

Stopped-flow Proteinfaltungs-Kinetik und CD-Spektroskopie

Praktikum der Biophysikalischen Chemie II

Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

WS 2009 / 2010

AK Prof. Dr. Harald Schwalbe

PRAKTIKUMSSKRIPT

Einleitung

Der Begriff der Proteinfaltung steht für den Prozess der Bildung der dreidimensionalen Struktur eines am Ribosom synthetisierten Proteins. Die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren in definierter Reihenfolge führt zunächst zur Bildung einer Polypeptidkette, die – solange sie noch mit dem Ribosom assoziiert ist – noch nicht die charakteristische dreidimensionale Struktur des Proteins aufweist. Erst nach der vollständigen Translokation der Polypeptidkette durch den Ribosomenkanal in das Cytosol der Zelle kann die native Struktur des Proteins gebildet werden. Das Protein faltet sich, wobei die Primärstruktur die Tertiärstruktur diktiert. Verschiedene Chaperones und Chaperonins (faltungsunterstützende Proteine bzw. Proteinoligomere) assistieren dem betreffenden Protein. Während kleine Proteine auch ohne die Hilfe weiterer Proteine in ihre korrekte dreidimensionale Struktur falten, sind gerade größere Proteine (sog. Multi-Domänen-Proteine) auf Faltungshelfer angewiesen. Auf diese Weise wird Fehlfaltung verhindert. Dies ist von Bedeutung, da einige missgefaltete Proteine aggregieren und auf diese Weise hochmolekulare Aggregate wie amyloide Fibrillen bilden können. Letztere stehen u.a. mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimersche oder Parkinsonsche Krankheit in Verbindung.

Es ist ersichtlich, dass die Erforschung der Proteinfaltung von großer Wichtigkeit ist. Einerseits ermöglicht uns das, zu verstehen, wie die Struktur von Proteinen entsteht und in Abhängigkeit äußerer Bedingungen moduliert werden kann; dies ist wichtig mit Blick auf die enge Struktur-Funktion-Korrelation in biologischen Systemen. Andererseits besteht gerade von Seiten der Medizin ein großes Interesse an der Erforschung der Proteinfaltung, da man sich davon neue bzw. neuartige Therapieansätze verspricht.

Auf Grund der komplexen Zusammensetzung des intrazellulären Milieus werden viele Untersuchungen zur Proteinfaltung *in vitro* durchgeführt. Grundsätzlich ist man interessiert, die Thermodynamik und Kinetik faltender Proteine zu untersuchen.

Im Praktikumsversuch werden wir die Kinetik der Faltung von 2 Modellproteinen unter die Lupe nehmen. Wir arbeiten dabei unter pre-steady-state Bedingungen. Das bedeutet, die Faltungsreaktion beginnt fernab vom Gleichgewicht und wir untersuchen die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung nach Auslösung der Faltungsreaktion. Alternativ kann man die Faltung von Proteinen auch unter Gleichgewichtsbedingungen verfolgen (steady state).

Wie läuft die Proteinfaltung ab? Welche Zustände werden außer entfaltetem (ungeordnetem) und gefaltetem (geordnetem bzw. nativem) Zustand noch populiert?

Als Modellproteine werden α -Lactalbumin (aus Rind) und Lysozym (aus Hühnereiweiß) verwendet.

α -Lactalbumin – ein Bestandteil der Molke – ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 14,2 kDa und besteht aus 123 Aminosäuren. Es gehört zur Familie der Calciumbindenden Metalloproteine.

Lysozym ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 14,4 kDa und besteht aus 129 Aminosäuren.

Abb. 1 zeigt die nativen Strukturen von α -Lactalbumin und Lysozym. Die β -Subdomänen in beiden Proteinen bestehen aus kleinen β -Faltblättern, die grün gezeichnet sind. Die α - und 3_{10} -Helices der α - und β -Domänen sind jeweils rot dargestellt, die Disulfidbrücken gelb. Das von α -Lactalbumin gebundene Calciumion ist blau unterlegt. Die strukturellen Ähnlichkeiten der beiden Proteine sind leicht zu erkennen, die Proteine weisen eine Sequenzhomologie von 40 % auf.

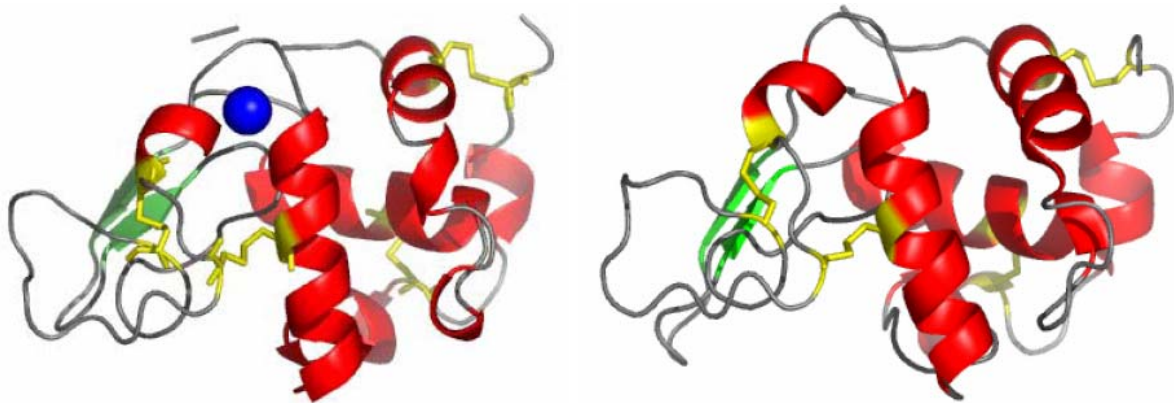


Abb.1 Strukturen von α -Lactalbumin aus Rind (links) und Lysozym aus Hühnereiweiß (rechts) in der Ribbon-Darstellung PDB-Codes: 1HFZ (α -Lactalbumin) bzw. 1E8L (Lysozym). Die Abbildungen wurden mit Hilfe von PyMOL hergestellt.

Methoden

Stopped-Flow-Messungen

Um die Kinetik der Faltung von Proteinen zu charakterisieren, können verschiedene Methoden angewendet werden. Im Rahmen des Praktikumsversuchs bedienen wir uns der Stopped-flow-Methode. Die schematische Darstellung einer Stopped-flow-Apparatur ist in Abbildung 2 zu sehen. Hierbei werden zwei verschiedene Lösungen sehr schnell miteinander gemischt, wobei eine Reaktion ausgelöst wird. Man befüllt zwei separate Spritzen (**b** und **c**) über Vorratsspritzen (**d** und **e**) mit den betreffenden Lösungen. Das Experiment beginnt, indem die beiden Lösungen z.B. über eine pneumatisch regulierte Ramme (**a**) in die Mischzelle (**g**) geschossen werden. Die Mischung erfolgt und die Reaktion setzt ein. Über die Mischzelle tritt die Mischung in die Küvette (**h**) ein und erreicht die Stoppspritze (**k**). Diese wird somit gefüllt, wodurch der Kontakt zum Trigger (**l**) hergestellt wird. Mit der Triggerung des Detektors beginnt die Detektion der Reaktion in der Küvette. Licht einer Lampe (**i**) durchtritt die Küvette und über einen Photomultiplier (**j**) wird beispielsweise die Absorption der Mischung in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt.

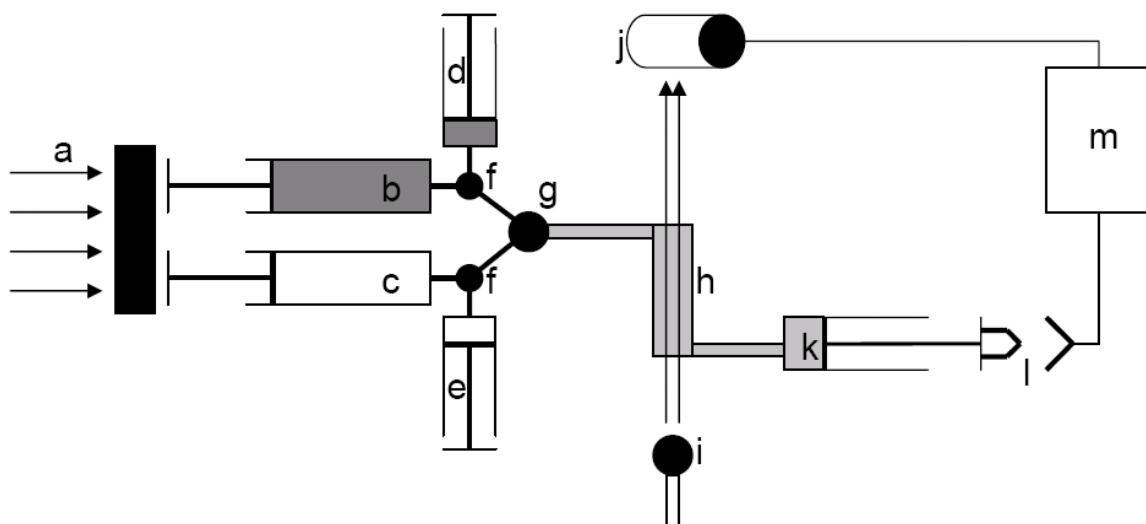


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Stopped-flow-Apparatur.

a Ansteuerung
b Reaktionslösung 1
c Reaktionslösung 2
d Vorratsspritze 1
e Vorratsspritze 2

f Drei-Wegehahn
g Mischzelle
h Küvette / Optische Zelle
i Lampe
j Photomultiplier

k Stoppspritze
l Trigger
m Detektor

Modifikationen der in Abbildung 2 schematisch dargestellten Apparatur bestehen in der Natur des Antriebs und der Triggerung sowie der Wahl von Lichtquelle und Detektor. Je nach untersuchter Reaktion können so beispielsweise die zeitabhängigen Änderungen von Absorption, Zirkulardichroismus, Fluoreszenz oder Lichtstreuung aufgezeichnet werden. Es ist offensichtlich, dass durch den Triggermechanismus die Detektion der Reaktion zeitlich verzögert beginnt. Nach Initiation der Reaktion in der Mischzelle muss die Reaktionslösung den Weg bis in die Stoppspritze zurücklegen. Dies dauert typischerweise 1 bis 5 ms (Totzeit der Apparatur). Die Reaktionsereignisse während dieser Zeit können folglich nicht detektiert werden.

Proteinfaltungsreaktionen werden gewöhnlich über die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität verfolgt. Dabei macht man sich zunutze, dass die Tryptophanseitenketten des Proteins als natürliche Fluorophore Licht bei einer Wellenlänge von 289 nm absorbieren und diese nach Relaxationsprozessen bei höheren Wellenlängen emittieren. Da sich während der Proteinfaltung die Umgebung der Tryptophane ändert, ändert sich die Signalintensität während der Faltung durch Abschirmung (Fluoreszenzlöschung bzw. Quenching durch benachbarte Aminosäureseitenketten). Im Versuch wird auf die optische Zelle monochromatisches Licht einer Hg/Xe-Lampe von 289 nm eingestrahlt und – abweichend von der Darstellung in Abb.2 – senkrecht dazu (*Warum?*) die Fluoreszenz als Funktion der Zeit detektiert. Wir werden im Rahmen des Praktikums sowohl Entfaltungs- als auch Rückfaltungsreaktionen untersuchen, d.h. man beobachtet den Übergang vom gefalteten in den entfalteten Zustand und umgekehrt. Die zeitabhängige Detektion der Fluoreszenzänderung erlaubt die Extraktion kinetischer Information über beide Prozesse.

Warum verändert sich die Fluoreszenz? Theoretischer Hintergrund?

Wie unterscheiden sich Absorptions- und Fluoreszenzspektrum? Warum?

Kennen Sie weitere Methoden, die Kinetik der Faltung von Proteinen zu charakterisieren?

Wenn ja, welche?

Welchen Zeitrahmen decken diese Methoden ab bzw. was sind die Totzeiten der einzelnen Methoden?

Welche Möglichkeiten gibt es, Proteine zu denaturieren (zu entfalten)? Wie kann die Rückfaltung ausgelöst werden?

CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie (CD: Circular dichroismus) als eine chiroptische Messmethode ist eine Variante der Absorptionsspektroskopie, die die Chiralität von Molekülen ausnutzt. Voraussetzung für diese Spektroskopieart ist also das Vorliegen von optischer Aktivität der Probe, d. h. von unterschiedlicher Wechselwirkung mit links und rechts zirkular polarisiertem Licht.

Bei polarisiertem Licht schwingen der elektrische und der magnetische Feldvektor in einer bestimmten Vorzugsrichtung. Linear-polarisierte Strahlung kann man sich aus zwei entgegengesetzt umlaufenden zirkular-polarisierten Strahlen entstanden denken. Durch Überlagerung zweier linear-polarisierter Strahlungen mit einer $\lambda/4$ -Phasendifferenz entsteht zirkular-polarisierte Strahlung. Bei rechts-zirkular-polarisiertem Licht stehen die E -Feldvektoren senkrecht aufeinander und die linear-polarisierte Komponente E_1 läuft dem Wellenzug der zweiten linear-polarisierten Komponente E_2 um $\lambda/4$ voraus. Bei links-zirkular-polarisiertem Licht ist dies umgekehrt. Der resultierende elektrische Feldvektor beschreibt also eine Spiralbahn um die Ausbreitungsrichtung des Lichts.

Der Circular dichroismus nutzt nun die Tatsache, dass sich für eine optisch aktive Substanz die Extinktionskoeffizienten ϵ_L und ϵ_R für links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterscheiden. Die Differenz $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ ist die eigentliche Messgröße, in der Praxis wird jedoch die so genannte Elliptizität Θ_λ gemessen. Hierbei gilt:

$$\Theta_\lambda = \text{const.} \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d$$

mit c : Proteinkonzentration
 d : Schichtdicke der Küvette

Will man die Elliptizität experimentell bestimmen, muss man die Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht messen. Dafür wird zunächst linear polarisiertes Licht erzeugt, das daraufhin mittels eines $\lambda/4$ -Plättchens aus doppelbrechendem Material (z. B. Kaliumdihydrogenphosphat, Quarz, Glimmer) zu zirkular polarisiertem Licht umgeformt wird. Dies geschieht dann, wenn die Polarisations Ebene des einfallenden Strahls einen Winkel von 45° mit den optischen Achsen des Plättchens bildet.

In modernen Geräten werden zur Erzeugung des zirkular polarisierten Lichtes Kerr- oder Pockels-Zellen verwendet. Bestimmte Kristalle ändern ihre doppelbrechenden Eigenschaften

unter dem Einfluss elektrischer Felder; diesen Effekt nutzt man in der Pockels-Zelle aus, mit der sowohl links als auch rechts zirkular polarisiertes Licht erhalten wird, wenn man ein elektrisches Wechselfeld an den Kristall anlegt. Das Licht, das durch die Probe durchgelassen wird, nimmt ein Photomultiplier auf, und ein Computer errechnet aus den jeweiligen Intensitätswerten die Elliptizität.

Was versteht man unter dem Cotton-Effekt? Vergleichen Sie den Cotton-Effekt zwischen optischer Rotationsdispersion (ORD) und Circular dichroismus!

Welche Information erhält man aus einem CD-Spektrum und wie sehen die Spektren von Modellpeptiden aus?

Durchführung

Stopped-flow-Messungen:

Die Stopped-flow-Apparatur wird zuerst mehrmals mit Wasser, dann mit Puffer gespült. Gleichzeitig dazu sollte die Hg/Xe-Lampe angeschaltet werden, da die Lampe 30 min. zum Vorwärmen benötigt, sowie der Thermostat in Betrieb genommen werden. Hat der Thermostat die vorgegebene Temperatur erreicht, kann mit den eigentlichen Messungen begonnen werden. Es werden sowohl von α -Lactalbumin als auch von Lysozym Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen detektiert, wobei experimentelle Parameter, z. B. Temperatur, zu variieren sind. Es werden folgende Versuche durchgeführt:

1) Faltung von Lysozym bei variablen Temperaturen (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C)!

Endkonzentration Lysozym: μM

Endkonzentration GdmCl: μM

2) Faltung von α -Lactalbumin in 4 M Harnstoff durch Ca^{2+} -Zugabe bei variablen Temperaturen (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C)!

Endkonzentration α -Lactalbumin: μM

Endkonzentration Ca^{2+} : μM

3) Faltung von α -Lactalbumin in 4 M Harnstoff durch Sr^{2+} -Zugabe bei variablen Temperaturen (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C)!

Endkonzentration α -Lactalbumin: μM

Endkonzentration Sr^{2+} : μM

Folgende Puffer werden bei den **Stopped-flow-Messungen** verwendet:

Für Lysozym:

- 500 μM Lysozym in 6 M GdmCl, 20 mM NaAc, pH 5,2

- 20 mM NaAc, pH 5,2

Für α -Lactalbumin:

- 400 μM BLA in 4 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl, pH 7

- () μM Ca^{2+} in 4 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl, pH 7

- () μM Sr^{2+} in 4 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl, pH 7

CD-Messungen:

Am CD-Spektrometer wird zunächst der Stickstoff aufgedreht (mindestens 2 L/min Durchflussgeschwindigkeit), daraufhin werden das Temperaturbad, die Lampe und die Thermostat-Einheit eingeschaltet.

Die zu untersuchende Lösung wird in einem Volumen von 300 μL angesetzt, in eine 1 mm Messküvette eingefüllt und in den Strahlengang gestellt. Nach der Temperatur-Äquilibrierung (**2 min warten!**) kann die Messung gestartet werden.

Nach Beenden der Messung wird die Probe aus der Küvette herausgenommen, die Küvette mehrmals mit Wasser gespült und zum Schluss mit einem Luftstrom trocken geblasen. Die Messung kann dann bei einer neuen Temperatur wiederholt werden. Folgende Versuche werden am CD-Spektrometer durchgeführt:

1) Bestimmung der Bindungskonstante von Ca^{2+} an α -Lactalbumin mit variablen Ca^{2+} -Konzentrationen!

Endkonzentrationen Ca^{2+} :

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Endkonzentration BLA: μM

Temperatur: $^{\circ}\text{C}$

2) Bestimmung der Bindungskonstante von Sr^{2+} an α -Lactalbumin bei variablen Sr^{2+} -Konzentrationen!

Endkonzentrationen Sr^{2+} :

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Endkonzentration BLA: μM

Temperatur: $^{\circ}\text{C}$

3) Temperaturabhängige Entfaltung von α -Lactalbumin in Anwesenheit von Ca^{2+} !

Endkonzentration Ca^{2+} : μM

Endkonzentration BLA: μM

4) Temperaturabhängige Entfaltung von α -Lactalbumin in Anwesenheit von Sr^{2+} !

Endkonzentration Sr^{2+} : μM

Endkonzentration BLA: μM

Folgende Puffer werden bei den **CD-Messungen** verwendet:

Für α -Lactalbumin:

- 400 μM BLA in 4 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl, pH 7

- () μM Ca^{2+} in 4 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl, pH 7

- () μM Sr^{2+} in 4 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl, pH 7

Bei der Rückfaltung des α -Lactalbumins werden für jede Gruppe andere Ca^{2+} - bzw. Sr^{2+} -Konzentrationen verwendet!

Inbetriebnahme des π *-180 Fluoreszenzspektrometers

System:

1. System Schalter an
2. Lampe an; Hg/Xe Lampe (grün) für kinetische Messungen (insbes. CD: Hg/Xe-Lampe) die Lampe muss min. 30 Minuten leuchten, bevor ein stabiles Signal auftritt.

Stickstoff:

1. Grundversorgung auf 8 bar
2. Regulator der kinetischen Einheit auf 3,5 bar (für 2 2,5ml Spritzen)

Befüllen der internen Spritzen:

1. „Drive Ventil“ in die Füll-Position drehen (die Spitze des Dreiecks muss je zur Seite schauen).
2. Probe einfüllen, Flüssigkeit durch eine Spritze hineinpumpen, nicht am Stempel ziehen; durch Schieben des Stempels die Flüssigkeit wieder hinausdrücken; den Vorgang so lange wiederholen, bis keine Luftblasen mehr in der internen Spritze des Geräts sind.
3. „Drive Ventil“ in die „Drive-Position“ drehen (die Spitze des Dreiecks sollte nach vorne schauen [auf den Benutzer zu])

Reinigen der Maschine:

1. Befüllen der internen Spritzen mit Wasser.
2. Volumen Justier Schraube der Stoppspritze ganz aufdrehen.
3. Durch den Befehl „Drive“ (im „Spectrometer Control Panel“) das Wasser durch das System spülen.
4. Wahlweise kann man auch manuell reinigen.
5. Min. 30 ml durch das System spülen.

Auswertung

Die aufgenommenen Kinetiken werden mit Hilfe des Programms SigmaPlot 9 durch so genanntes Daten-Fitting an verschiedene Exponentialfunktionen ausgewertet. Auf diese Weise werden kinetische Informationen (\rightarrow Geschwindigkeitskonstanten) über die verschiedenen Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen von α -Lactalbumin und Lysozym erhalten, die daraufhin miteinander verglichen werden.

Was lässt sich auf der Basis der Geschwindigkeitskonstanten über den Mechanismus der Faltungsreaktionen von α -Lactalbumin und Lysozym aussagen?

Wo bestehen Gemeinsamkeiten, wo bestehen Unterschiede?

Wie werden die Fehler der Geschwindigkeitskonstanten ermittelt?

Aus den (temperaturabhängigen) Geschwindigkeitskonstanten werden die thermodynamischen Parameter ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger und ΔG^\ddagger der Übergangszustände der einzelnen Faltungsreaktionen ermittelt. Dazu dient die Eyring-Gleichung.

Leiten Sie die Eyring-Gleichung her und stellen Sie sie für unsere Zwecke um!

Welche Annahme machen wir hier, damit die Eyring-Gleichung zur Auswertung verwendet werden kann?

Welche zusätzlichen Informationen erhalten Sie so über die Faltungs- bzw. Entfaltungsreaktionen der beiden Proteine?

Aus den CD-Schmelzkurven von α -Lactalbumin in Gegenwart verschiedener Ionen lässt sich der Denaturierungspunkt ermitteln. Hierzu werden die 1. und die 2. Ableitung der Fit-Gleichung benötigt!

Leiten Sie die Gleichung, mit der Sie die Schmelzkurven gefittet haben unter Angabe der 1. und 2. Ableitung ab und berechnen Sie den Denaturierungspunkt des α -Lactalbumins in Gegenwart von Ca^{2+} und von Sr^{2+} .

Die kursiv unterlegten Fragen und Anleitungen sind in Vorbereitung des Versuchs und beim Schreiben des Protokolls zu beantworten bzw. zu studieren.

Bei Rückfragen bitte an

Dr. Kai Schlepckow (schlepckow@nmr.uni-frankfurt.de)

wenden (Tel. 069/798-29933).

Anfertigung des Protokolls

Jede Praktikumsgruppe schreibt ein gemeinsames Protokoll mit Einleitung, Durchführungs-, Ergebnis- und Diskussionsteil.

Einleitung:

Der Einleitungsteil gliedert sich in vier Unterkapitel:

1. Proteinfaltung allgemein, Chevron-Plot
2. α -Lactalbumin
3. Lysozym, Vergleich mit α -Lactalbumin
4. Stopped-Flow und CD-Spektroskopie

Diese Unterkapitel werden unter den vier Praktikumsmitgliedern einer Gruppe aufgeteilt, zu jedem Kapitel werden zwei oder drei Veröffentlichungen ausgegeben, mit deren Hilfe das entsprechende Kapitel zu bearbeiten ist, d. h. eine Person befasst sich mit dem ersten Unterkapitel, die zweite mit dem zweiten usw. Zum Schluss werden die vier Unterkapitel in das Protokoll aufgenommen.

Folgende Paper werden für die Unterkapitel vorgegeben:

1. Proteinfaltung allgemein, Chevron-Plot: - Jahn, T.R. et al.: The Yin and Yang of protein folding
FEBS Journal 272 (2005), 5982-5970

- Naganathan, A.N. et al.: Dynamics, Energetics, and Structure in Protein Folding
Biochemistry 45 (2006), 8466-8475

- Zarrine-Afsar, A. et al.: The analysis of protein folding kinetic data produced in protein engineering experiments
Methods 34 (2004), 41-50

2. α -Lactalbumin
- Bushmarina, N.A. et al: Cofactor effects on the protein folding reaction: Acceleration of α -lactalbumin refolding by metal ions
Protein Science 15 (2006), 659-671
 - Forge, V. et al.: Rapid Collapse and Slow Structural Reorganisation During the Refolding Of Bovine α -Lactalbumin
J. Mol. Biol. 288 (1999), 673-688
3. Lysozym, Vergleich mit α -Lactalbumin:
- Kiefhaber, T.: Kinetic traps in lysozyme folding
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 9029-9033
 - Noyelle, K. et al.: The Fast Folding Pathway in Human Lysozyme and its Blockage by Appropriate Mutagenesis: A Sequential Stopped-Flow Fluorescence Study
J. Mol. Biol. 308 (2001), 807-819
4. Stopped-Flow und CD-Spektroskopie:
- Roder, H. et al.: Rapid mixing methods for exploring the kinetics of protein folding
Methods 34 (2004), 15-27
 - Adler, A.J. et al.: Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Polypeptides
Methods in Enzymology 27 (1973), 675-681, 686-692, 697-712, 729-735

Durchführungs-, Ergebnis- und Diskussionsteil:

Durchführungs-, Ergebnis- und Diskussionsteil werden von jeder Praktikumsgruppe gemeinsam verfasst.

Benotung:

Jeder Praktikumsteilnehmer wird separat benotet. Für die jeweiligen Einleitungsthemen ist jeder Teilnehmer selbst verantwortlich. Für den Durchführungs-, Ergebnis- und Diskussions- teil erhält jede Gruppe die gleiche Note. Die Gesamtnote setzt sich aus beiden Noten zusammen.

Allgemeines:

- Rechtschreib-, Grammatik- und Zeichensetzungsfehler sollten vermieden werden!
- Tabellen und Abbildungen sind wissenschaftlich korrekt zu beschriften!
- Bei der Angabe von Messwerten sind die Einheiten mit anzugeben!
- Die Textformatierung ist über das gesamte Protokoll beizubehalten!

Rückgabe:

Die Rückgabe des Protokolls erfolgt erst, nachdem alle Praktikumsteilnehmer ihr Protokoll abgegeben haben! Der Abgabetermin für die einzelnen Gruppen ist in untenstehender Tabelle angegeben:

Versuchstag		Abgabetag Protokoll
Dienstag, 03.11.2009	—————>	Dienstag, 08.12.2009
Mittwoch, 04.11.2009	—————>	Mittwoch, 09.12.2009
Donnerstag, 05.11.2009	—————>	Donnerstag, 10.12.2009
Freitag, 06.11.2009	—————>	Freitag, 11.12.2009
Montag, 09.11.2009	—————>	Montag, 14.12.2009
Dienstag, 10.11.2009	—————>	Dienstag, 15.12.2009
Mittwoch, 11.11.2009	—————>	Mittwoch, 16.12.2009
Donnerstag, 12.11.2009	—————>	Donnerstag, 17.12.2009
Dienstag, 17.11.2009	—————>	Dienstag, 22.12.2009