christensen & Pain, 1991; Ptitsyn, 1992). Many of them exhibit a compact geometry and a significant amount of secondary structure whereas tertiary structure is not present (Ohgushi & Wada, 1983; Goto *et al.*, 1990a,b; Kuwajima, 1989; Sanz *et al.*, 1994).

The molten globule state is an important concept in protein folding since it had been demonstrated that molten globules occur both in equilibrium and kinetic experiments (Mann & Matthews, 1993; Ptitsyn & Uversky, 1994; Oliveberg & Fersht, 1996). According to many models of protein folding starting from the denatured state, the molten globule represents the first intermediate formed by secondary structure arrangement and compaction (Ikeguchi *et al.*, 1986; Roder *et al.*, 1988; Kuwajima, 1989). This state is labile and thus in an equilibrium with denatured states.

In contrast to the labile acid-induced molten globule conformations, it was found previously, that antibodies can adopt a stable but non-native conformation at pH values below pH 3 (Buchner *et al.*, 1991; Vlasov *et al.*, 1996; Welfle *et al.*, 1999). Interestingly, the stability of this alternatively folded state was in the range of that of the native protein. The Fab fragment of the MAK33 antibody also exhibits an alternatively folded state at low pH conditions, however, only when the

interchain disulfide bond was intact (Lilie & Buchner, 1995). Since the Fab fragment consists of four different domains organized in two different polypeptide chains, we were interested in investigating the behaviour of a single immunoglobulin domain at acidic pH.

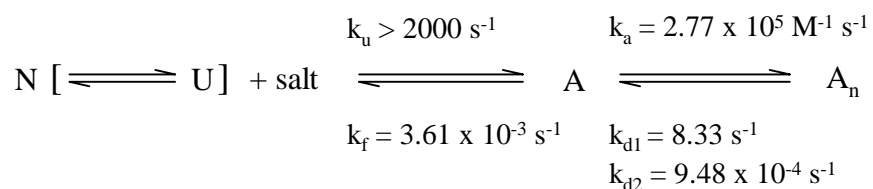
The C_H3 domain, which is localized at the C-terminal end of the antibody, is the only domain in IgG1 forming a homodimer. In the native state, this domain is stabilized by numerous non-local interactions within the domains and the dimerization of the monomers. In contrast to the entire MAK33 antibody and the Fab fragment (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995), we show here that acid-induced unfolding of C_H3 leads to a non-structured protein undistinguishable from the chemically unfolded species. The addition of salt to the acidic solution leads to the formation of a protein conformation with secondary structure but lacking stable tertiary interactions. This is in agreement with previous reports showing, that increased ionic strength promotes partial refolding of acid-unfolded proteins to the so-called A-state (Uversky *et al.*, 1998a,b; Fink *et al.*, 1997; Fink, 1995; Goto *et al.*, 1990a,b). Anions bind to positively charged amino acid side chains thus shielding intramolecular charge-charge repulsive forces of the acid unfolded state. In the case of the C_H3 domain, far-UV CD spectra show that the formation of secondary structure is tightly coupled to anion binding. Concentrations of 22 - 50 mM anion were required to induce the formation of secondary structure. We found a significant increase in the negative ellipticity as observed previously for the MAK33 antibody and its Fab fragment (Buchner *et al.*, 1991; Lilie & Buchner, 1995). This change in ellipticity could be due to a transition from the all- β conformation of native C_H3 to an α -helical structure or to a change in the environment of aromatic amino acids since tryptophan and tyrosine residues have strong positive far-UV CD peaks (Khan *et al.*, 1989; Brahms & Brahms, 1980). In the three-dimensional structure of native C_H3, two tryptophan residues are in the neighbourhood of the internal disulfide bridge (Thies *et al.*, 1999). This is a

typical feature of immunoglobulin domains which leads to the quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence (Cowgill, 1967; Tsunegawa, 1987; Thies *et al.*, 1999). The increase in fluorescence intensity at low pH values is therefore indicative of the movement of tryptophan residues away from the disulfide bond. Interestingly, the maximum of fluorescence emission of alternatively folded C_{H3} and native C_{H3} are the same. This implies that the environment of the tryptophans is different but the polarity is similar in the pH 8 and the pH 2 state.

Is the alternatively folded state representative of an early kinetic folding intermediate as it has been suggested for the molten globule state? The folding pathway of denatured C_{H3} has been analyzed in detail before. At pH 8 one distinct intermediate was detectable which precedes dimerization to the native conformation (Thies *et al.*, 1999). In contrast to the alternatively folded state of C_{H3}, this intermediate exhibits native-like tertiary structure and therefore buries essential hydrophobic parts in its interior. The formation of an alternatively folded state could be the result of the hydrophobic collapse which is the initial step in C_{H3} folding (Thies *et al.*, 1999). In agreement with conceptual folding models, which postulate a labile protein conformation with secondary structure elements but without any tertiary interactions at the beginning of the folding process (Ptitsyn & Rashin, 1975; Dill, 1990), alternatively folded C_{H3} could represent such an early equilibrium intermediate. However, investigations of the folding pathway of C_{H3} have not revealed evidence for this hypothesis until now. The subsequent oligomerization seems to be a reaction requiring the protonation of amino acid side chains at low pH.

ANS binding revealed that in the alternatively folded state, hydrophobic side chains are solvent-exposed. These hydrophobic surfaces may participate in intermolecular interactions between different C_{H3} domains leading to oligomers consisting of 12 – 14 subunits. Interestingly, the oligomerization of C_{H3} at pH 2 is reversible. The efficient formation of native C_{H3} after shifting

the pH back to pH 8 shows that the hydrophobic interactions between the subunits of the oligomer can be easily weakened by electrostatic repulsions. It seems that after a short lag phase in which the oligomer starts to dissociate, the protein refolds to the native state. This folding step is much slower than the formation of the alternatively folded state, which occurs in the dead time of the measurement. In summary, the formation of the alternatively folded state of C_{H3} and the subsequent oligomerization can be described as follows:



where N₂ stands for the native C_{H3} dimer, U for the unfolded protein and A for the alternatively folded state, which is the starting point for the formation of the oligomeric alternatively folded state of C_{H3} (A_n). C_{H3} unfolds completely after shifting the pH from pH 8 to pH 2. The addition of salt induces the formation of the alternatively folded state, which subsequently undergoes an oligomerization reaction ($k_a = 2.77 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). The rate constants k_{d1} and k_{d2} obtained from DLS measurements describe the dissociation of the C_{H3} oligomers leading to an alternatively folded molecule. This species folds back to the native state of C_{H3} with the rate constant k_f .

Both the formation of the A-state and the alternatively folded state comprise the rearrangement of secondary structure elements and the loss of tertiary structure. The alternatively folded state, however, shows a high cooperativity in thermal and denaturant-induced unfolding transitions, which has not been observed for the A-state or the molten globule state in general. The high intrinsic stability of C_{H3} at pH 2 and the stability of the alternatively folded state in general may be due to interchain interactions between different single β -strands, potentially those involved in the association of the native dimer.

Materials and Methods

Purification of native C_{H3}

The C_{H3} domain was purified to homogeneity according to Thies *et al.* (1999). The protein was dialyzed against 0.1 M Tris/HCl, pH 8. The C_{H3} concentration was determined photometrically ($A_{1\%,1\text{cm}}^{280\text{nm}} = 1.95$).

Preparation of acid-unfolded C_{H3}

Native C_{H3} was dialyzed against 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄ (pH 2), 60 mM NaCl or 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄ (pH 2) without salt. For the pH equilibrium transition we used the following buffers: 50 mM H₃BO₃/NaOH, 50 mM NaCl (pH 10 – 8); 50 mM Na₂HPO₄/citrate, 50 mM NaCl (pH 8 – 5); 50 mM acetate/NaOH, 56 mM NaCl (pH 5 – 4.5); 50 mM acetate/NaOH, 70 mM NaCl (pH 4.5 – 4); 50 mM formic acid/NaOH, 56 mM NaCl (pH 4 – 3); 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 56 mM NaCl (pH 3 – 2).

Spectroscopic techniques

Circular dichroism (CD) spectra were recorded in a Jasco J-715 spectropolarimeter with a PTC 343 peltier unit. The experiments were carried out in quartz cuvettes of 0.1 and 0.5 cm pathlength. Far-UV spectra were recorded from 190 to 250 nm in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 8), at 20 °C and 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄ (pH 2), with or without salt, respectively, at 20 °C. Near-UV data were recorded from 250 to 350 nm in 0.1 M Tris/HCl, pH 8, at 20 °C and 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄ (pH 2), with or without salt, at 20 °C. All spectra were buffer-corrected. Kinetics were monitored at 220 nm using a π^* -180 stopped flow CD-spectropolarimeter from Applied Photophysics.

Fluorescence spectra of C_{H3} were determined using a Spex FluoroMax-2 fluorimeter and a 1 cm stirred and thermostated cell (20 °C). The excitation wavelength was set to 280 nm or 295 nm. Spectra were recorded from 290 to 400 nm. The spectral bandwidths were 2 nm for excitation and 7 nm for emission, respectively.

Thermal denaturations were measured by recording far-UV CD spectra in a 1 mm thermostated cell and analyzing the ellipticity at 215 nm. The temperature was increased from 20 °C to 85 °C at a rate of 0.5 °C min⁻¹. The reversibility of the unfolding transitions was monitored by recording spectra after cooling the solution to the starting temperature. In the case of chemical denaturation by GdmCl, the ellipticity was recorded at 213 nm. Additionally, the transition was followed by measuring fluorescence spectra and determining the shift of the fluorescence maximum λ_{max} .

Analytical gelfiltration

Runs were performed on a HPLC system with fluorescence detection (Jasco). We used a silica based Biosep S-2000 gelfiltration column with a pre-column (Phenomenex). The flow rate was 0.3 ml min⁻¹. In the case of the native C_{H3} domain, runs were performed in 0.1 M Tris/HCl, 0.3 M NaCl, pH 8 at 20 °C. The buffer system for alternatively folded C_{H3} was 50 mM KH₂PO₄/o-H₃PO₄, 0.3 M NaCl, pH 2 at 20 °C. Fluorescence was excited at 280 nm and detected at 345 nm. The UV/Vis signal was followed at 280 nm. The runs were analyzed using the Borwin software (Jasco).

Analytical ultracentrifugation

An Optima XL-I analytical ultracentrifuge with integrated optical systems (Beckman) was used. The equilibrium runs were monitored by scanning UV/Vis absorbance and Rayleigh interference at 20 °C. The buffers were the same as mentioned above. The protein concentration was 2 mg/ml.

Differential Scanning Calorimetry

Measurements were performed using a Nano Differential Scanning Calorimeter CSC5100 (Calorimetry Science Corporation). Samples of the C_{H3} domain (2 mg/ml; 82 μM dimer) in two different buffer systems (50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 100 mM NaCl, pH 2 or 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 8) were heated to 90 °C after equilibration of the system over two days.

Dynamic light-scattering

The experiments were performed using a DynaPro MS200 DLS spectrometer with a temperature-controlled microsampler (Protein Solutions). All experiments were done at 20 °C and a scattering angle of 90 ° using quartz microcells with a sample volume of 12 μl. Solvents and protein samples were filtered through 100 nm pore size Anodisc 13 filters (Whatman). The translational diffusion coefficient *D* and the hydrodynamic radius were calculated from the autocorrelation function using the program Dynamics (Protein Solutions). At different time points, the scattered intensity *I_s* was monitored.

Acknowledgements

We thank Katrin Zaiss for support with the DSC measurements and Robert Huber and coworkers for providing the DLS equipment. The authors are very grateful to Josef Mayer for initial experiments on this topic. Finally, we thank Rainer Jaenicke for his continued interest in this work.

References

- Barrick, D. & Baldwin, R.L. (1993). The molten globule intermediate of apomyoglobin and the process of protein folding. *Protein Sci.* **2**, 869-876.
- Brahms, S. & Brahms, J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* **138**, 149-178
- Buchner, J. & Rudolph, R. (1991). Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **9**, 157-162.
- Buchner, J., Renner, M., Lilie, H., Hinz, H.J., Kiefhaber, T., Jaenicke, R. (1991). Alternatively folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry* **30**, 6922-6929.
- Buckel, P., Hübner-Parajsz, C., Mattes, R., Lenz, H., Haug, H. & Beaucamp, K. (1987). Cloning and nucleotide sequence of heavy- and light-chain cDNAs from a creatine-kinase-specific monoclonal antibody. *Gene* **51**, 13-19.
- Christensen, H. & Pain, R.H. (1991). Molten globule intermediates and protein folding. *Eur. Biophys. J.* **19**, 221-229.
- Cowgill, R.W. (1967). Fluorescence and the structure of proteins. XII. Pancreatic trypsin inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* **140**, 37-44.

- Deisenhofer, J. (1981). Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of Protein A from *Staphylococcus Aureus* at 2.9 and 2.8 Å resolution. *Biochemistry* **20**, 2361-2370.
- Dill, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**, 7133-7155.
- Dobson, C.M. (1994). Protein folding. Solid evidence for molten globules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 636-40.
- Fink, A. L. (1995). Compact intermediate states in protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 495-522.
- Fink, A. L., Oberg, K. A. & Seshadri, S. (1997). Discrete intermediates versus molten globule models for protein folding: characterization of partially folded intermediates of apomyoglobin. *Fold. Design.* **3**, 19-25.
- Goto, Y., Azuma, T. & Hamaguchi, K. (1979). Refolding of the immunoglobulin light chain. *J. Biochem.* **85**, 1427-1438.
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982a). Unfolding and refolding of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *J. Mol. Biol.* **156**, 891-910.
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982b). Unfolding and refolding of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the intrachain disulfide bond. *J. Mol. Biol.* **156**, 911-926.
- Goto, Y. & Fink, A.L. (1989). Conformational states of β -lactamase: molten globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry* **28**, 945-952.
- Goto, Y., Calciano, L.J. & Fink, A.L. (1990a). Acid-induced folding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 573-577.
- Goto, Y., Takahashi, N. & Fink, A.L. (1990b). Mechanism of acid-induced folding of proteins.

Biochemistry **29**, 3480-3488.

Ikeguchi, D.E., Kuwajima, K., Mitani, M. & Sugai, S. (1986). Evidence for identity between the equilibrium unfolding intermediate and a transient folding intermediate: a comparative study of the folding reactions of alpha-lactalbumin and lysozyme. *Biochemistry* **25**: 6965-6972.

Jiang, J.X. & London, E. (1990). Involvement of denaturation-like changes in Pseudomonas exotoxin a hydrophobicity and membrane penetration determined by characterization of pH and thermal transitions. Roles of two distinct conformationally altered states. *J. Biol. Chem.* **265**, 8636-8641.

Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R. & Buchner, J. (1993). Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Protein Sci.* **2**, 1490-1495.

Lilie, H., Rudolph, R. & Buchner, J. (1995). Association of antibody chains at different stages of folding: prolyl isomerization occurs after formation of quaternary structure. *J. Mol. Biol.* **248**, 190-201.

Mann, C.J. & Matthews, C.R. (1993). Structure and stability of an early folding intermediate of Escherichia coli trp aporepressor measured by far-UV stopped-flow circular dichroism and 8-anilino-1-naphthalene sulfonate binding. *Biochemistry* **32**: 5282-5290.

Khan, M.Y., Villanueva, G. & Newman, S.A. (1989). On the origin of the positive band in the far-ultraviolet circular dichroic spectrum of fibronectin. *J. Biol. Chem.* **264**, 2139-2142

Kiefhaber, T., Schmid, F.X., Renner, M., Hinz, H.-J., Hahn, U. & Quaas, R. (1990). Stability of recombinant Lys25-ribonuclease T1. *Biochemistry* **29**, 8250-8257.

Kuwajima, K. (1989). The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* **6**, 87-103.

- Lilie, H., Lang, K. Rudolph, R. & Buchner, J. (1993). Prolyl isomerases catalyze antibody folding *in vitro*. *Protein Sci.* **2**, 1490-1495.
- Lilie, H. & Buchner, J. (1995). Domain interactions stabilize the *alternatively folded state* of an antibody Fab fragment. *FEBS Lett.* **362**, 43-46.
- Ohgushi, M. & Wada, A. (1983). 'Molten globule state': a compact form of globular proteins with mobile side chains. *FEBS Lett.* **164**, 21-24.
- Oliveberg, M. & Fersht, A.R. (1996). Thermodynamics of transient conformations in the folding pathway of barnase: reorganization of the folding intermediate at low pH. *Biochemistry* **35**, 2738-2749.
- Ptitsyn, O.B. & Rashin, A.A. (1975). A model of myoglobin self-organisation. *Biophys. Chem.* **3**, 1-20.
- Ptitsyn, O.B. & Uversky, V.N. (1994). The molten globule is a third thermodynamical state of protein molecules. *FEBS Lett.* **341**: 15-18.
- Ptitsyn, O.B. (1992). The molten globule state. in *Protein Folding* (Creighton, T.E., ed.), pp. 243-300, W.H. Freeman and Company, New York.
- Redfield, C., Schulman, B.A., Milhollen, M.A., Kim, P.S. & Dobson, C.M. (1999). α -lactalbumin forms a compact molten globule in the absence of disulfide bonds. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 948-952.
- Roder, H., Elöve, G. & Englander, S.W. (1988). Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by H-exchange labelling and proton NMR. *Nature* **335**: 700-704.
- Rudolph, R., Neßlauer, G., Siebendritt, R., Sharma, A.K. & Jaenicke, R. (1990). Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma II-crystallin from calf eye lens.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4625-4629.
- Sanz, J.M., Johnson, C.M. & Fersht, A.R. (1994). The A-state of barnase. *Biochemistry* **33**, 11189-11199.
- Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **23**, 122-282.
- Thies, M.J.W., Mayer, J., Augustine, J.G., Frederik, C.A., Lilie, H. & Buchner, J. (1999). Folding and association of the antibody domain C_H3: Prolyl isomerization precedes dimerization. *J. Mol. Biol.* **293**, 67-79.
- Tsunegawa, M., Goto, Y., Kawata, Y. & Hamaguchi, K. (1987). Unfolding and refolding of a type kappa immunoglobulin light chain and its variable and constant fragments. *Biochemistry* **26**, 6044-6051.
- Uversky, V.N., Karnoup, A.S., Segel, D.J., Seshadri, S., Doniach, S. & Fink, A.L. (1998a). Anion-induced folding of staphylococcal nuclease: characterization of multiple equilibrium partially folded intermediates. *J. Mol. Biol.* **278**, 879-894.
- Uversky, V.N., Segel, D.J., Doniach, S. & Fink, A.L. (1998b). Association-induced folding of globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5480-5483.
- Vlasov, A.P., Kravchuk, Z.I. & Martsev, S.P. (1996). Non-native conformational states of immunoglobulins: thermodynamic and functional analysis of rabbit IgG. *Biokhimiia* **61**, 212-235.
- Welfle, K., Misselwitz, R. Hausdorf, G., Hohne, W. & Welfle, H. (1999). Conformation, pH-induced conformational changes, and thermal unfolding of anti-p24 (HIV) monoclonal antibody CB4-1 and its Fab and Fc fragments. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 120-131.

Figure and Table Legends

Figure 1. Spectroscopic characterization of native C_{H3} and alternatively folded C_{H3}. **a** Far-UV CD spectra of native C_{H3} in 0.1 M Tris/HCl, pH 8 (solid line), acid-induced unfolded C_{H3} in 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, pH 2 (dotted line) and alternatively folded C_{H3} in 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 60 mM NaCl, pH 2 (dashed line). The protein concentration was 200 µg/ml (8.2 µM dimer). **b** Near-UV CD spectra of C_{H3}: native state (solid line), acid-unfolded conformation (dotted line) and alternatively folded state (dashed line). The spectra were recorded at a C_{H3} concentration of 500 µg/ml (20.5 µM dimer). **c** Fluorescence spectra of native C_{H3} (solid line), acid-unfolded/alternatively folded C_{H3} (dashed line) and the unfolded antibody domain (dotted line). The C_{H3} concentration was 10 µg/ml (0.4 µM dimer). All measurements were carried out at 20 °C.

Figure 2. Anion-induced refolding of C_{H3}. Titration of acid-unfolded C_{H3} with NaCl (●), KCl (○) and KClO₄ (σ). The protein concentration was 200 µg/ml (8.2 µM dimer). Structural changes were monitored at different anion concentrations by far-UV CD spectra at 20 °C. The ellipticity at 213 nm is plotted versus salt concentration.

Figure 3. pH transition of the C_{H3} domain. The protein was incubated in buffers with pH values ranging from pH 2 to pH 10 at 20 °C for 24 hours (200 µg/ml, 8.2 µM dimer). After collecting the far-UV CD spectra, the ellipticity at 213 nm was plotted versus the respective pH value: unfolding transition (●) and refolding transition (○).

Figure 4. Stability of C_{H3} against thermal and chemical denaturation.

a DSC curves of native (····) and alternatively folded C_{H3} (—) at a concentration of 2 mg/ml (82 μM dimer). The temperature transition of native C_{H3} was measured in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 8, the alternatively folded domain in 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 100 mM NaCl, pH 2. **b** GdmCl-induced unfolding transition of alternatively folded C_{H3} resulting from the analysis of the respective far-UV CD spectra at 213 nm. The C_{H3} concentration was 20 μg/ml (0.8 μM dimer; ▲), 100 μg/ml (4.1 μM dimer; ○) and 200 μg/ml (8.2 μM dimer; ●), respectively. Fits were calculated according to equation 2.

Figure 5. Oligomerization of alternatively folded C_{H3}. **a** Time-dependent change of the hydrodynamic radius of C_{H3} (400 μg/ml, 16.4 μM dimer) in 50 mM NaH₂PO₄/o-H₃PO₄, 60 mM NaCl, pH 2. The hydrodynamic radius was 2.44 (C_{H3} dimer) at the beginning of the experiment (●). Disappearance of the oligomer after shifting the pH to pH 8 (○). **b** Formation of native C_{H3} after shifting the pH of the solution back to pH 8 followed by HPLC. **c** Kinetic of the formation of native C_{H3} monitored by CD at 220 nm.

Figure 6. Alternatively folded C_{H3} has solvent-accessible hydrophobic surfaces.

Fluorescence spectra of ANS bound to the alternatively folded state of C_{H3} (dashed line). The signal of the native protein (solid line) is similar to that of the buffer control (dotted line). The C_{H3} concentration was 10 μg/ml (0.4 μM dimer). ANS was added in a 10-fold molar excess.

Table 1. The relative molecular weight of the native state (pH 8) and the alternatively folded state (pH 2) of C_{H3} established by three different methods (20 °C).

Method	M _r , C _{H3} (pH 8)	M _r , C _{H3} (pH 2)
Gelfiltration	26 400 ± 175	-
Analytical ultracentrifugation	28 548 ± 893	142 090 ± 3312
Dynamic light scattering	23 400 ± 1087	172 000 ± 1854

Table 2. Concentration-dependence of the unfolding equilibrium transition of C_{H3}.

Concentration	Midpoint of transition	
	C _m [M GdmCl]	
	C _{H3} (pH 8)	C _{H3} (pH 2)
200 µg/ml (8.2 µM)	-	1.7
100 µg/ml (4.1 µM)	1.0	1.6
20 µg/ml (0.8 µM)	0.8	1.0

Figure 1

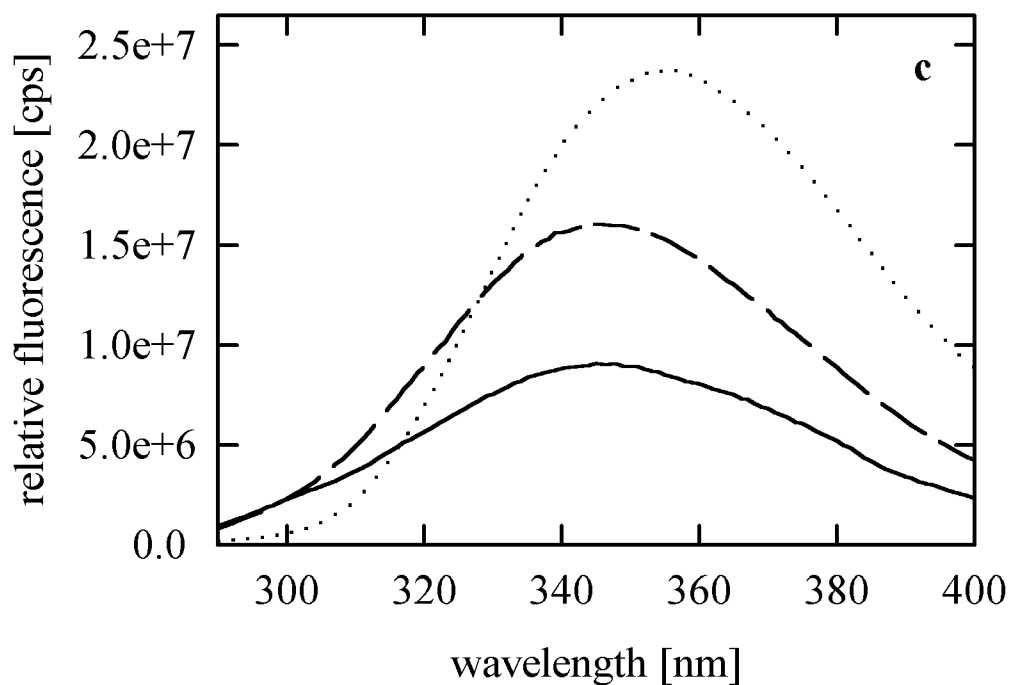
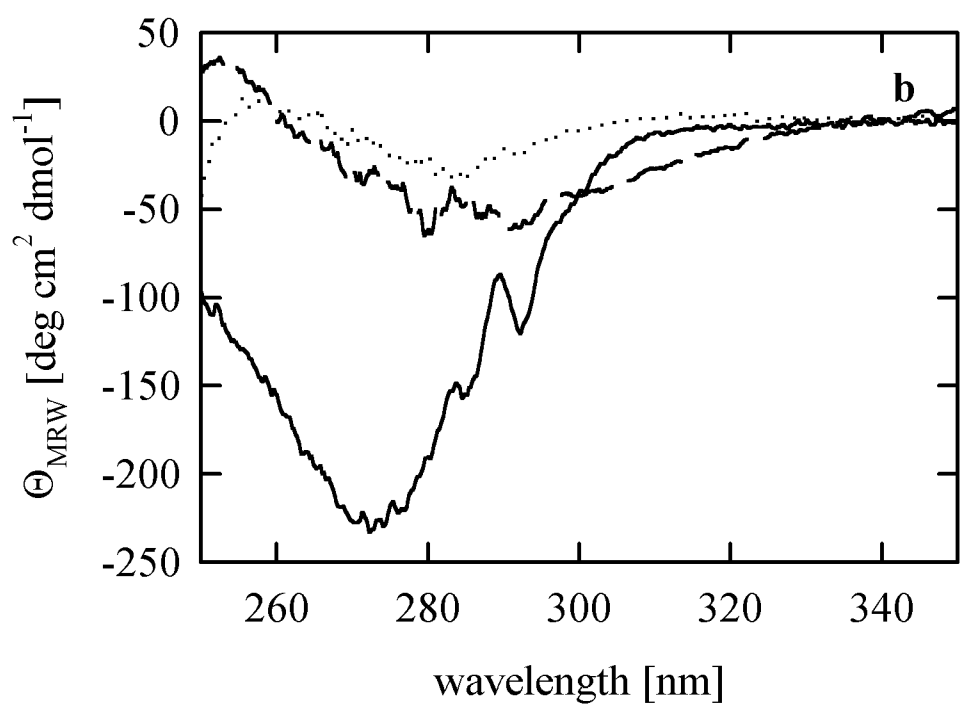
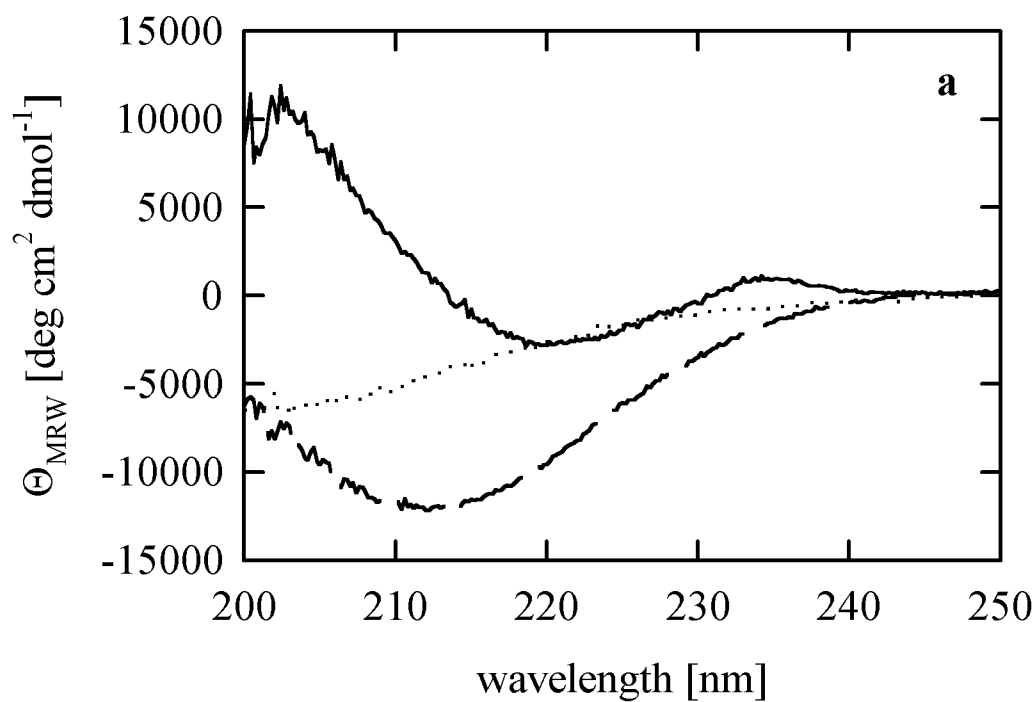


Figure 2

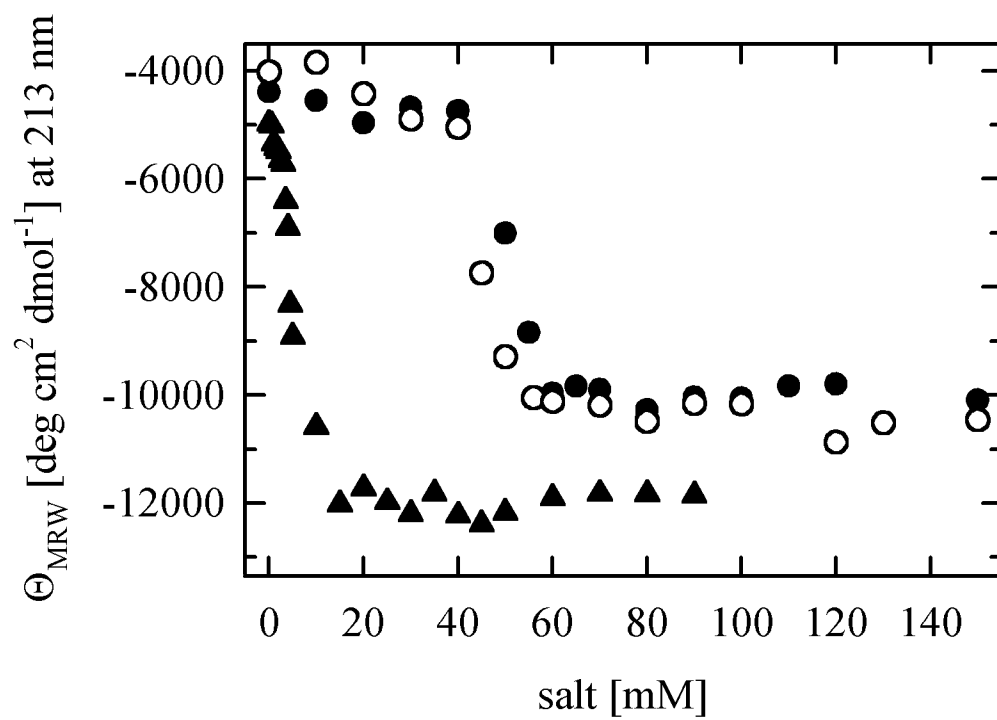


Figure 3

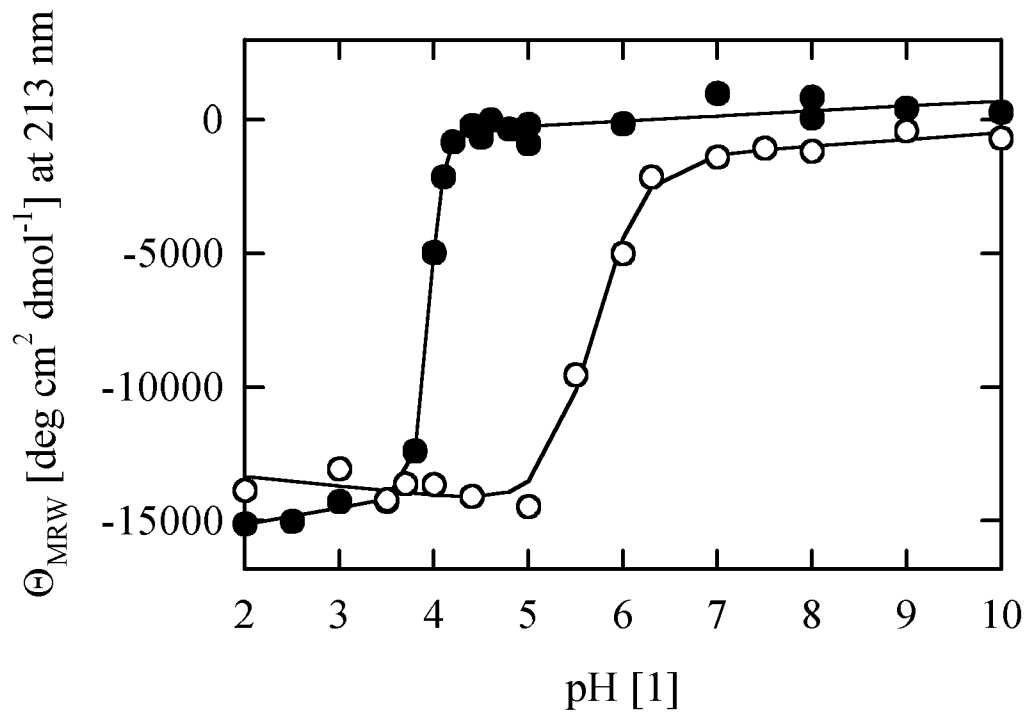


Figure 4

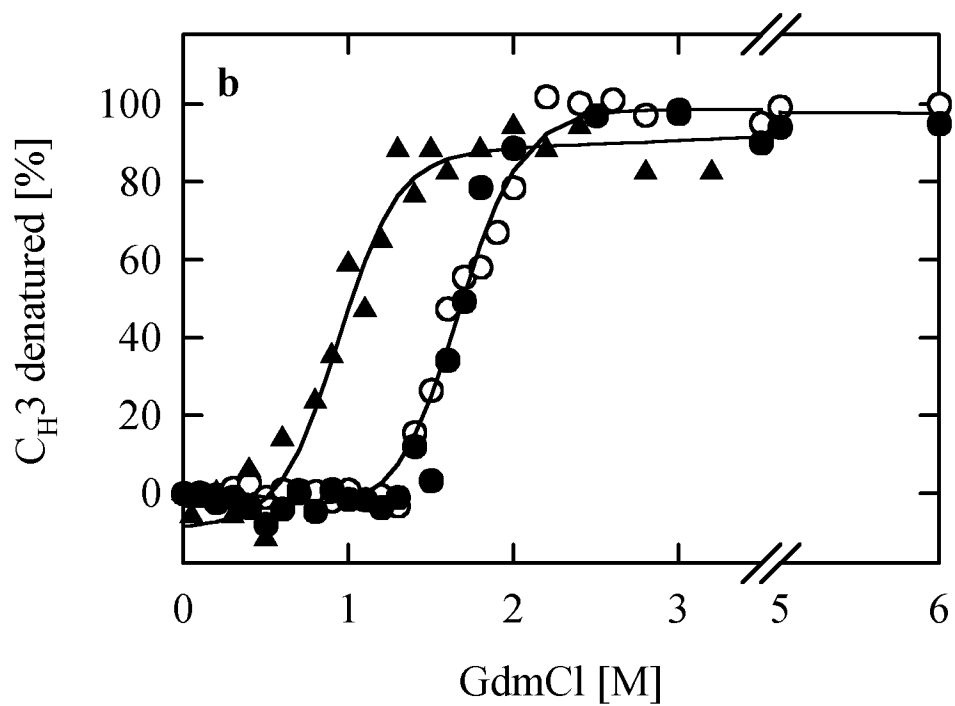
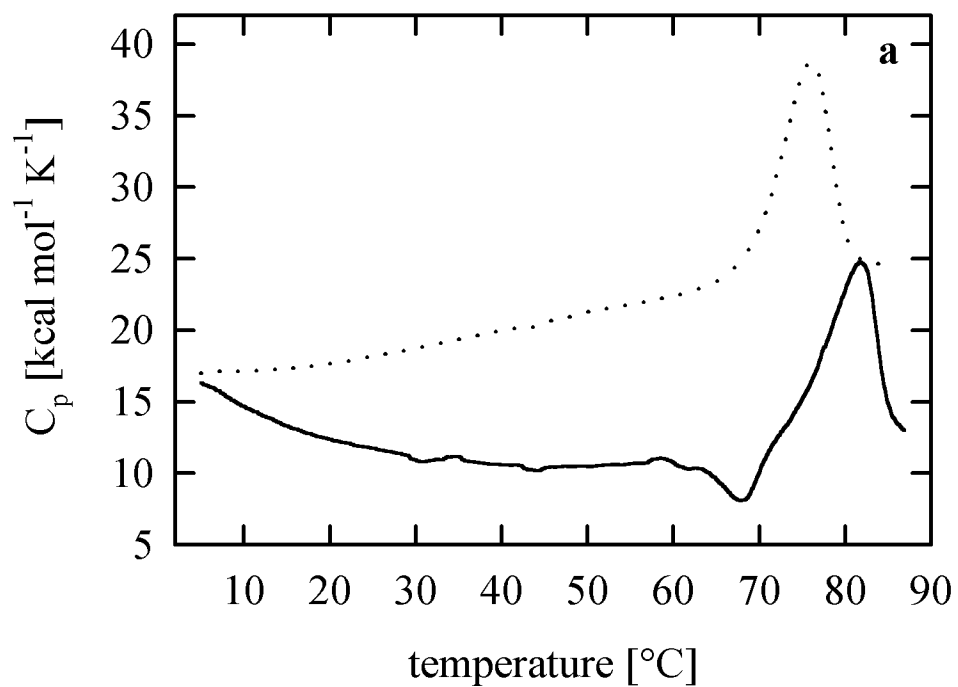


Figure 5

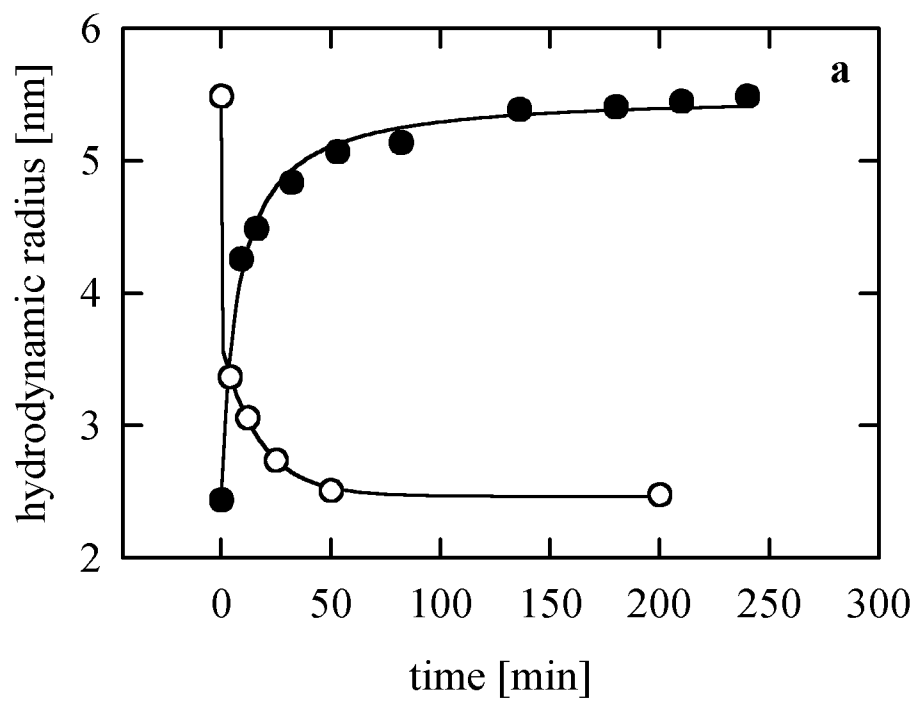


Figure 5

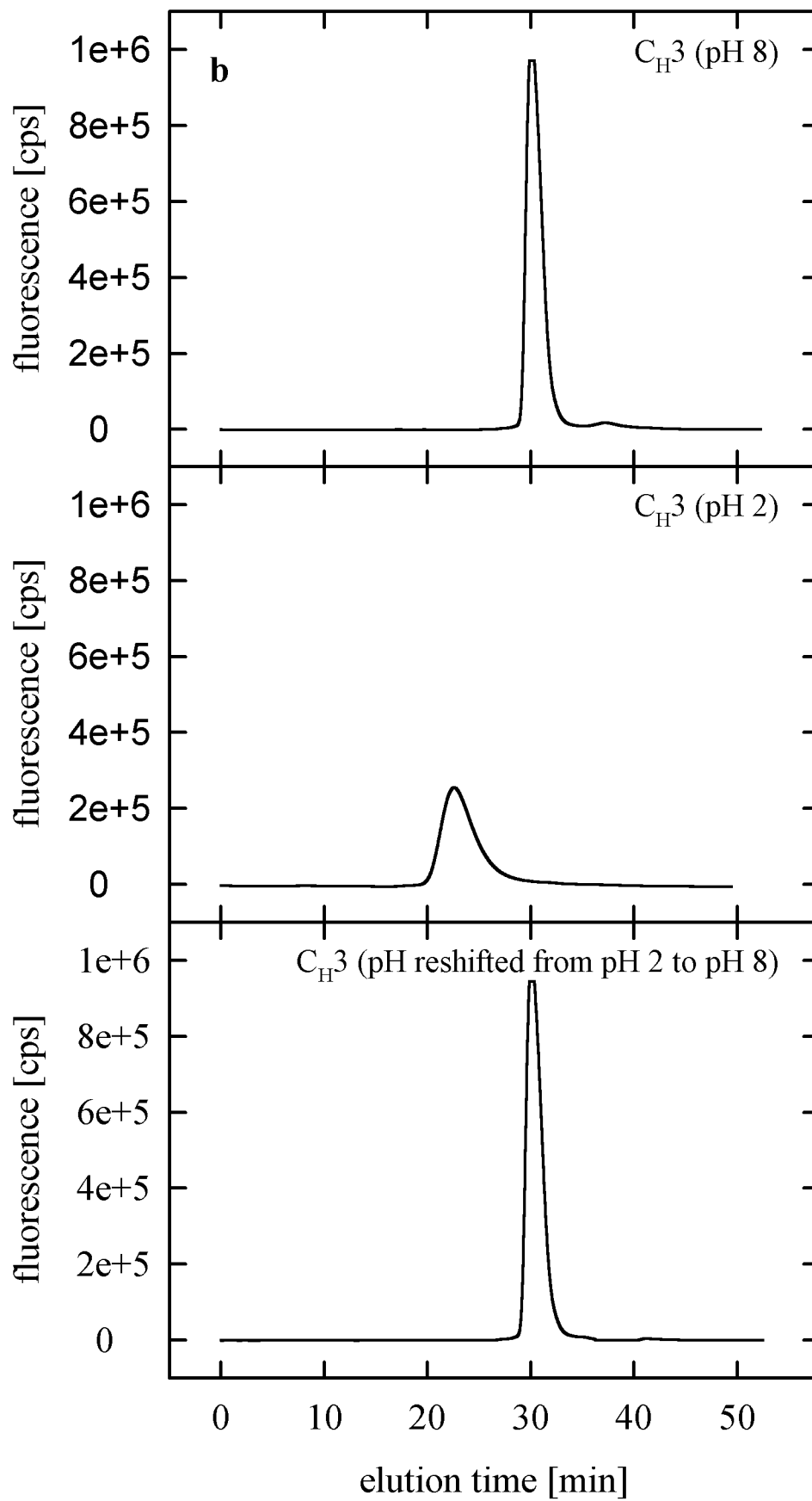


Figure 5

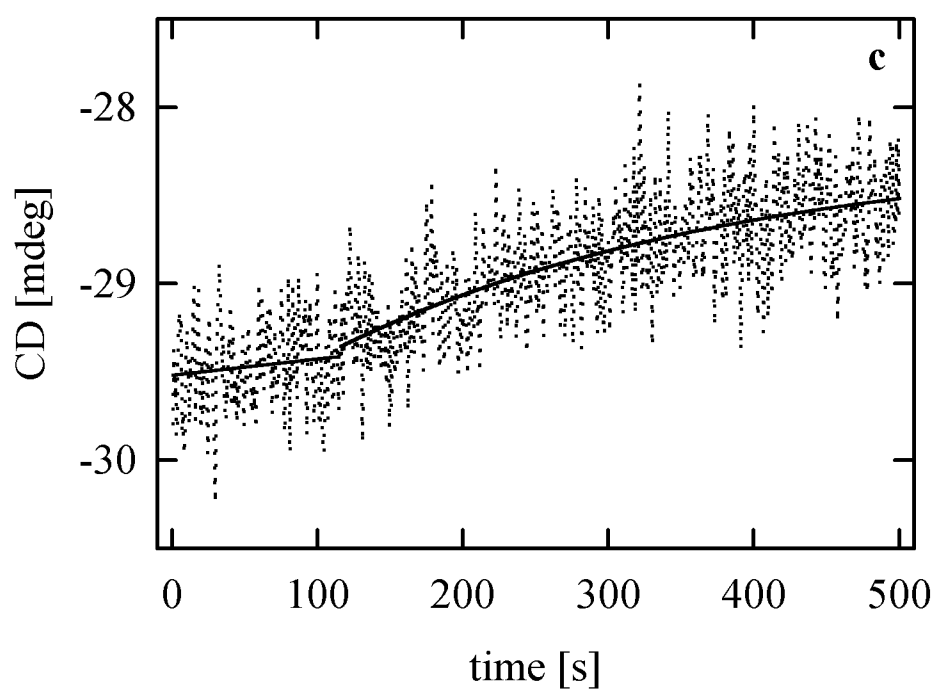
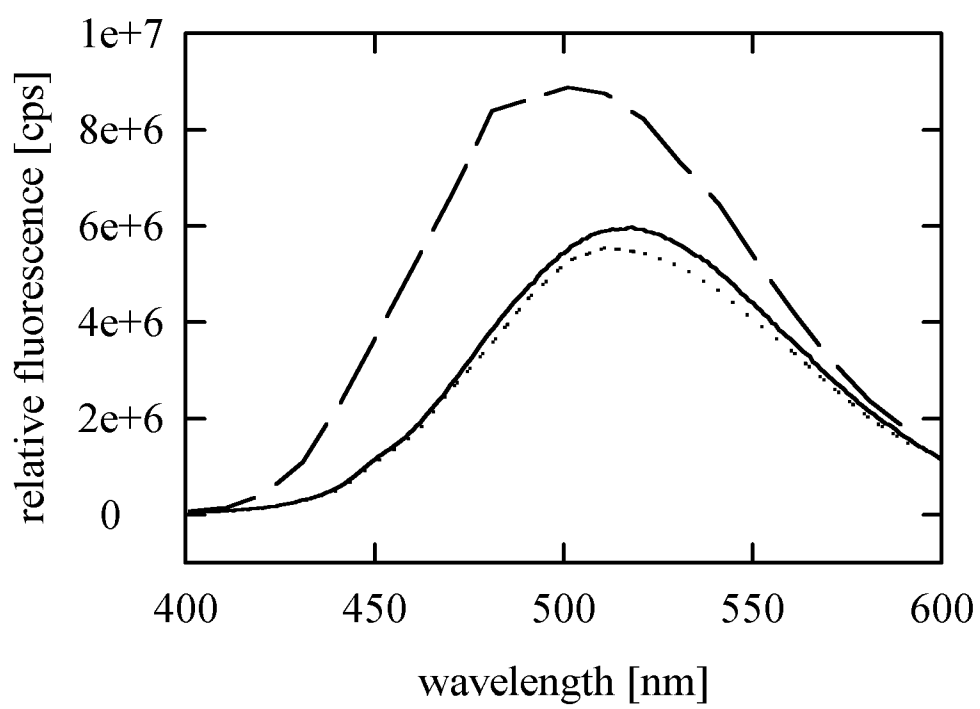


Figure 6



Ich danke Herrn Prof. Johannes Buchner für die Möglichkeit, dieses interessante Thema bearbeiten zu können sowie für jegliche Unterstützung hinsichtlich der Planung und Durchführung von Experimenten sowie die anschließende Diskussion der Ergebnisse. Außerdem möchte ich mich bei ihm dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, zügig mit der Doktorarbeit fertig zu werden, um eine Stelle in der Industrie anzunehmen.

Herrn Prof. Robert Huber möchte ich für die Möglichkeit danken, an seinem Lehrstuhl Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung durchzuführen, Frau Dr. Margherita Ruoppolo und Herrn Fabio Talamo für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Massenspektrometrie sowie für die schöne Zeit in Neapel. Herrn Prof. Thomas Kiefhaber danke ich für den Aufenthalt in Basel, um dort *stopped flow*-CD Messungen durchführen zu können.

Herrn Dr. Holger Grallert danke ich für die vielen Anregungen und fruchtbaren Diskussionen.

Bei allen Insassen von Büro 2 sowie dem ganzen Rest der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft, das freundliche Arbeitsklima sowie für die gesamte zurückliegende, schöne Zeit bedanken. Der Mannschaft der Korrekturleser sei herzlich für ihre Ausdauer beim Lesen der zahlreichen Seiten gedankt.

Ganz besonders danke ich meiner Carolin, die mich während der ganzen Zeit immer unterstützt hat. Zudem hat sie in den letzten Wochen dafür gesorgt, dass ich zumindest eine Mahlzeit am Tag zu mir genommen habe.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.

München, Januar 2001