

# **Einfluss Ionischer Flüssigkeiten auf die Faltung und Aggregation des grün fluoreszierenden Proteins**

**Dissertation**

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Heiko Pultke

geboren am 06.11.1978 in Wilhelm-Pieck-Stadt Guben

Gutachter:

1. PD Dr. Hauke Lilie
2. Prof. Dr. Jochen Balbach
3. Prof. Dr. Udo Kragl

Verteidigung der Arbeit am 19.12.2019







## Abkürzungen

Ammoeng™	Eigenname von Solvent Innovation – quartäre Amine mit Oligoethylenglykol-Ketten
BMIM Cl	1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid
EMIM Cl	1-Ethyl-3-methylimidazoliumchlorid
HMIM Cl	1-Hexyl-3-methylimidazoliumchlorid
MBPy BF <sub>4</sub>	4-Methyl-N-butyl-pyridiniumtetrafluorborat
MMIM DMP	1,3-Dimethylimidazoliumdimethylphosphat
HO-EMIM Cl	1-(2-Hydroxyethyl)-3-methylimidazoliumchlorid
HO-EPy Cl	1-(2-Hydroxyethyl)-pyridiniumchlorid
HO-HMIM Cl	1-(6-Hydroxyhexyl)-3-methylimidazoliumchlorid
HO-PMIM Cl	1-(3-Hydroxypropyl)-3-methylimidazoliumchlorid
PMIM Cl	1-Propyl-3-methylimidazoliumchlorid
#	Anzahl
μF	Einheit der elektrischen Kapazität (Farad)
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CD	<i>circular dichroism</i> – Zirkulardichroismus
CIP	<i>Cleaning in Place</i>
cps	<i>counts per second</i> – Impulse pro Sekunde
DCl	Deuteriumchlorid
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DKP	Diketopiperazin
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> – Desoxyribonukleinsäure
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> – Dynamische Differenzkalorimetrie
DTT	Dithiothreitol
E <sub>280</sub>	Extinktion bei 280 nm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> – verstärktes grün fluoreszierendes Protein
ESI	Elektrospray-Ionisation
g	Gravitationsbeschleunigung [m/s <sup>2</sup> ]
GFP	<i>green fluorescent protein</i> – grün fluoreszierendes Protein
Gly	Glycin
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
GuDCl	deutერიertes Guanidinhydrochlorid
h	<i>hour</i> – Stunde
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i> (besondere Form der 2D-NMR-Spektroskopie)
IB	<i>inclusion bodies</i> – unlösliche Einlagerung von Proteinen in Bakterien

IL	<i>ionic liquids</i> – Ionische Flüssigkeit
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i> – immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante (M)
LMW	<i>low molecular weight</i> – Proteinmarker für SDS-PAGE
Lys	Lysin
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight</i> Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation – Flugzeit
min	Minute
mM	Millimolar
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> – Molekulare Ausschlussgröße
NaOD	Natriumdeuteriumoxid
MRW	<i>mean residue weight</i> – mittlere Molmasse einer Aminosäure des Proteins
OD <sub>600</sub>	optische Dichte, gemessen bei 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pD-Wert	pH-Wert in D <sub>2</sub> O
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> – pH-Wert
pI	Isoelektrischer Punkt
PPI	Peptidyl-prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
ppm	<i>parts per million</i> – Teile von einer Million
QS	Quarzglas Suprasil
R	Formelzeichen für den elektrischen Widerstand
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i> – Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
rpm	<i>revolution per minute</i> – Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SASA	<i>solvent accessible surface area</i> – lösungsmittelzugängliche Oberfläche
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> – Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
T	Temperatur
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> – Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
T <sub>m</sub>	Temperaturmittelpunkt
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Tyr	Thyrosin
U	Formelzeichen der elektrischen Spannung
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VIS	<i>visible</i> – sichtbarer Bereich des Lichts
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	<i>wild type</i> – Wildtyp
ε <sub>280</sub>	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm

$\lambda$	Wellenlänge
$\lambda_{\text{em.}}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{\text{exc.}}$	Anregungswellenlänge
$\Omega$	Einheit des elektrischen Widerstandes (Ohm)

#### *Anmerkungen zur Terminologie*

Die in der Fachliteratur allgemein verwendeten Abkürzungen für chemische oder biochemische Sachverhalte und Begriffe sind nicht im Abkürzungsverzeichnis enthalten.

Die im Text verwendeten Anglizismen sind *kursiv* gekennzeichnet. Sie sind auch genannt, wenn ein äquivalenter deutscher Ausdruck oder Fachbegriff existiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Ausdrucksformen für die chemisch oder thermisch induzierte Denaturierung beziehungsweise Entfaltung sind gleich zu verstehen.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Proteinfaltung <i>in vitro</i> .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Einfluss von Additiven auf die Proteinfaltung .....	5
1.1.1.1. Die Hofmeister-Reihe .....	7
<b>1.2. Ionische Flüssigkeiten .....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Allgemeine physikalische und chemische Eigenschaften .....	9
1.2.2. Anwendungen in der organischen Synthese.....	11
1.2.3. Anwendungen der Ionischer Flüssigkeiten in der Biokatalyse und Proteinchemie.....	12
<b>1.3. Das grün fluoreszierende Protein als Modellprotein .....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Historie - Von der Entdeckung bis zur Kristallstruktur .....	16
1.3.2. Struktur, Eigenschaften und Varianten des GFP .....	18
1.3.3. Faltung und Aggregation von GFP (EGFP).....	21
<b>1.4. Zielstellung der Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1. Materialien .....</b>	<b>26</b>
2.1.1. Geräte .....	26
2.1.2. Sonstige Geräte, Kits, Referenzmarker und Materialien.....	28
2.1.3. Chemikalien .....	29
2.1.3.1. Ionische Flüssigkeiten .....	29
2.1.3.2. Allgemeine Chemikalien.....	30
2.1.4. Enzyme und Proteine .....	32
2.1.5. Organismen und Plasmide.....	32
2.1.6. Software .....	32
2.1.7. Geräte anderer Einrichtungen.....	33
2.1.8. Medien, Lösungen, Puffer .....	33
2.1.8.1. Bakterienanzucht .....	33
2.1.8.2. Gelelektrophorese.....	35
2.1.8.3. Chromatographie – Laufmittel und Puffer .....	36
2.1.8.4. Sonstige Puffer .....	36
<b>2.2. Methoden.....</b>	<b>37</b>
2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	37
2.2.1.1. Klonierung und Sequenzierung .....	37
2.2.1.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA .....	37
2.2.1.1.2. Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	37
2.2.2. Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen .....	37
2.2.2.1. Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen .....	37
2.2.2.2. Transformation von Mikroorganismen .....	38
2.2.2.3. Expressionstests in M9-Minimalmedium.....	38
2.2.2.4. Expression in Komplexmedien .....	39
2.2.2.4.1. Kultivierung in Schüttelkulturen .....	39
2.2.2.4.2. Kultivierung im Bioreaktor - Fermentation.....	39
2.2.2.5. Expression in M9-Minimalmedium zur <sup>15</sup> N-Markierung von EGFP.....	40
2.2.2.6. Zellernte und Zellaufschluss .....	40
2.2.3. Proteinchemische Methoden .....	41
2.2.3.1. Proteinfällung für SDS-PAGE .....	41

2.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	41
2.2.3.3. Dialyse von Proteinen .....	42
2.2.3.4. Konzentrierung von Proteinen .....	42
2.2.3.5. Deuterierung von Proteinlösungen .....	43
2.2.4. Chromatographische Methoden und Proteinreinigung .....	43
2.2.4.1. Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitätschromatographie .....	43
2.2.4.2. Prozessierung von EGFP durch Enterokinase .....	44
2.2.4.3. Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie .....	45
2.2.4.4. Reversed Phase-High Performance Liquid-Chromatography .....	45
2.2.5. Spektroskopische und spektrometrische Methoden .....	46
2.2.5.1. UV/VIS-Spektroskopie .....	46
2.2.5.1.1. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie .....	46
2.2.5.1.2. Reinheitsbestimmung Ionischer Flüssigkeiten mittels UV/VIS-Spektroskopie .....	48
2.2.5.2. Fluoreszenzspektroskopie .....	49
2.2.5.2.1. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an EGFP .....	51
2.2.5.2.2. Fluoreszenzspektren .....	51
2.2.5.2.3. Kinetische Untersuchungen mittels Fluoreszenz .....	52
2.2.5.2.4. Langzeitkinetiken der GuHCl induzierten Denaturierung .....	53
2.2.5.3. Zirkulardichroismus (CD-Spektroskopie) .....	54
2.2.5.3.1. Zirkulardichroismus im Fern-UV .....	55
2.2.5.3.2. Zirkulardichroismus im Nah-UV .....	55
2.2.5.3.3. Zirkulardichroismus im VIS .....	56
2.2.5.3.4. Kinetiken der Änderung des Zirkulardichroismus im Nah-UV .....	56
2.2.5.4. Infrarotspektroskopie (IR) .....	57
2.2.5.4.1. IR-spektroskopische Untersuchungen .....	58
2.2.5.5. Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	58
2.2.5.6. Kernresonanzspektroskopie (NMR) .....	59
2.2.5.6.1. 1D-NMR-Spektren .....	59
2.2.5.6.2. 2D-NMR-Spektren .....	60
2.2.5.6.3. Kinetische Auswertung von <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-TROSY-HSQC-Spektren .....	60
2.2.5.7. Massenspektrometrie .....	61
2.2.5.8. Refraktometrische Bestimmung der GuHCl-Konzentration .....	61
2.2.6. Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (AF4) .....	61
2.2.7. Kinetische Analysen .....	63
2.2.8. Statistik .....	64
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
3.1. Ionische Flüssigkeiten .....	65
3.1.1. Spektroskopische Eigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten .....	65
3.1.1.1. Absorptionseigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten .....	66
3.1.1.2. Fluoreszenzeigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten .....	67
3.1.1.3. Eigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten im Infrarot .....	68
3.2. Herstellung und Reinigung von EGFP .....	69
3.2.1. Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> .....	69
3.2.2. Reinigung und Prozessierung von EGFP .....	70
3.3. Spektroskopische Charakterisierung von EGFP .....	71
3.3.1. Absorptionsspektren des EGFP .....	71
3.3.2. Fluoreszenzspektren des EGFP .....	73
3.3.3. CD-Spektren des EGFP .....	75

3.3.4.	IR-Spektren des EGFP .....	76
3.3.5.	2D-NMR-Spektren des EGFP .....	78
3.3.6.	pH-Stabilität des EGFP .....	79
<b>3.4.</b>	<b><i>in vitro</i>-Faltung von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten.....</b>	<b>80</b>
<b>3.5.</b>	<b>Denaturierung und Renaturierung von EGFP.....</b>	<b>87</b>
3.5.1.	Denaturierung des EGFP durch GuHCl .....	87
3.5.2.	Renaturierung des EGFP aus dem GuHCl-induziert denaturierten Zustand.....	90
<b>3.6.</b>	<b>Denaturierung und Renaturierung des EGFP in Ionischen Flüssigkeiten .....</b>	<b>95</b>
3.6.1.	Denaturierung des EGFP durch Ionische Flüssigkeiten.....	95
3.6.2.	Strukturelle Unterschiede im chemisch induzierten denaturierten Zustand von EGFP.....	98
3.6.3.	Renaturierung des EGFP aus HMIM Cl in Abhängigkeit der Konzentration und Inkubationsdauer .....	102
3.6.4.	Aggregation im denaturierten Zustand.....	107
<b>3.7.</b>	<b>Oligomerisierung in Ionischen Flüssigkeiten.....</b>	<b>114</b>
<b>3.8.</b>	<b>Kinetische Analysen der chemisch induzierten Entfaltung mittels 2D-NMR-Spektroskopie .....</b>	<b>117</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>126</b>
<b>4.1.</b>	<b>Einfluss Ionischer Flüssigkeiten bei der <i>in vitro</i>-Faltung .....</b>	<b>127</b>
4.1.1.	Variation der Kationen bei der <i>in vitro</i> -Faltung von EGFP .....	128
4.1.2.	Einfluss weiterer Ionischer Flüssigkeiten als Faltungshelfer .....	132
<b>4.2.</b>	<b>Denaturierung und Renaturierung von EGFP .....</b>	<b>135</b>
4.2.1.	Ionische Flüssigkeiten als Denaturierungsmittel.....	136
<b>4.3.</b>	<b>Interaktionen und Wirkmechanismen Ionischer Flüssigkeiten mit EGFP ...</b>	<b>137</b>
4.3.1.	Strukturelle Unterschiede im denaturierten Zustand von EGFP .....	143
<b>4.4.</b>	<b>Aggregationsverhalten von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten .....</b>	<b>145</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>147</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>149</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>157</b>
7.1.	Kinetische Parameter der Denaturierung und Renaturierung von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl.....	157
7.2.	Kinetische Parameter der Intensitätsänderungen aus <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-TROSY-HSQC Spektren von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl.....	163
7.3.	Änderung der chemischen Verschiebung in <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-TROSY-HSQC-Spektren von EGFP in Gegenwart von 1 M HMIM Cl.....	170
7.4.	Übersicht zugeordneten Aminosäuren aus den <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-TROSY-HSQC-Spektren von EGFP in Gegenwart von 1 M HMIM Cl.....	171
7.5.	Aminosäuresequenz und physikalische Eigenschaften der verwendeten EGFP-Variante.....	175
7.6.	Chemische Struktur der genutzten Ionischen Flüssigkeiten.....	176
<b>I.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>177</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>180</b>
<b>III.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>182</b>

**IV. Publikationen, Vorträge und Poster..... 183**  
**V. Danksagung..... 184**  
**VI. Eidesstattliche Erklärung..... 186**

# 1. Einleitung

Proteine spielen aufgrund ihrer vielseitigen Wechselwirkungen mit anderen Biomolekülen eine Schlüsselrolle in nahezu allen biologischen Prozessen. Fast alle Vorgänge in einem lebenden Organismus werden von Proteinen beeinflusst und gesteuert. Sie erfüllen ein weites Spektrum an Funktionen, sind Bestandteil der Zellstruktur, beteiligt am Aufbau und der Herstellung anderer Proteine, sorgen für den Transport und die Speicherung von Stoffen und regulieren den gesamten Stoffwechsel einer Zelle. Entscheidend hierfür sind dauerhafte oder vorübergehende Interaktionen mit anderen Proteinen oder mit DNA, RNA, Kohlenhydraten, Fetten oder niedermolekularen Verbindungen, wie Vitaminen. Um diese Wechselwirkungen mit anderen Reaktionspartnern eingehen zu können, ist eine spezifische dreidimensionale Struktur unabdingbar. Nur die korrekte Faltung und das Vorhandensein der richtigen Konformation resultiert in einem funktionsfähigen Protein.

Die benötigten Informationen für die finale Strukturgebung sind bereits in der Primärstruktur enthalten (Anfinsen et al., 1961). Der Weg zur Funktionalität ist sowohl bei der *in vivo*-, als auch bei der *in vitro*-Faltung sehr komplex und nicht immer geradlinig. Dass die Proteinfaltung kein rein zufälliger Prozess sein kann, in dem allein durch die statistische Suche über die Rotation der Bindungswinkel benachbarter Aminosäuren die energetisch günstigste Konformation eingenommen wird, wurde schnell erkannt (Levinthal, 1968). Die durch diese Annahme resultierenden Unmengen an theoretischen Kombinationsmöglichkeiten, welche bereits bei Proteinen mit wenigen Aminosäuren entstünden, würden, selbst bei einer angenommenen mittleren Molekülschwingungsperiode von  $10^{-11}$  bis  $10^{-13}$  Sekunden, astronomische Zeiten benötigen. Da in der Regel Proteine aber in einem Zeitfenster von Millisekunden bis Minuten falten, müssen andere Mechanismen existieren.

Um den Faltungsprozess von Proteinen zu erklären, sind seitdem eine Vielzahl von Modellen aufgestellt worden, die den Weg vom Zustand eines ungefalteten, denaturierten Proteins hin zum korrekt gefalteten, nativen Protein beschreiben. So geht das *framework model* zunächst davon aus, dass sich zu Beginn des Faltungsprozesses Sekundärstrukturen ausbilden und sich diese im späteren Verlauf entsprechend zueinander orientieren, um die native Form zu bilden. Die Formierung eines Nukleus als Startpunkt für die Ausbildung der Tertiärstruktur ist die Annahme beim *nucleation condensation model*. Dass dieser Effekt allein durch die hydrophoben Aminosäuren angetrieben wird, nimmt das Modell des *hydrophobic collapse* auf. Hierbei wird das Lösungsmittel (Wasser) durch die Anordnung der hydrophoben Aminosäuren im Inneren des Proteins verdrängt. Im Anschluss an den hydrophoben Kollaps bilden sich die

Sekundär- und Tertiärstrukturen aus. Zu diesen konventionellen Anschauungen der Proteinfaltung gibt es auch die Modellvorstellung des Faltungstrichters (*folding funnel*). Das Prinzip besteht darin, dass im Vergleich zum gefalteten Zustand der ungefaltete Zustand als nicht definiert, sondern als statistischer Mittelwert von Zuständen beschrieben wird, welche sich enthalpisch und entropisch voneinander unterscheiden können. Entlang einer dreidimensionalen Energieoberfläche, dem Faltungstrichter, können die Proteinmoleküle durch konformationelle Änderungen und Abgabe freier Energie während des Faltungsprozesses verschiedene Pfade und auch Intermediate durchlaufen, um zum energetischen Minimum, dem gefalteten (nativen) Zustand, zu gelangen. Die Energiedifferenz zwischen diesen beiden Zuständen ist Ausdruck für die thermodynamische Stabilität eines Proteins. Ob alle Moleküle des Proteins denselben Pfad beschreiten, oder ob es mehrere Pfade auf dem Wege zum nativen Zustand gibt, bleibt jedoch unklar.

Die spontanen Prozesse der Proteinfaltung *in vivo* sind sehr viel komplexer. Zellen verfügen über eine Palette von Proteinsystemen, welche die Faltungsprozesse anderer Proteine unterstützen, sogenannte Faltungshelfer beziehungsweise Faltungskatalysatoren. Zu den Faltungshelfern, den sogenannten molekularen Chaperonen, zählt man unter anderen die Familie der Hitzeschockproteine (Hsp) wie die prokaryontischen Proteinkomplexe GroEL (Hsp60, *Escherichia coli chaperonin 60*) und GroES (*Escherichia coli chaperonin 10*). Eine verstärkte Genexpression und Synthese der Hsp wird durch zellulären Stress, vorrangig durch Hitzestress ausgelöst. Die Hsp binden über hydrophobe Wechselwirkungen an aggregationsanfällige Proteine und überführen diese, meist unter Verbrauch von ATP, in den nativen Zustand (Buchner, 1996). Die Faltungskatalysatoren beeinflussen geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Proteinfaltung wie etwa die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolin oder die Ausbildung von Disulfidbrücken. Katalysiert werden diese Reaktionen durch die Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPI) (Fischer & Schmid, 1990; Fischer, 1994) und die Oxidoreduktase wie zum Beispiel die Proteindisulfidisomerasen (PDI) (Freedman, 1984) oder Dsb A (Bardwell et al., 1991; Wunderlich et al., 1993).

Durch methodische Fortschritte in der Molekularbiologie, wie die Etablierung der rekombinanten DNA-Technologie, ist man heute in der Lage, nahezu beliebige Proteine in großen Mengen künstlich zu produzieren. So basieren viele biopharmazeutische Produkte auf der Produktion rekombinanter Proteine. Als eukaryontische Wirtsorganismen werden dazu zum Beispiel CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) für die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern, EPO (*Erythropoetin*), TNF (Tumornekrosefaktor) und Interferon, aber auch Hefen (*Saccharomyces*) zum Beispiel für die Insulinproduktion (Insulin aspart) genutzt. Der

große Vorteil bei der Nutzung von eukaryontischen Zellen ist die posttranslationale Proteinmodifikation der Proteine, wie etwa Glykosylierungen. Als prokaryontischer Wirtsorganismus wird in der Regel *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet und mit dessen Nutzung zum Beispiel G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), Interferon, Insulin und rPA (rekombinanter Plasminogenaktivator) produziert. Bei der mikrobiellen Produktion macht man sich die kurzen Generationszeiten der Bakterien zu Nutze, um schnell und preisgünstig große Mengen des Zielproteins zu gewinnen. Der Markt für biopharmazeutische Wirkstoffe auf Proteinbasis umfasst mittlerweile (Angaben von 2006) einen jährlichen Umsatz von 93 Milliarden US-Dollar und ist mit steigenden Umsätzen zunehmend bedeutsamer für die gesamte pharmazeutische Industrie (\*). Die 178 Produkte rekombinanten Ursprungs, von denen 107 eine Zulassung durch die amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde - FDA (*Food and Drug Administration*) besitzen, umfassen etwas mehr als zwei Drittel des gesamten Marktwertes. Die Bedeutung von *E. coli* als Wirtsorganismus bei der rekombinanten Produktion von Therapeutika spiegelt sich in 56 Produkten wider. Eine kostengünstige Variante der Produktion, welche auch im großtechnischen Maßstab umgesetzt werden kann, ist die Bildung von Proteinen in unlöslicher Form. Die in *E. coli* eingelagerten und in unlöslicher Form vorliegenden Proteine, die sogenannten *inclusion bodies* (*IB*), werden im Folgenden isoliert und *in vitro* unter Anwendung verschiedener Rückfaltungsstrategien und Zugabe chemischer Substanzen während der Rückfaltung in den korrekten, funktionsfähigen *nativen* Zustand überführt.

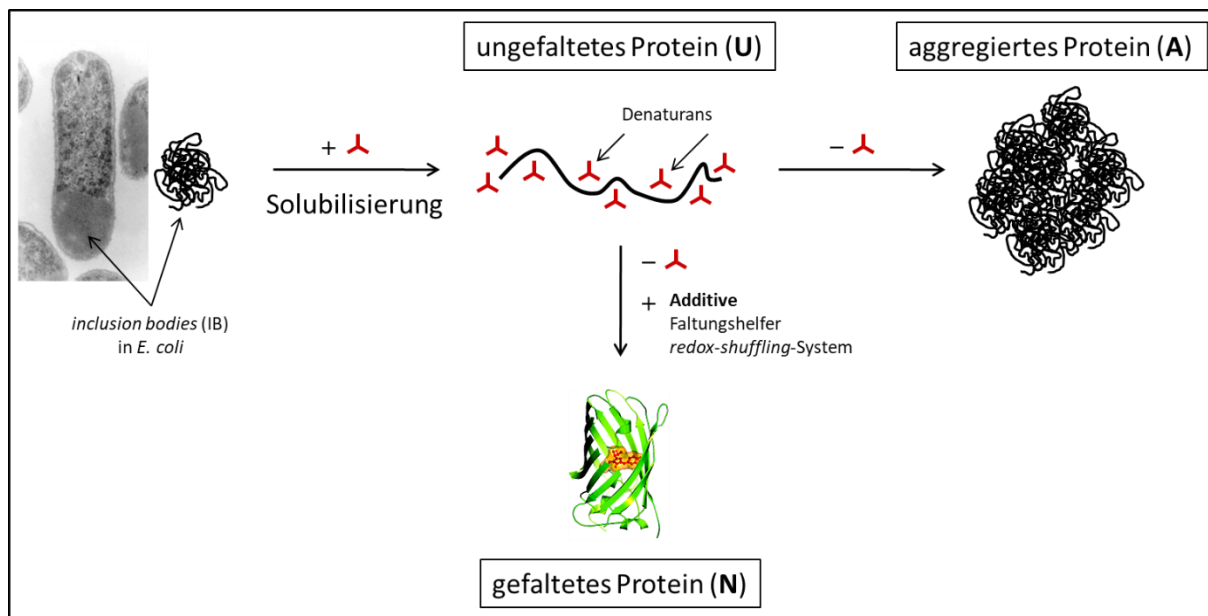
## 1.1. Proteinfaltung *in vitro*

Nicht alle Proteine können nach Überexpression der Gene in *E. coli* rekombinant in löslicher beziehungsweise aktiver Form gewonnen werden, erst recht nicht, wenn sie in sehr großen Mengen produziert werden sollen. Oftmals werden bei Überproduktion die Proteine von *E. coli* in Form von *inclusion bodies* in der Zelle separiert und eingelagert. Trotzdem ist die Proteingewinnung aus *inclusion bodies* mit entsprechender Faltungs- und nachgeschalteter Reinigungsstrategie wünschenswert und zielführend. Für die Gewinnung des aktiven Zielproteins müssen die *IB* zunächst in eine lösliche Form überführt werden.

---

\* Die Angaben über die biopharmazeutischen Produkte inklusive der vorgestellten Verkaufszahlen und Marktwerte sind dem *Biopharmaceutical Products in the U.S. and European Markets, Sixth Edition* von Ronald A. Rader entnommen.

Diese Solubilisierung wird durch starke Denaturanzien wie Guanidinhydrochlorid (GuHCl) oder Harnstoff in Kombination mit Reduktionsmitteln wie DTT (Dithiothreitol), reduziertem Glutathion (GSH) oder Cystein vermittelt. Aus dem denaturierten Zustand wird das Protein durch Entzug des Chaotrops über Verdünnung oder Dialyse in den gefalteten nativen Zustand überführt (Lim et al, 1989; Rudolph und Lilie, 1996). Bei Proteinen, die für die Ausbildung der nativen Konformation auf eine korrekte Disulfidverbrückung angewiesen sind, wird ein *redox-shuffling*-System, zum Beispiel bestehend aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG) in entsprechenden Konzentrationsverhältnissen, dem Rückfaltungsansatz zugefügt (Saxena & Wetlaufer, 1970; Wetlaufer et al., 1987). Bei komplexen, oligomeren oder disulfidverbrückten Proteinen in Kombination mit hohen Proteinkonzentrationen tritt als unerwünschte Nebenreaktion bei der Rückfaltung jedoch verstärkt eine Aggregation der Proteine auf (siehe **Abbildung 1.1**).



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der Proteinfaltung *in vitro*.

Die aus *E. coli* isolierten *inclusion bodies* (IB) werden durch starke Chaotrope wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid solubilisiert. Die in Lösung gebrachten, jedoch ungefalteten Proteine (U) werden nach Entfernung des Denaturans entweder aggregieren (A) oder in Gegenwart von Faltungsadditiven in die gefaltete (*native*) Form (N) überführt.

Diese Aggregationsreaktion steht in Konkurrenz zur Rückfaltung und gilt es zu reduzieren beziehungsweise zu unterdrücken. Um die Ausbeute bei der Rückfaltung zu erhöhen, können verschiedene Methoden angewandt und Zusätze dem Faltungsansatz beigefügt werden. Die Bedingungen während der Rückfaltung müssen auf jedes Protein abgestimmt werden. Hier besteht die Möglichkeit, die Faltungstemperatur, den pH-Wert, das *redox-shuffling*-System und die Dauer der Rückfaltung zu variieren. Ein weiteres Verfahren, um die Aggregation bei der



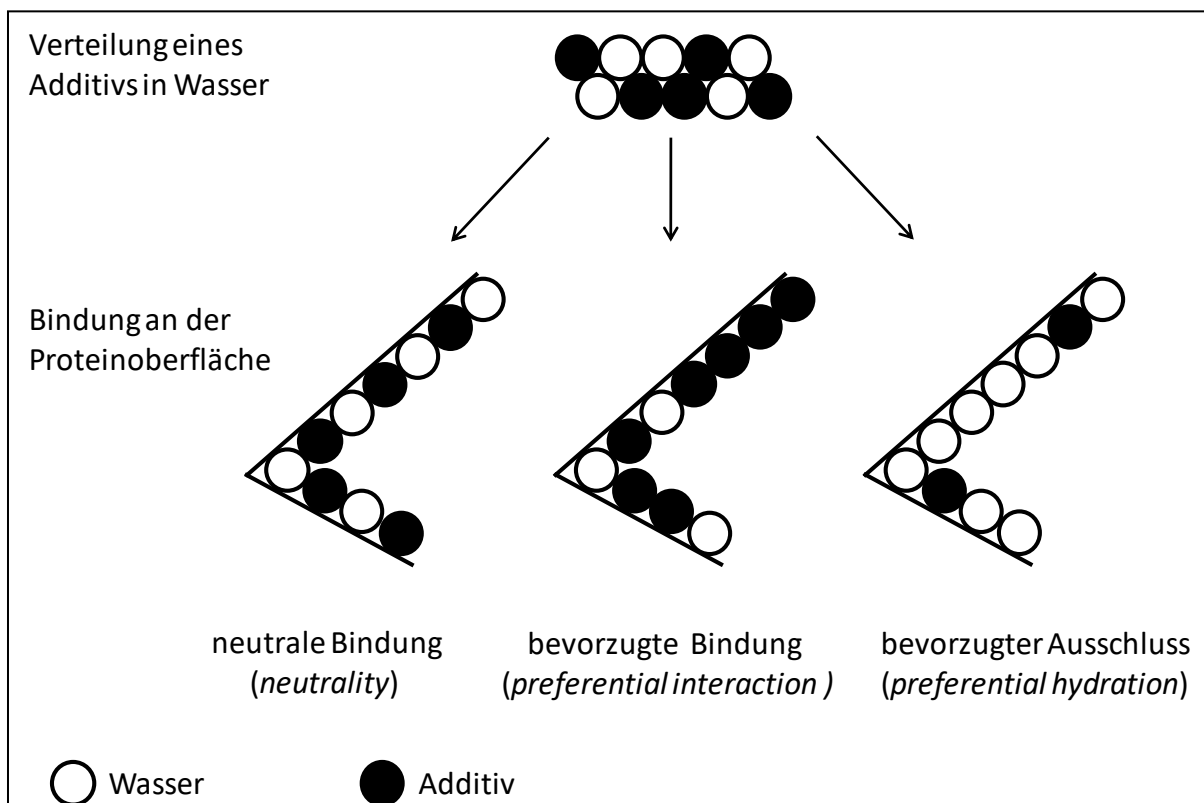
Renaturierung zu minimieren, ist die schrittweise Zugabe von kleinen Mengen an denaturiertem Protein zu definierten Zeitpunkten in den Rückfaltungsansatz (Lilie et al, 1998). Weiterhin ist bekannt, dass Pufferzusätze wie L-Arginin als Aggregationsunterdrücker (Rudolph & Fischer, 1990; Arakawa & Tsumoto, 2003; Reddy K et al., 2005), hochkonzentriertes Tris, Ethylenglycol, Detergenzien wie SDS, Polyamine oder anorganische Salze (Baldwin, 1996) die Faltungseffizienz *in vitro* erhöhen (Hamada et al., 2009). Seit einigen Jahren steigt in diesem Kontext das Interesse an einer neuen Klasse von Faltungsadditiven - den Ionischen Flüssigkeiten (*ionic liquids, IL*). An unterschiedlichen Proteinen wie Lysozym, rPA (*recombinant plasminogen activator*) und dem Antikörperfragment scFvOx (*anti-oxazolone single-chain antibody fragment*) konnte unter Verwendung von Ionischen Flüssigkeiten eine gesteigerte Renaturierungseffizienz gezeigt werden (Summers & Flowers II, 2000; Lilie et al., 2003; Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010). Der positive Effekt einer Erhöhung der Renaturierungseffizienz resultiert zum Teil aus der suppressiven Wirkung dieser Additive auf die Aggregation der Proteine. Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit sind weiterführende Untersuchungen, welche die Mechanismen und mögliche Erklärungen für die Effekte, Einflüsse und Wechselwirkungen von *ionic liquids* auf Proteine, speziell für das Modellprotein GFP (*green fluorescent protein*) aufzeigen.

### 1.1.1. Einfluss von Additiven auf die Proteinfaltung

Es gibt eine Reihe von Faktoren, die sich positiv oder negativ auf die Proteinfaltung auswirken können, unter anderen die Temperatur, pH-Wert, Proteinkonzentration und die Zusammensetzung des Reaktionsmediums mit den darin gelösten Salzen unterschiedlicher Art und Konzentration. Durch den Zusatz von Lösungsmitteladditiven (*low molecular additives*) kann die Rückfaltung stark beeinflusst werden. Diese Substanzen können einen destabilisierenden oder stabilisierenden Einfluss auf die strukturelle Integrität von Proteinen ausüben. Zu den destabilisierenden Substanzen gehören GuHCl, Harnstoff, SDS (*sodium dodecyl sulfate*) und chaotrope Salze, welche sich aus der Hofmeister-Reihe ableiten lassen. Diverse Aminosäuren, Zucker, mehrwertige Alkohole und kosmotrope Salze üben einen stabilisierenden Einfluss aus. Die Einflüsse von Salzen auf Proteine, wie in der Hofmeister-Reihe beschrieben, werden im nachstehenden Abschnitt näher erläutert.

Die Effekte von Lösungsmittelzusätzen auf Proteine beruhen in einer Modellvorstellung im Allgemeinen auf dem Vermögen des Additivs, eine Wasser-angereicherte beziehungsweise eine Wasser-verminderte Zone um das Protein aufzubauen (Timasheff, 2002). Die Additive

können hier eine passive Rolle einnehmen und sich neutral verhalten (*neutrality*) oder eine aktive Wirkung ausüben. Der Effekt von Lösungsmittelzusätzen bevorzugt mit Wassermolekülen des Lösungsmittels zu interagieren und somit von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden, sodass das Protein stark hydratisiert vorliegt, wird als *preferential hydration* bezeichnet. Das Ergebnis einer bevorzugten Interaktion von Denaturanzien und Detergenzien mit dem Peptidrückgrat oder hydrophoben Oberflächenbereichen, welche eine Verdrängung des Wassers von der Proteinoberfläche mit sich führt, entspricht der Modellvorstellung der *preferential interaction* (siehe **Abbildung 1.2**).



**Abbildung 1.2:** Darstellung verschiedener Interaktionsmöglichkeiten eines Additivs mit einer Proteinoberfläche nach TIMASHEFF (Timasheff, 2002).

Ein gelöstes Additiv kann bevorzugt mit der Proteinoberfläche interagieren (*preferential interaction*) oder von dieser ausgeschlossen werden und bevorzugt mit den Wassermolekülen des Lösungsmittels interagieren (*preferential hydration*). Eine dritte Möglichkeit beschreibt die Variante, dass die Konzentration des Additivs an der Oberfläche des Proteins gleich der des Lösungsmittels ist (*neutrality*).

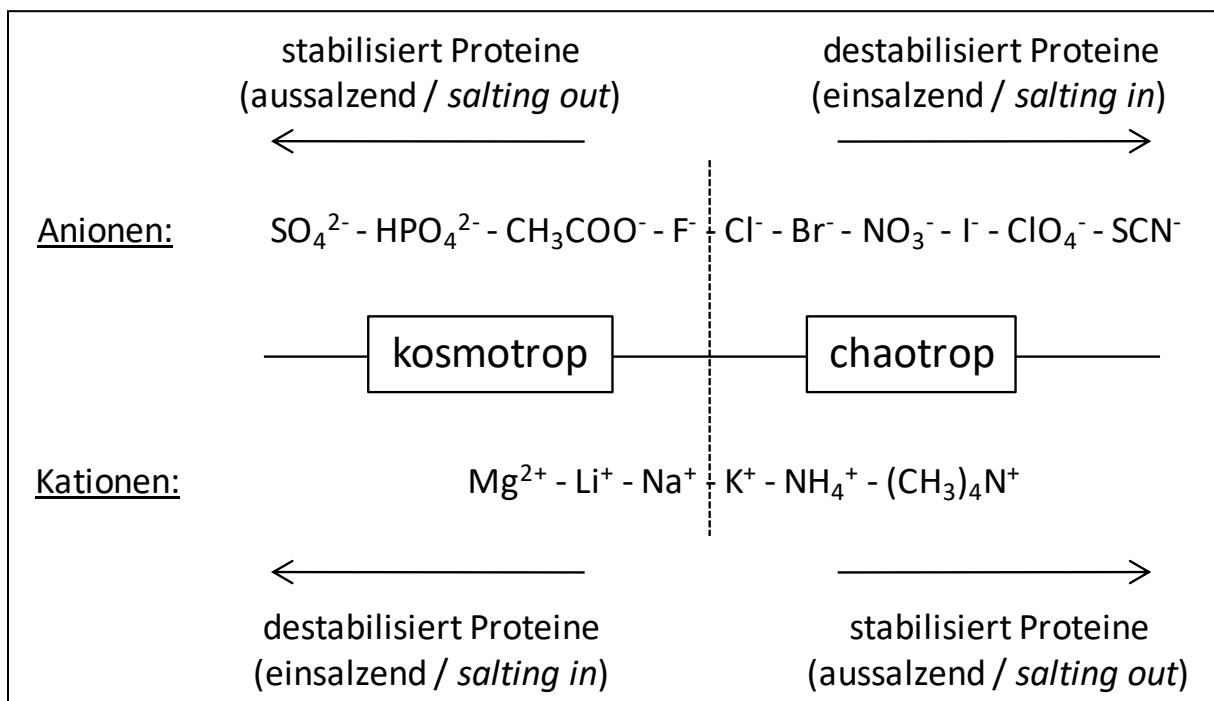
Die Verdrängung der Additive durch Wasser von der Proteinoberfläche (*preferential hydration*) führt zu einer Minimierung der zugänglichen Oberfläche und somit zu einer Stabilisierung eines kompakt gefalteten Zustands, dem des nativen Proteins. Eine bevorzugte Interaktion der Additive mit dem Protein (*preferential interaction*) führt zu einer Vergrößerung der Proteinoberfläche und eine Denaturierung des Proteins wird somit thermodynamisch begünstigt. Bei geringeren Konzentrationen an denaturierend wirkenden Additiven führen diese

Interaktionen mit Proteinen jedoch nicht zwangsläufig zur Entfaltung des Proteins, sondern zur Unterdrückung der Aggregation während der Rückfaltung (Rudolph et al., 1997). Ein sehr häufig eingesetztes Additiv bei der Proteinfaltung ist L-Arginin. Der positive Effekt bei der Rückfaltung beruht hier auf der Unterdrückung der Aggregation. Die Interaktion mit Proteinen resultiert in einer Erhöhung der Löslichkeit aggregationsanfälliger Spezies und Intermediate (Arakawa & Tsumoto, 2003; Reddy K et al., 2005). Darüber hinaus ist der Interaktionsmechanismus im Vergleich zu Denaturanzien verschieden, so dass L-Arginin bei hohen Konzentrationen nur minimal destabilisierend wirkt (Ishibashi et al., 2005). Weitere Faltungszusätze, durch welche eine Erhöhung der Ausbeute gezeigt werden konnte, sind Ionische Flüssigkeiten (Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010). Auch den Ionischen Flüssigkeiten wird eine aggregationsunterdrückende Wirkung zugeschrieben. Jedoch zeigt sich in Gegenwart hoher Konzentrationen an IL ein zum Teil stark destabilisierender Effekt, welcher sich negativ auf die Ausbeute auswirkt.

#### **1.1.1.1. Die Hofmeister-Reihe**

Die Hofmeister-Reihe basiert auf Untersuchungen von LEVITH an Blutserum und der weiteren Ausarbeitung durch HOFMEISTER über den Einfluss verschiedener Salze auf ihre Eigenschaften Hühnereiweiß auszufällen (Hofmeister, 1888). In systematischen Reihen wurden zum einen die untere Fällungsgrenze bei konstanter Konzentration der Proteinlösung und zum anderen die Verschiebung dieser Grenze bei Erhöhung der Proteinkonzentration getestet. Anhand dieser empirischen Messreihen konnten klare Tendenzen ausgearbeitet werden, in welchen Abhängigkeiten die Kationen beziehungsweise Anionen ein Ausfallen des Hühnereiweißes beeinflussen. Ähnliche Beziehungen von Salzen in Bezug auf die Löslichkeit von Stoffen konnte auch für unpolare Verbindungen wie Benzen gezeigt werden (McDevit & Long, 1952). Die Einführung einer Klassifizierung der Ionen in Kosmotrop und Chaotrop ermöglichte es später, diese Abhängigkeiten zu erklären. Die Begriffe Kosmotropizität und Chaotropizität spiegeln den Einfluss der Ionen auf die Wasserstruktur wider. Die Eigenschaften beruhen auf den unterschiedlichen Interaktionen der Salze mit Wasser und der resultierenden Konkurrenz zur Hydrathülle der Proteine. Die mit einer hohen Ladungsdichte, kleine oder mehrfach geladene kosmotrope („Struktur machende“) Ionen, interagieren sehr stark mit Wasser und erhöhen durch das Aufbrechen und Neubilden von Wasserstoffbrückenbindungen deren Ordnungsgrad in ihrer unmittelbaren Umgebung (Yang, 2009). Die Entropie ist durch den höheren Ordnungsgrad der Wassermoleküle verringert. Die in der Regel großen und einfach

geladenen chaotropen („Struktur brechende“) Ionen interagieren hingegen nicht so stark mit Wasser, verringern den Ordnungsgrad der Wassermoleküle und erhöhen somit die Entropie. Durch die Interaktion mit der Hydrathülle kann in diesem Zusammenhang den Ionen auch eine „einsalzende“ und destabilisierende Wirkung beziehungsweise „aussalzende“ und stabilisierende Wirkung auf Proteine zugeschrieben werden (siehe **Abbildung 1.3**). Destabilisierend auf Proteine wirken chaotrope Anionen und kosmotrope Kationen. Hingegen werden Proteine durch kosmotrope Anionen und chaotrope Kationen stabilisiert. Aufgrund der stärker polarisierenden Wirkung der Anionen auf Wasser ist deren Einfluss im Vergleich zu den Kationen jedoch stärker einzuordnen.



**Abbildung 1.3:** Salze der Hofmeister-Reihe und deren Einteilung in stabilisierende und destabilisierende Wirkung auf Proteine (modifiziert nach Yang, 2009).

Die Klassifikation der Ionen hinsichtlich ihrer Kosmotropizität beziehungsweise Chaotropizität kann durch den Viskositäts-B-Koeffizient vorgenommen werden. Anhand der Jones-Dole-Gleichung (siehe **Gleichung 1.1**) kann aus der Veränderung der Viskosität von Salzlösungen (< 0,1 M) im Vergleich zu reinem Wasser der Koeffizient B berechnet werden. Anhand dieses Wertes kann zwischen kosmotrop bei positivem und chaotrop bei negativem Vorzeichen unterschieden werden (Jones & Dole, 1929; Collins, 1997).

Gleichung 1.1:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + A\sqrt{c} + Bc$$

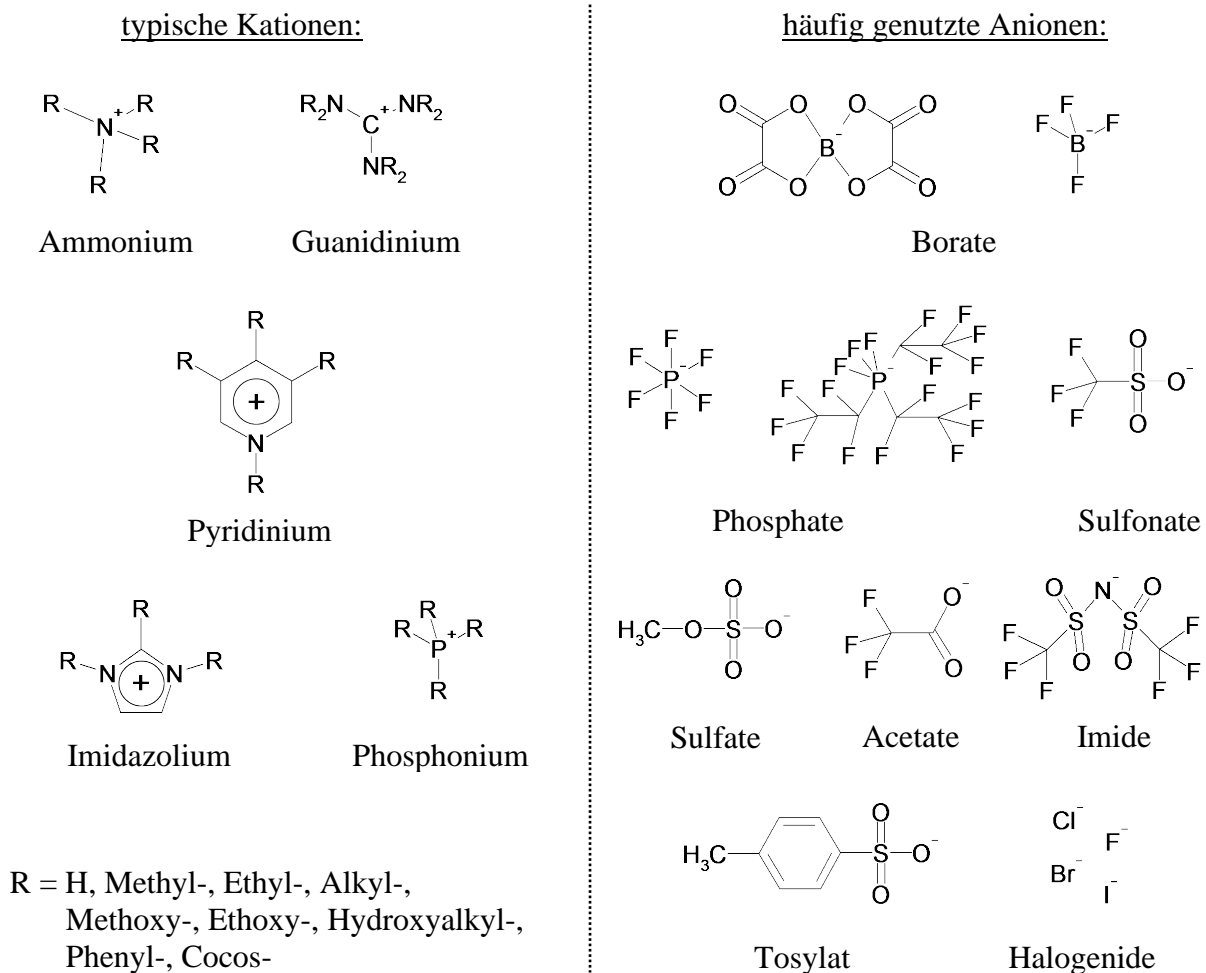
- $\eta$  Viskosität der Salzlösung bei der Konzentration  $c$   
 $\eta_0$  Viskosität von Wasser  
 $c$  Konzentration  
 $A$  elektrostatischer Term (für stark verdünnte Lösungen)  
 $B$  Parameter für die Beschreibung von Wechselwirkungen zwischen Ionen und Wasser (Viskositätskoeffizient)

## 1.2. Ionische Flüssigkeiten

### 1.2.1. Allgemeine physikalische und chemische Eigenschaften

Ionische Flüssigkeiten, auch *ionic liquids* (IL) oder *liquid organic salts*, sind organische Salze, bei denen mindestens eine Komponente des Ionenpaares, zumeist jedoch das Kation, aus einer organischen Verbindung besteht. In Gegensatz zu herkömmlichen Salzschnmelzen, deren Ionen ausschließlich anorganischen Ursprungs sind, weisen die meisten Ionischen Flüssigkeiten eine bemerkenswert niedrige Schmelztemperatur auf. Diese ist stark von den Substituenten der organischen Komponente und der Beschaffenheit des Gegenions bestimmt. Per Definition liegt die Schmelztemperatur unter 100 °C, zumeist sogar unterhalb der Raumtemperatur. Begründet werden kann dies mit einer ungünstigen Koordinierung im Kristallgitter, welche durch die voluminösen Ionen und durch delokalisierte Ladungen bedingt ist. Ionische Flüssigkeiten zeichnen sich aber auch durch andere besondere Eigenschaften aus, wie geringe Viskosität, elektrische Leitfähigkeit und schlechte Entflammbarkeit. Sie besitzen einen vernachlässigbaren Dampfdruck und eine hohe Löslichkeit von Reaktionspartnern und Lösungsmittel. Anhand dieser Vielzahl von Eigenschaften und der Tatsache, dass die physikochemischen Eigenschaften durch die Variation der Kat- und Anionen und Substitutionen einzelner Komponenten (siehe **Abbildung 1.4**), stark verändert bzw. gerichtet angepasst werden können, spricht man auch von *designer solvents*. Durch die Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten von Kat- und Anionen ergibt sich eine enorm hohe Anzahl Ionischer Flüssigkeiten. Das daraus resultierende Potenzial an verschiedenen Einsatzmöglichkeiten ist von hohem Interesse und Nutzen für Forschung und Industrie.

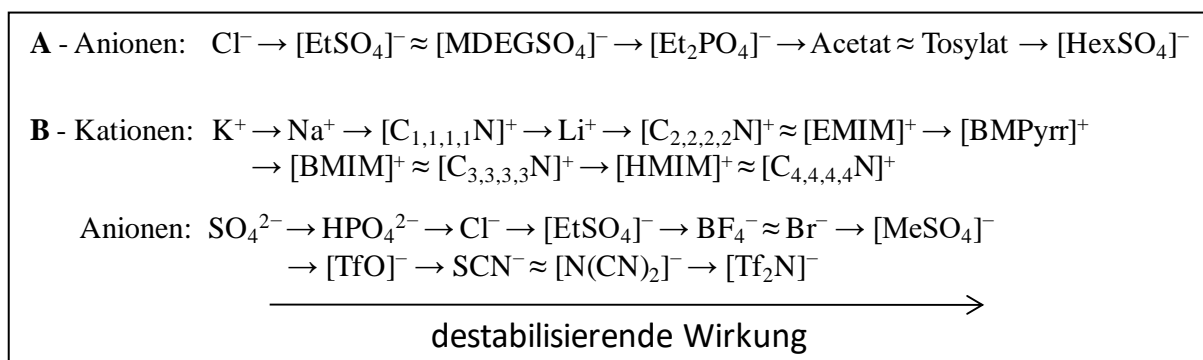
Die erste synthetisierte Ionische Flüssigkeit Ethylammoniumnitrat (EAN) geht auf PAUL WALDEN aus dem Jahre 1914 zurück (Walden, 1914). Diese und weitere derartige Verbindungen wurden in den folgenden Jahren von SUDGEN und WILKINS charakterisiert und physikalisch beschrieben (Sudgen & Wilkins, 1929). Gegen Ende des letzten Jahrhunderts wurden aromatische, auf Imidazolium und Pyridin basierende Verbindungen synthetisiert, welche mit wasserstabilen Anionen kombiniert wurden (Wilkes & Zaworotko, 1992). Im Gegensatz zu den meisten bis dahin existierende wasserinstabile Verbindungen auf Basis von Chloraluminaten konnten Ionische Flüssigkeiten somit auch in wässrigen Lösungen zum Einsatz kommen. Ihr eigentliches Potenzial wurde aber erst in den letzten Jahrzehnten erkannt und systematisch herausgearbeitet.



**Abbildung 1.4:** Übersicht über häufig vorkommende Kationen und Anionen in Ionischen Flüssigkeiten.

Auch Ionische Flüssigkeiten lassen sich anhand ihrer stabilisierenden beziehungsweise destabilisierenden Wirkung auf Proteine in die Hofmeister-Reihe einordnen. So wurden bei

Arbeiten an RNase A (Constantinescu et al., 2007; 2010) und an Lysozym, scFvOx und rPA (Buchfink et al., 2010) vor allem bei höheren Konzentrationen deutliche Effekte aufgezeigt, die eine systematische Einordnung dieser Verbindungen in die Hofmeister-Reihe ermöglichen (siehe **Abbildung 1.5**).



**Abbildung 1.5:** Einordnung einiger Ionischer Flüssigkeiten in die Hofmeister-Reihe.

Unter **A** erfolgte die Einordnung der Anionen anhand der Ergebnisse an Lysozym, scFvOx und rPA, unter Verwendung von  $[\text{EMIM}]^+$  als Kation (Buchfink et al., 2010). In **B** sind die Tendenzen der Kationen und Anionen, resultierend aus den Ergebnissen an RNase A, gelistet (Constantinescu et al., 2007).

**Anionen:**  $[\text{EtSO}_4]^-$  - Ethylsulfat;  $[\text{MDEGSO}_4]^-$  - 2(2-Methoxy)-ethylsulfat;  $[\text{Et}_2\text{PO}_4]^-$  - Diethylphosphat;  $[\text{HexSO}_4]^-$  - Hexylsulfat;  $[\text{BF}_4]^-$  - Tetrafluorborat;  $[\text{MeSO}_4]^-$  - Methylsulfat;  $[\text{TfO}]^-$  - Trifluormethansulfonat;  $\text{SCN}^-$  - Thiocyanat;  $[\text{N}(\text{CN})_2]^-$  - Dicyanimid;  $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$  - bis(Trifluormethansulfonylimid);

**Kationen:**  $[\text{C}_{1,1,1,1}\text{N}]^+$  - Tetraalkylammonium (1 - Methyl-, 2 - Ethyl-, 3 - Propyl-, 4 - Butyl-);  $[\text{BMPyrr}]^+$  - 1-Butyl-1-methylpyrrolidinium

## 1.2.2. Anwendungen in der organischen Synthese

Ionische Flüssigkeiten finden heute eine sehr variable Anwendung. Diese reicht von der Petrochemie zur Extraktion von schwefelhaltigen Verbindungen über die Solar- und Elektroindustrie hin bis zum Einsatz in der Papier-, Textil- und Waschmittelindustrie. Zu erwähnen ist die seit 2002 bei BASF erste großindustrielle Anwendung, bei der Ionische Flüssigkeiten maßgeblich involviert sind. Bei der BASIL<sup>TM</sup> - Technologie (*Biphasic Acid Scavenging utilizing Ionic Liquids*) nutzt man die Vorteile des flüssigen Aggregatzustands des als Nebenprodukt entstehenden 1-Methylimidazoliumchlorids aus, um eine kontinuierliche Prozessführung zu gewährleisten, da diese Substanz leicht abgeschieden werden kann. Des Weiteren fungiert das Edukt 1-Methylimidazol nicht nur als Säurefänger, sondern auch als Katalysator. Bei diesem Prozess werden Alkoxyphenylphosphine als Vorstufe für die Produktion von Fotoinitiatoren gewonnen, welche bei der Härtung von Lacken und Druckfarben durch UV-Licht Anwendung finden (Seddon, 2003; Freemantle 2003). Ein weiteres großes Anwendungsgebiet zeigt sich bei der homogenen Katalyse mit

Übergangsmetallen. Ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften machen Ionische Flüssigkeiten als Lösungsmittel für die organische Synthese sehr interessant. Mit einigen organischen Produktgemischen bilden Ionische Flüssigkeiten zwei Phasen, wodurch eine mehrphasige Reaktionsführung und eine einfache Abtrennung von Produkten möglich wird. Hierbei können etwa wasserlösliche Nebenprodukte oder Reaktionsprodukte einfach extrahiert werden. Da IL ausschließlich aus Ionen bestehen und keinen relevanten Dampfdruck besitzen, ist auch eine destillative Produktabtrennung realisierbar. Eine gute Übersicht zu diesen Prozessen und den Einsatz im großtechnischen Maßstab wurde von WASSERSCHIED publiziert (Wasserscheid & Keim, 2000). In einer druckkontrollierten Weiterführung dieser Mehrphasensysteme nutzt man die Vorteile von superkritischem CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>) als gutes Lösungsmittel der Reaktanden, Zwischen- und Endprodukte bei gleichzeitiger Unlöslichkeit der Ionischen Flüssigkeiten in scCO<sub>2</sub>. So können die Substanzen druckreguliert in die IL eingeleitet beziehungsweise nach Prozessende abgeleitet werden (Dzyuba & Bartsch, 2003). Flüchtige und umweltbelastende Lösungsmittel können somit eingespart werden.

Generell bietet die Anwendung von Ionischen Flüssigkeiten ein enormes Potenzial, die Mengen an Lösungsmittel und Katalysator zu reduzieren und die Umweltverträglichkeit in der chemischen Industrie zu verbessern. In diesem Zusammenhang werden diese Verbindungen auch als *green solvents* bezeichnet.

### **1.2.3. Anwendungen der Ionischer Flüssigkeiten in der Biokatalyse und Proteinchemie**

Die ersten Arbeiten mit Proteinen, in und Lösungen mit Ionischen Flüssigkeiten, wurden an Lysozym (Summers & Flowers II, 2000), Thermolysin (Erbeldinger et al., 2000), Lipasen (Kim et al., 2001; Park & Kazlauskas, 2001) und  $\alpha$ -Chymotrypsin (Laszlo und Compton, 2001; Lozano et al., 2001) durchgeführt. Zu den ersten Anwendungen gehörten enzymatische Reaktionen, bei denen das organische Lösungsmittel durch Ionische Flüssigkeiten ersetzt werden konnte. Bei den biokatalysierten Transesterifikationen wurden die IL als reines Lösungsmittel (Wassergehalt < 2 % v/v) vor allem in Kombination aus N-alkylierten Imidazolium- und Pyridinium- sowie quaternären Ammoniumverbindungen mit PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup> und [NTF<sub>2</sub>]<sup>-</sup> untersucht. In diesen frühen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich Ionische Flüssigkeiten prinzipiell als Lösungsmittel für enzymatische Reaktionen eignen und in einbeziehungsweise mehrphasigen Systemen Anwendung finden können. Weiterhin konnte eine erhöhte Stabilität und Enantioselektivität der Enzyme im Vergleich zu bis dahin üblicherweise



auf Alkanen und Alkoholen basierenden organischen Lösungsmitteln wie Hexan, Acetonitril, Aceton und Toluol aufgezeigt werden. Aus den anfänglich noch gut überschaubaren Anwendungen (Kragl et al., 2002) sind in den letzten zehn Jahren aufgrund der besseren Verfügbarkeit verschiedener Ionischer Flüssigkeiten und der enorm verbesserten Reinheit die Anwendungsbeispiele erheblich gestiegen. Bis heute sind durch die Kombination dutzender Kat- und Anionen mehrere hundert Ionische Flüssigkeiten verfügbar und viele an Enzymen ausgiebig untersucht worden. Die am häufigsten untersuchten Verbindungen sind [BMIM]<sup>+</sup> in Kombination mit PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, [TF<sub>2</sub>N]<sup>-</sup> und [TFO]<sup>-</sup> (Roosen et al., 2008). Über 75 Prozent der in der Literatur beschriebenen Anwendungen sind auf Hydrolasen und im Speziellen die Lipase B aus *Candida antarctica* (CALB) sowie die Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (PCL) zurückzuführen. Weitere Ausarbeitungen erfolgten unter anderem auch an Esterase (Persson & Bornscheuer, 2003), β-Galaktosidase (Kraftzik et al., 2002), Peroxidasen (Laszlo & Compton, 2002) und Alkoholdehydrogenase (Eckstein et al. 2004). Eine Erhöhung der Halbwertzeiten in Gegenwart von IL als Lösungsmittel vor allem nach Immobilisierung und die Möglichkeit der Wiederverwendung in Prozessen nach *recycling* verdeutlichen das Potenzial der Ionischen Flüssigkeiten für biokatalytische Prozesse (Lozano et al., 2001; Persson & Bornscheuer, 2003; Itoh et al., 2004; de los Rios et al., 2007; Fehér et al., 2008, Jiang et al., 2009; Moniruzzaman et al., 2010). Da es bei einigen Ionischen Flüssigkeiten in Mischung mit wässrigen Puffern durch Zugabe von anorganischen Salzen (u.a. Kalium- und Natriumphosphat, Ammoniumsulfat) zur Phasentrennung kommt, können auch Substrate und Substanzen in den jeweiligen Phasen angereichert werden. So wurden zum Beispiel doppelsträngige DNA (Wang et al., 2007), Biomoleküle wie Zucker, Aminosäuren, Farb- und Geschmacksstoffe (Louros et al., 2010; Pei et al., 2010) und auch biologisch aktive Proteine aus wässrigen Zwei-Phasen-Systemen extrahiert (Dreyer & Kragl, 2008). Darüber hinaus können IL, durch ihre Kombination von polaren und unpolaren Gruppen, auch als Lösungsvermittler für Substrate mit geringer Löslichkeit in wässrigen oder herkömmlichen organischen Lösungsmitteln dienen. Hier ist zum Beispiel die Anwendung Ionischer Flüssigkeiten bei der Biospritproduktion zu erwähnen (Bose et al., 2010). Limitierend bei dem Prozess ist die sehr stark eingeschränkte Löslichkeit von Zellulose, welche durch Ionische Flüssigkeiten (bei gleichzeitiger Beibehaltung der Cellulaseaktivität) erhöht wird. Initial kann so die Hydrolyse der Zellulose zu Glukoseeinheiten erfolgen, um dann in weiteren Schritten das Ethanol zu gewinnen. Auch der Einsatz von Proteasen in Ionischen Flüssigkeiten wird erfolgreich untersucht. So wurde 2008 erstmals eine Protease-katalysierte Ligation von Peptiden und Proteinfragmenten gezeigt (Wehofsky et al., 2008). Die exzellente Löslichkeit und Stabilität von Reaktanden bei

gleichzeitiger Erhaltung der Aktivität und Selektivität der Proteasen in den IL-haltigen Puffersystemen (bis 70:30 IL:Puffer v/v) ist hier der große Vorteil. Weiterhin konnte bei derartiger Nutzung von Proteasen die unerwünschte proteolytische Aktivität, hier als bestehende Nebenreaktion und Haupthindernis bei der Ligation, komplett unterdrückt werden. Darüber hinaus wurde anhand von NMR-, CD- und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen gezeigt, dass die Art und Konzentration der IL einen Einfluss auf die Struktur der Proteine ausübt (Wehofsky et al., 2008; Falcioni et al., 2010). An Peptiden wurde nachgewiesen, dass sich das *cis/trans*-Gleichgewicht der Peptidyl-prolyl-Bindung verschiebt und die *trans*-Konformation stabilisiert wird. Der generelle Einfluss der IL als reines Lösungsmittel beziehungsweise als Cosolvens auf Proteine wurde aber schon viel früher und an anderen Proteinen gezeigt. So konnte verdeutlicht werden, dass mit zunehmender Alkylkettenlänge des Kations die Halbwertszeit von Lipasen (de los Rios et al., 2007) in IL erhöht werden kann und auch die anionische Komponente einen ebenso starken Einfluss ausübt. An  $\alpha$ -Chymotrypsin (Lozano et al., 2001) wurde der stabilisierende Effekt, der auf Imidazolium basierenden IL, mit der Abnahme der Polarität (bedingt durch die Zunahme der Alkylkettellänge und der Größe des Anions) in Verbindung gebracht. Für BMIM PF<sub>6</sub> (2 % v/v H<sub>2</sub>O; 50 °C) konnte letztlich eine um 200-fach erhöhte Stabilität gegenüber 1-Propanol aufgezeigt werden. Jedoch zeigte sich bei den gleichen Verbindungen ein zunehmender Aktivitätsverlust mit der Verringerung der Polarität, respektive Zunahme der Alkylkettenlänge. Dies wurde mit der hohen Viskosität dieser IL (im Vergleich zu 1-Propanol) begründet und der daraus resultierende eingeschränkte Massentransfer als möglicher limitierender Faktor beschrieben.

Bei der Anwendung Ionischer Flüssigkeiten als Cosolvens in wässrigen Pufferlösungen wurde bereits 1984 an Alkalischer Phosphatase (Magnuson et al., 1984) in Gegenwart von Ethylammoniumnitrat (EAN) eine positive Stimulation nachgewiesen. In einem auf Absorption basierenden Assay mit p-Nitrophenylphosphat erhöhte sich die Hydrolyseaktivität um 60 % bei einer Konzentration von 1,1 M EAN (10 % v/v). Mit steigender EAN-Konzentration kam es, in Abhängigkeit von der Temperatur, sukzessiv zur Abnahme der Aktivität und ab 80 % (v/v, 30 °C) zur Inaktivierung. Pionierarbeit bei der Proteinfaltung in Gegenwart von Ionischen Flüssigkeiten leisteten Summers & Flowers II, 2000. So konnte nach chemischer Denaturierung von HEWL (*hen egg white lysozym*) und anschließender Überführung in einen Rückfaltungspuffer mit 0,54 M EAN (5 % v/v) bis zu 75 % Aktivität gezeigt werden. Wenn EAN selbst als chemisches Denaturans diente, wurde unter gleichen Bedingungen im Rückfaltungspuffer sogar 95 % Aktivität nachgewiesen. Bei der Rückfaltung ergab sich mit zunehmender Konzentration an IL auch eine Unterdrückung der Aggregation. Dieses Verhalten

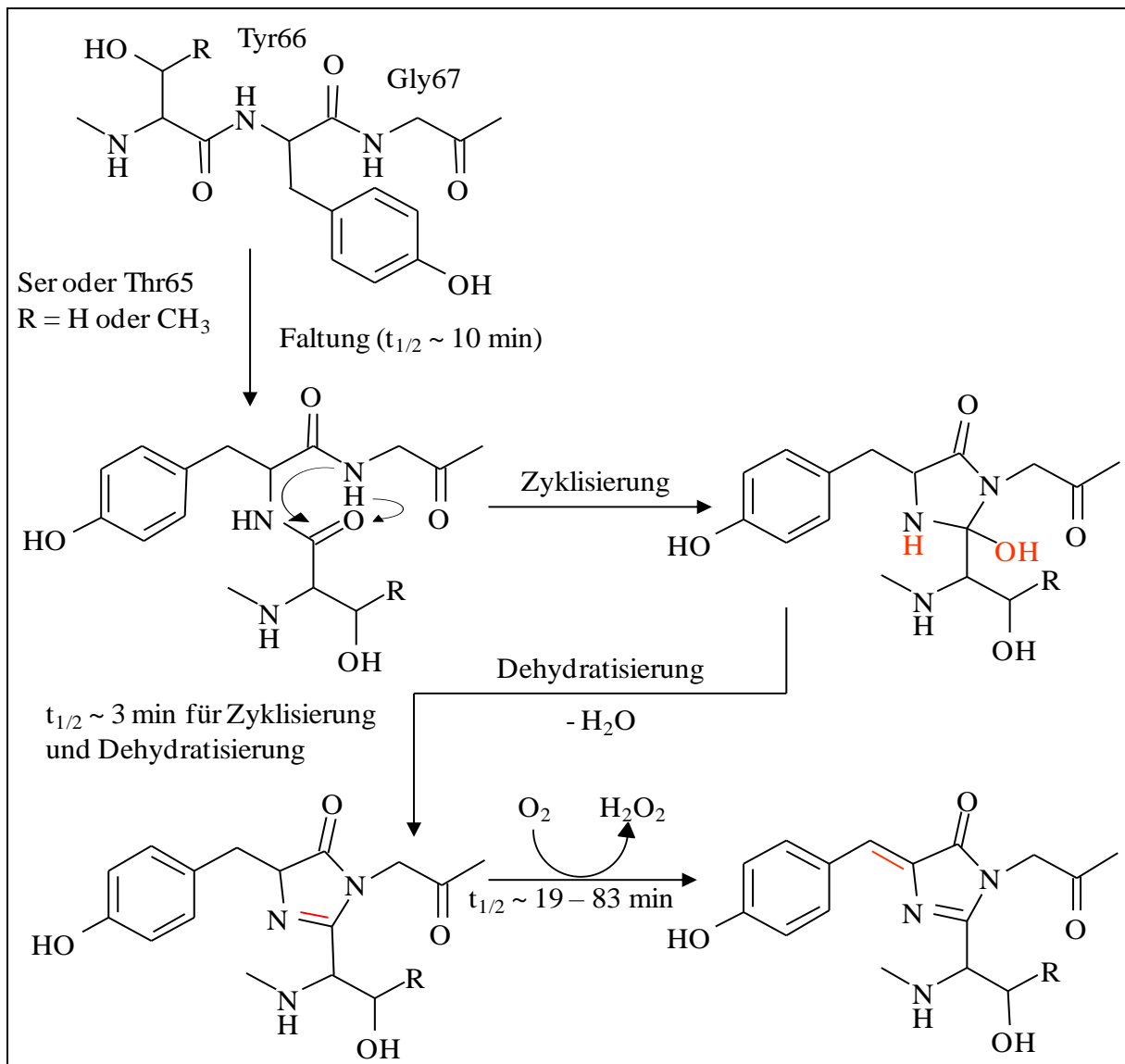
wurde auch in weiteren Arbeiten am Antikörperfragment ScFvOx (*single-chain antibody fragment* gegen das Hapten Oxazalon), Lysozym und dem rPA (*recombinant plasminogen activator*) belegt (Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010). Vorrangig wurden hier N-alkylierte- und endständig hydroxylierte N-methylimidazolium-Verbindungen benutzt, um systematisch deren Einfluss auf die Stabilität und Rückfaltungsausbeuten zu untersuchen. So wurde deutlich, dass Ionische Flüssigkeiten als Rückfaltungszusätze in der Lage sind, die Ausbeute der Rückfaltung zu erhöhen. Systematisch wurde die Konzentration der IL und die Länge der Alkylketten variiert und ebenso der Einfluss der Anionen aufgezeigt. Eine zunehmende Destabilisierung der Proteine mit Verlängerung der Alkylketten wurde beobachtet, einhergehend mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Einfluss auf die Stabilität durch Variation der Anionen bei konstantem Kation. Diese Ergebnisse decken sich im Wesentlichen mit den Arbeiten von Constantinescu et al., 2010 an RNase A (Ribonuklease A), wobei auch hier eine Einordnung der Kat- und Anionen nach chaotropen und kosmotropen Eigenschaften und eine Eingliederung in die Hofmeister-Reihe vorgenommen wurden. An einem weiteren Modellprotein, dem GFP (*green fluorescent protein*), wurde der Einfluss auf den Oligomerisierungsstatus in Gegenwart von BMIM Cl (N-Butyl-N-methylimidazoliumchlorid) demonstriert. Die Variante GFP $mut3$  liegt in nativer Form als Dimer vor und dissoziiert in Anwesenheit von 25 % (v/v) BMIM Cl zum Monomer, bei 50 % (v/v) kommt es zur Denaturierung. Das BMIM Cl wird hier als stärker destabilisierend eingestuft als die Denaturanzien Harnstoff und GuHCl (Heller et al., 2010).

Die breite Spanne unterschiedlicher Eigenschaften Ionischer Flüssigkeiten bei der Wechselwirkung mit Proteinen, welche von stabilisierend zu destabilisierend und von Löslichkeits-vermittelnd zu Aggregations- beziehungsweise Präzipitations-fördernd reichen, machen sie zudem auch interessant für die Proteinkristallisation. Bereits 1999 wurden hier Arbeiten an Lysozym durchgeführt (Garlitz et al., 1999). Später erwies sich auch an weiteren Proteinen, dass Ionische Flüssigkeiten für die Generierung von Proteinkristallen geeignet sind. Die durch den Einsatz der IL als Präzipitant generierten Kristalle zeigten unter anderem eine veränderte Morphologie, Kristallgröße und eine verbesserte Auflösung (Pusey et al., 2007; Judge et al., 2009; Wang et al., 2010). Anbieter wie Io-Li-Tec GmbH vermarkten Ionische Flüssigkeiten auch in *screening-Kits* für die Kristallisation.

## 1.3. Das grün fluoreszierende Protein als Modellprotein

### 1.3.1. Historie - Von der Entdeckung bis zur Kristallstruktur

Das ungewöhnlich grell leuchtende Erscheinungsbild und die damit einhergehenden weit gefächerten und bedeutsamen Anwendungsmöglichkeiten in der Molekularbiologie machen das grün fluoreszierende Protein (GFP) einzigartig. Mit der Vergabe des Nobelpreises für Chemie 2008 für die „Entdeckung und Weiterentwicklung des grün fluoreszierenden Proteins“ an OSAMU SHIMOMURA, MARTIN CHALFIE und ROGER TSIEN wurde die besondere Bedeutung des GFP für die Forschung unterstrichen. Entdeckt und als Protein identifiziert wurde das GFP aus *Aequorea victoria*, einer Quallenart im Nordwestpazifik, von OSAMU SHIMOMURA (Shimomura et al., 1962). Aus Quetschextrakten der Tiere konnten zwei Proteine isoliert werden, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, auf Chemilumineszenz basierende Oxoluciferase Aequorin und ein grün leuchtendes Protein. Die erste namentliche Erwähnung als *green fluorescent protein* wurde von HASTINGS und MORIN vorgenommen (Hastings & Morin, 1969), welche auch das Zusammenspiel dieser beiden Proteine erstmals *in vivo* aufklärten (Morin & Hastings, 1971). In späteren Arbeiten wurde publiziert, dass in Gegenwart beider Proteine die Intensität der Lumineszenz des Aequorins ( $\lambda_{\text{max}}$  472 nm) durch Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  abnahm beziehungsweise niedriger war als in Abwesenheit des GFP. Da zeitgleich eine Fluoreszenz, deckungsgleich mit dem Fluoreszenzmaximum des GFP ( $\lambda_{\text{max}}$  509 nm), auftrat, konnte gezeigt werden, dass ein Energietransfer zwischen den beiden Lichtemittern Aequorin und GFP stattfindet (Morise et al., 1974). SHIMOMURA isolierte durch proteolytischen Abbau mittels Papain den Chromophor und postulierte 4-(p-Hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on als chromophore Struktur (Shimomura, 1979). Der Mechanismus der Chromophorbildung (siehe **Abbildung 1.6**) wurde aufgeklärt (Heim et al., 1994; Cubitt et al., 1995) und einer autokatalytischen Zyklisierung der Aminosäuren Serin 65, Tyrosin 66 und Glycin 67 zugeordnet (Heim et al., 1994). Nach der Faltung des Proteins und der räumlichen Annäherung des Aminosäurerückgrats kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Amidstickstoffs des Glycins 67 auf den Carbonylkohlenstoff von Serin 65 und unter Wasserabspaltung zur Ringbildung. Erst nach dem anschließend folgenden geschwindigkeitsbestimmenden Oxidationsschritt entsteht ein ausgedehntes  $\pi$ -Elektronensystem und der Chromophor wird fluoreszent.



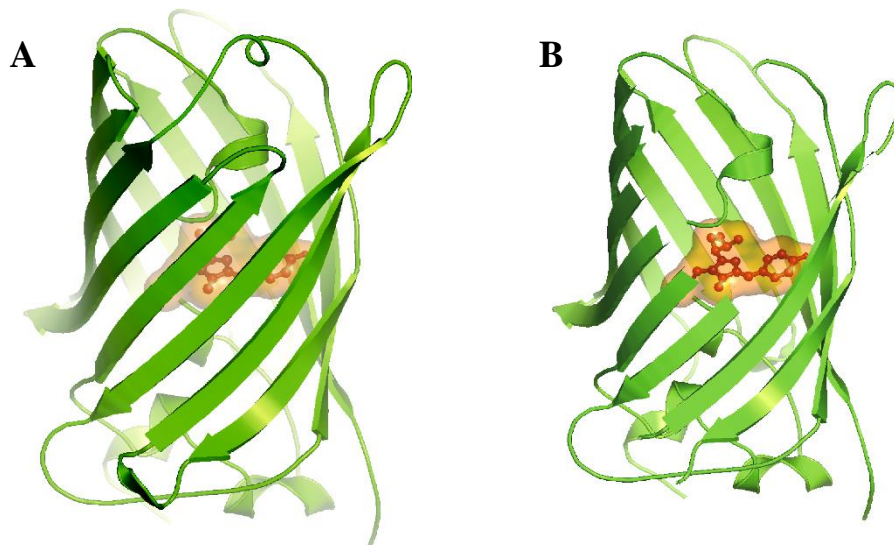
**Abbildung 1.6:** Vorgeschlagener Mechanismus der Chromophorbildung.

Darstellung für die intramolekulare Biosynthese des GFP-Chromophors von CUBITT (Cubitt et al., 1995), mit geschätzten Geschwindigkeitskonstanten für die Ser65Thr Mutation von REID (Reid & Flynn, 1997) und HEIM (Heim et al., 1995).

Bereits 1974 wurde GFP zum ersten Mal kristallisiert (Morise et al., 1974). Die Röntgenkristallstruktur konnte jedoch erst 1996, nahezu zeitgleich von zwei unabhängigen Gruppen gelöst werden (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996). Den Grundstein für molekularbiologische Anwendungen legte PRASHER mit der Entschlüsselung der Primärstruktur (Prasher et al., 1992) und der Idee, GFP fusionierte Proteine in Zellen zu visualisieren und so zu lokalisieren. Mit der erstmaligen Expression des Gens von GFP in *E. coli* beziehungsweise im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Chalfie et al., 1994) wurde auch deutlich, dass die Fluoreszenz intrinsisch ist und keine externen Kofaktoren notwendig sind um die fluoreszierenden Eigenschaften auszuprägen.

### 1.3.2. Struktur, Eigenschaften und Varianten des GFP

Die Aufklärung der Kristallstruktur des GFP offenbarte den  $\beta$ -can fold als neues und sehr kompaktes Faltungsmotiv (Yang et al., 1996). Diese Kannenstruktur beschreibt eine zylindrische Anordnung aus 11  $\beta$ -Faltblättern, welche sich antiparallel zueinander ausrichten und zu einem Grundgerüst organisieren. Der Zylinder aus 238 Aminosäuren besitzt eine Größe von 4 nm in der Länge und etwa 3 nm im Durchmesser. Diagonal durch das Grundgerüst verläuft eine  $\alpha$ -Helix und im geometrischen Mittelpunkt befindet sich der Chromophor (siehe **Abbildung 1.7**). Die Enden des Zylinders werden von kleinen  $\alpha$ -Helices bedeckt, wodurch der Chromophor abgeschirmt und vor externen Fluoreszenzlöschern, wie etwa molekularem Sauerstoff, geschützt wird. Eine große Zahl an Wassermolekülen und geladenen Aminosäureresten, wie Q69, R96, H148, T203, S205 und E222, sind an der Stabilisierung der chromophoren Struktur, insbesondere des ausgedehnten  $\pi$ -Elektronensystems, über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt.



**Abbildung 1.7:** Strukturdarstellung des EGFP.

Darstellung der Struktur mit dem zylindrischen  $\beta$ -can fold aus elf  $\beta$ -Faltblättern (A) und mit freier Sicht auf den zentral liegenden Chromophor (B).

Durch den Austausch von Aminosäuren, welcher innerhalb beziehungsweise in räumlicher Nähe des Chromophors durchgeführt wurde, ergaben sich eine Vielzahl verschiedener Varianten des Proteins mit veränderter Stabilität und spektralen Eigenschaften. Ein Vorreiter in der Generierung von Varianten ist ROGER TSIEN, der GFP in sieben Hauptklassen einordnete (siehe **Tabelle 1.1**).

**Tabelle 1.1:** Überblick über spektrale Eigenschaften der sieben Hauptklassen der fluoreszierenden Proteine. Klassifizierung der durch Mutationen erzeugten Varianten (Auswahl) in sieben Hautgruppen mit den Anregungs-, Emissionsmaxima und Extinktionskoeffizient (modifiziert nach Tsien, 1998).

<sup>(1)</sup> Phenolatanion im Chromophor mit Interaktion eines zweiten Ringsystems (stacking), <sup>(2)</sup> Indolstruktur im Chromophor, <sup>(3)</sup> Imidazolstruktur im Chromophor, <sup>(4)</sup> Phenylstruktur im Chromophor

Hauptklasse	Mutation	Name	Anregungs- maximum (nm)	Extinktions- koeffizient (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Emissions- maximum (nm)
<b>Klasse 1:</b> Wildtyp	Keine oder Q80R	Wildtyp	395 - 397	25000 - 30000	504
			470 - 475	9500 - 14000	
	F99S, M153T, V163A	Cycle3	397 475	30000 6500 - 8500	506
<b>Klasse 2:</b> Phenolat- anion	S65T		489	52000 - 58000	509 - 511
	F64L, S65T	EGFP	488	55000 - 57000	507 - 509
	S65T, S72A, N149K, M153T, I167T	Emerald	487	57500	509
<b>Klasse 3:</b> neutrales Phenol	S202F, T203I	H9	399	20000	511
	T203I, S72A, Y145F	H9 – 40	399	29000	511
<b>Klasse 4:</b> gelb fluoreszie- rende Proteine <sup>(1)</sup>	S65G, S72A, T203F		512	65500	522
	S65G, S72A, T203H		508	48500	518
	S65G, V68L, S72A, T203Y	10C	514	83400	527
	S65G, S72A, K79R, T203Y	Topas	514	94500	527
<b>Klasse 5:</b> cyan fluoreszie- rende Proteine <sup>(2)</sup>	Y66W		436		485
	F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A	W1B / ECFP	434 452	32500	476 505
	S65A, Y66W, S72A, N146I, M153T, V163A	W1C	435	21200	495
<b>Klasse 6:</b> blau fluoreszie- rende Proteine <sup>(3)</sup>	Y66H	BFP	384	21000	448
	Y66H, Y145F	P4 – 3	382	22300	466
	F64L, Y66H, Y145F	EBFP	380 - 383	26300 - 31000	440 - 447
<b>Klasse 7<sup>(4)</sup>:</b>	Y66F		360		442

Hierbei ist der Wildtyp, der zwei chromophore Spezies besitzt (eine protonierte [HO-] und deprotonierte [O-] phenolische Form des Tyr66), in der ersten Gruppe eingeordnet. Für das wtGFP existieren deshalb zwei Anregungsmaxima bei 395 nm [HO-] und 470 nm [O-], wobei nur die deprotonierte Form, die auch der des angeregten Zustandes entspricht, fluoresziert. Die

Gruppen 2 und 3 entsprechen jeweils den Varianten, deren Mutationen entweder die neutrale oder die anionische Form des Chromophors beinhalten. In Gruppe 4 ergibt sich eine noch stärkere Rotverschiebung hin zur gelben Fluoreszenz (YFP – *yellow fluorescent protein*), welche durch das Einfügen eines Aromaten in direkter räumlicher Nähe zum Chromophor anstelle des Thr203 realisiert wird. Durch die Interaktion der  $\pi$ -Elektronen beider aromatischer Systeme (*stacking*) kommt es zu einer erweiterten Ausdehnung des  $\pi$ -Elektronensystems, was letztlich zu einer bathochromen Verschiebung von Anregungs- und Emissionswellenlänge führt. Im Vergleich zu den folgenden drei Gruppen ist die Vergrößerung des  $\pi$ -Elektronensystems nicht kovalent. In den Gruppen 5-7 kommt es durch den Austausch des Tyr innerhalb des Chromophors an Position 66 gegen andere Ringsysteme wie Trp, His oder Phe zur Verschiebung zur kurzwelligeren cyan beziehungsweise blauen Fluoreszenz. Das in dieser Arbeit genutzte EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) gehört in die Gruppe 2. Basierend auf der GFPmut1-Variante, eine für den Einsatz in eukaryontischen Zellen optimierte Form von GFP, besitzt EGFP eine um den Faktor 35 verstärkte Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Wildtyp (Cormack et al., 1996) und eine spektrale Rotverschiebung. Die genaue Primärsequenz der in dieser Arbeit eingesetzten EGFP-Variante ist im Anhang (siehe 7.5.) dargestellt. Die Verbreitung fluoreszierender Proteine ist letztlich nicht auf Quallen der Art *Aequorea victoria* beschränkt. Ähnliche Proteine mit hoher Homologie zu GFP existieren auch in anderen Quallen, Polypen, Seeanemonen und Korallen. Dadurch kann heute mit optimierten Varianten das komplette Farbspektrum abgedeckt werden. So existieren jetzt auch saphirfarbene (Zapata-Hommer & Griesbeck, 2003) und durch den Einbau von Methyl-Trp und Amino-Trp als nicht kanonische Aminosäuren einige goldfarbene Varianten (Bae et al., 2003). Durch die Bestrahlung mit UV-Licht kann aus farblosem aceGFP (*Aequorea coerulea* Glu222-GFP) eine grüne Fluoreszenz generiert (Gurskaya et al., 2003) und ein Farbwechsel von PS-CFP (*photoswitchable-cyan fluorescent protein*) zu GFP (Chudakov et al., 2004) beziehungsweise ein grün-rot-Wechsel beim Keade-Protein vorgenommen werden (Ando et al., 2002). Das DsRed aus *Discosoma* ist ein RFP (*red fluorescent protein*) und weist, nach entsprechender Optimierung, ein sehr weit in den roten Spektralbereich verschobenes Emissionsspektrum mit einem Maximum bei 602 nm auf (Baird et al., 2000). Es findet häufig Anwendung als Akzeptor für FRET-Experimente (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer).

Die fluoreszierenden Proteine können in verschiedenen Quartärstrukturen als Monomer, Dimer und Tetramer vorkommen. Das wtGFP wird in hohen Konzentrationen (wie etwa erforderlich bei der Proteinkristallisation) als Homodimer mit einer schwachen Affinität ( $K_D=100 \mu\text{M}$ )



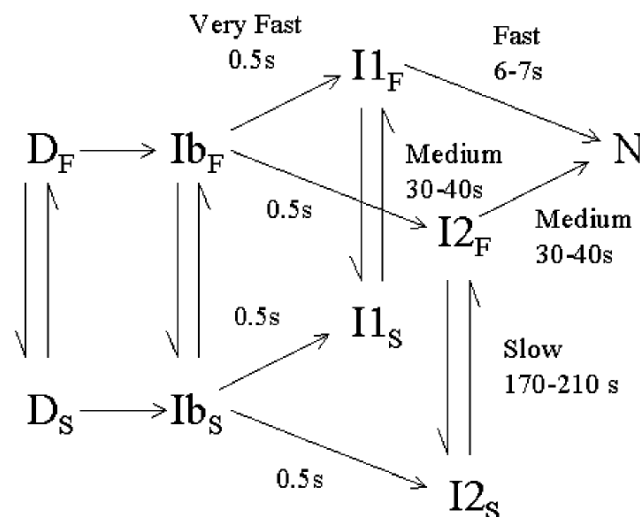
beschrieben (Phillips, 1997). Varianten wie das DsRed sind obligat Tetramer (Baird et al., 2000), das EGFP existiert hingegen ausschließlich als Monomer (Stepanenko et al., 2004).

### 1.3.3. Faltung und Aggregation von GFP (EGFP)

Das *wt*GFP und viele GFP-Varianten sind thermodynamisch sehr stabil und zeigen eine sehr hohe Resistenz gegenüber starken Chaotropen wie Guanidinhydrochlorid (Ward & Bokman, 1982; Fukuda et al., 2000) und Harnstoff (Battistutta et al., 2000). Dies liegt an der sehr kompakten Faltungsstruktur, dem  $\beta$ -*can fold* (siehe **Abbildung 1.7**). In den ersten Studien zur Faltung an GFP (Bokman & Ward, 1981; Ward & Bokman, 1982) konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart hoher GuHCl-Konzentrationen, extremer pH-Werte (pH 2,0 bzw. pH 13,0) und hoher Temperaturen ( $T_m = 78$  °C) das *wt*GFP denaturiert und es zum Verlust der GFP-spezifischen Fluoreszenzeigenschaften kommt, wobei hier die kovalente Struktur des Chromophors erhalten bleibt und es nach Entfaltung des Proteins und freier Exposition zum *quenching* durch das Lösungsmittel kommt (Voityuk et al., 1998). Eine Rückfaltung aus dem GuHCl-induziert denaturierten Zustand führte hier, bezogen auf die spezifische GFP-Fluoreszenz, zu einer maximalen Ausbeute von 55 %, nach Neutralisation aus dem Sauren (pH 2,0) von 90 % und aus dem Basischen (pH 13,0) von 49 %. Eine vollständige Reversibilität für das *wt*GFP konnte also nicht nachgewiesen werden, was gegen ein einfaches Zwei-Zustandsmodell spricht und eine komplexe Faltungskinetik nahelegt.

Ausführlichere kinetische Untersuchungen an GFP in Abhängigkeit des pH-Wertes und von Denaturanzien verdeutlichen die Komplexität der Faltung. So zeigte FUKUDA bei kinetischen Untersuchungen an GFP (Cycle3) durch Denaturierung in Gegenwart hoher GuHCl-Konzentrationen einen einfach exponentiellen Kurvenverlauf für die Entfaltung (Fukuda et al., 2000). Nach drei Stunden Inkubationszeit (6,0 M GuHCl) konnte keine spezifische GFP-Fluoreszenz ermittelt und mittels CD-Spektroskopie im Fern-UV-Bereich auf eine vollständige Entfaltung geschlossen werden. Für die Rückfaltung nach Abreicherung des Denaturierungsmittels wurde ein zweiphasiger Kurvenverlauf beschrieben: eine schnelle Phase ( $k_1$ ) mit großer Amplitude und eine langsame Phase ( $k_2$ ) mit kleinerer Amplitude. Mit zunehmender GuHCl-Konzentration im Rückfaltungsansatz verlangsamte sich die Geschwindigkeit der Rückfaltung und die langsame Phase erlangte zunehmend an Dominanz, was sich letztlich in einem einphasigen Kurvenverlauf widerspiegelte. Für die GFP-Varianten Cycle3 und S65T konnten ähnliche Faltungskinetiken nach Inkubation in 8 M Harnstoff (95 °C, 5 min) beschrieben werden (Battistutta et al., 2000). Die langsame der beiden Phasen der

Rückfaltungskinetik wurde einer Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung zugeschrieben und somit zwei entfaltete Zustände  $U_2$  und  $U_1$  angenommen. Es gibt zwei vereinfachte Modelle, ein paralleles Modell bei dem  $U_2$  und  $U_1$  sich unabhängig voneinander mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  und  $k_1$  zum nativen Zustand (N) falten und ein konsekutives Modell. Hier konvertiert  $U_2$  langsam zu  $U_1$  mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  und faltet dann in einer schnellen Reaktion mit  $k_1$  zum vollständig gefalteten Protein. Deutlich ausführlicher und detaillierter ist die Faltung an der Cycle3-Mutante von [Enoki et al., 2004](#) beschrieben. Er erweiterte die spektroskopischen Methoden der Chromophor- und Trp-Fluoreszenz und Fern-UV-CD-Messungen mit *stopped-flow*-Methoden und erhielt somit Einblicke in den Faltungmechanismus zu sehr frühen Zeitpunkten. Er postuliert zwei Intermediate, ein *burst phase intermediate* und ein *on-pathway intermediate* und erweitert die bestehenden Modellvorstellungen zur GFP-Faltung auf bis zu 5 kinetische Phasen (siehe **Abbildung 1.8**).



**Abbildung 1.8:** Vereinfachte schematische Darstellung der GFP-Faltung (Cycle3) nach [Enoki et al., 2004](#).

Die Darstellung zeigt den postulierten Faltungsweg vom denaturierten Zustand (pH 2,0) über zwei Intermediate zum nativen GFP (pH 7,5) mit fünf kinetischen Phasen. Es liegen zwei denaturierte Zustandsformen, eine schnell faltende Spezies ( $D_F$ ) mit korrekter und eine langsam faltende Spezies ( $D_S$ ) mit inkorrekt er Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung im Vergleich zum nativen Protein, vor.  $I_{bF}$  und  $I_{bS}$  sind *burst-phase* Intermediate, welche sich im Bereich von  $< 5$  ms formieren, die in einem *on-pathway* zu *molten globule* Intermediaten ( $I_{1F}$ ,  $I_{2F}$ ,  $I_{1S}$ ,  $I_{2S}$ ) falten (sehr schnelle Phase). Die Intermediate mit korrekter Prolyl-*cis/trans*-Konformation ( $I_{1F}$ ,  $I_{2F}$ ) gehen in den nativen Zustand (N) über (schnelle und mittlere Phase). Hingegen müssen  $I_{1S}$  und  $I_{2S}$  in die korrekte Prolyl-*cis/trans*-Konformation isomerisieren (langsame und mittlere Phase).

Das *burst phase intermediate* bildet sich innerhalb der Totzeit der *stopped-flow*-Messungen ( $< 5$  ms) und zeichnet sich durch eine deutliche Amplitudenänderung bei der Trp-Fluoreszenz (350 nm) und bei CD-Messungen (225 nm) im Vergleich zum denaturierten Zustand aus. Dieses Intermediat geht aus einem nichtspezifischen Kollaps hervor und zeigt

Sekundärstrukturelemente. Das *on-pathway intermediate* konnte ebenso mit *stopped-flow*-Messungen durch eine *lag*-Phase innerhalb der ersten Sekunden während der Rückfaltung bestimmt werden. Dieses Intermediat zeigt deutlich mehr Sekundärstrukturen, jedoch keine kompakte Struktur in der direkten Umgebung des Chromophors und wurde somit einem *molten globule state* zugeordnet. Die Bildung dieses Intermediats wird im Modell der sehr schnellen Phase zugeordnet. Die schnelle Phase ist mit der schnellen Phase bei [Fukuda et al., 2000](#) und [Battistutta et al., 2000](#) vergleichbar und beschreibt die Faltung vom *on-pathway intermediate* zum richtig gefalteten nativen Zustand. Die in diesen beiden Arbeiten beschriebene langsame Phase liegt zwischen der von ENOKI ermittelten mittleren und langsamen Phase. Aus dieser Tatsache ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der Mechanismus der Rückfaltung unabhängig von der Denaturierungsmethode ist. Es ist also unwesentlich, ob der entfaltete Zustand mit Denaturanzien wie GuHCl beziehungsweise Harnstoff oder durch saure pH-Werte hervorgerufen wird. Beide Phasen, die mittlere und langsame Phase, werden durch die Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung beeinflusst. Dies verdeutlichteten zum einen Doppelsprungexperimente, bei denen die Inkubationszeit unter denaturierenden Bedingungen variiert und die Amplituden der jeweiligen Phasen während der Rückfaltung verfolgt wurden. Nach unmittelbarer Rückfaltung aus dem denaturierten Zustand zum Zeitpunkt 0 konnte keine langsame Phase detektiert werden. Mit zunehmender Inkubationszeit zeigte sich jedoch eine Zunahme der Amplitude der langsamen und mittleren Phase, was darauf schließen lässt, dass beide Phasen von der *cis/trans*-Isomerisierung im denaturierten Zustand beeinflusst werden. Zum anderen wurde durch den Einsatz von CyPA (Cyclophilin A), einer Enzymisomerase mit Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Aktivität, gezeigt werden, dass bei der Rückfaltung in Gegenwart von CyPA keine langsame Phase detektiert und die Amplitude der mittleren Phase kleiner wurde. Aufgrund der *cis/trans*-Isomerisierung wird in dem Modell auch von zwei entfalteten Spezies ausgegangen: einer schnell faltenden Spezies ( $D_F$ ) mit korrekter und einer langsam faltenden Spezies ( $D_S$ ) mit inkorrekt konformer Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Konformation. Bei der Rückfaltung, ausgehend von den zwei denaturierten Zustandsformen  $D_F$  und  $D_S$ , bilden sich  $I_{bF}$  und  $I_{bS}$  als *burst-phase*-Intermediate in einer Zeitskala  $< 5$ ms. Diese formieren sich in der sehr schnellen Phase in einem *on-pathway* zu *molten globule* Intermediaten ( $I_{1F}$ ,  $I_{2F}$ ,  $I_{1S}$ ,  $I_{2S}$ ). Die Intermediate mit korrekter Prolyl-*cis/trans*-Konfiguration ( $I_{1F}$ ,  $I_{2F}$ ) gehen in den nativen Zustand (N) über (schnelle und mittlere Phase). Hingegen müssen  $I_{1S}$  und  $I_{2S}$  in die korrekte Prolyl-*cis/trans*-Konformation isomerisieren (langsame und mittlere Phase). In diesem Modell nicht berücksichtigt sind *off-pathway* Intermediate und die Tatsache, dass Cycle3 und andere GFP-Varianten und auch das wtGFP zur Bildung irreversibler Aggregate neigen. Das wurde

für die Rückfaltung mit zunehmender Inkubationsdauer aus dem Denaturans- als auch Säure-induziert denaturierten Zustand beschrieben (Fukuda et al., 2000, Battistutta et al., 2000, Enoki et al., 2004). In vergleichenden Untersuchungen zweier GFP-Varianten (*wt*GFP und Cycle3) wurde eine deutliche Tendenz zur Aggregation für *wt*GFP gezeigt (Fukuda et al., 2000). Die Cycle3-Variante, welche durch den Austausch von 3 Aminosäuren (F99S, M153T, V163A) weniger hydrophob ist, aggregierte jedoch ebenso, wenn auch deutlich schwächer. Bei diesen Lichtstreuexperimenten zeigte sich auch ein sigmoider Kurvenverlauf in der Aggregationskinetik während der Rückfaltung, was auf eine Nukleations-Polymerisationsreaktion bei der Aggregatbildung hindeutet. In eigenen Arbeiten (Pultke, 2003) konnte für das EGFP ebenfalls eine starke Aggregation in Abhängigkeit von der EGFP-Konzentration und Temperatur festgestellt werden, jedoch keine *lag*-Phase. Erklärungen für die Irreversibilität der Faltung von GFP und die starke Aggregationstendenz könnten zum einen die zwei Cysteine (Cys48 und Cys70) sein, welche unter nativen Bedingungen nicht Disulfidverbrückt sind. Bei der Überführung aus dem denaturierten in den gefalteten Zustand können diese jedoch intra- und intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden und sich somit Aggregate formieren (Fukuda et al., 2000). Zum anderen könnte auch die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung ursächlich sein. GFP besitzt zehn Proline, wobei neun in *trans*-Konformation und Pro89 unter nativen Bedingungen als einziges in *cis*-Konformation vorliegt. Zudem kommt Pro89 eine gesonderte Rolle zu, da (in der *loop*-Region zwischen der  $\alpha$ -Helix 4 und Beginn des 4.  $\beta$ -Strangs lokalisiert) durch diese *cis/trans*-Isomerisierung der *loop*, der für den Verschluss der zylindrischen  $\beta$ -Kannenstruktur und somit für eine Abschirmung des Chromophors sorgt, strukturell beeinflusst wird. Eine inkorrekte *cis/trans*-Isomerisierung könnte somit zu Aggregaten führen.

## 1.4. Zielstellung der Arbeit

Der positive Effekt einiger Lösungsmitteladditive wie L-Arginin oder bestimmter anorganischer Salze auf die Faltungsausbeute ist seit Jahrzehnten bekannt. Dieser Effekt kann auf eine Beschleunigung der Faltungskinetik, die Unterdrückung der Aggregation, die Stabilisierung des nativen Faltungszustands oder die löslichkeitvermittelnde Wirkung dieser Additive zurückgeführt werden. Denkbar ist auch ein multifaktorielles Zusammenspiel dieser Einflüsse. Im Detail sind diese Wirkmechanismen jedoch noch nicht vollständig geklärt. Gleichermäßen gilt dies für den Einfluss Ionischer Flüssigkeiten, denen ebenso eine positive Wirkung bei der Steigerung der Ausbeute der Proteinfaltung zugeschrieben wird (Summers & Flowers II, 2000;

Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010) und die sich somit als Alternativen zu den herkömmlich genutzten Additiven erweisen können. In früheren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass eine Unterdrückung der Aggregationsreaktion während der Rückfaltung stattfindet und somit die Faltungsausbeute erhöht wird.

Ziel dieser Arbeit ist es, systematische Abhängigkeiten und Zusammenhänge bei der Variation der kationischen beziehungsweise anionischen Komponente der Ionischen Flüssigkeiten und deren Einfluss auf die Faltungsausbeute bei der *in vitro*-Faltung zu identifizieren.

Des Weiteren ist bereits bekannt, dass Ionische Flüssigkeiten durchaus in der Lage sind, bei hohen Konzentrationen auch destabilisierend auf Proteine zu wirken. Dies wurde vorrangig durch thermische Denaturierung anhand von fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen und durch dynamische Differenzkalorimetrie beschrieben. Genauere Untersuchungen zu molekularen Wirkmechanismen gibt es jedoch nur sehr wenige. Um Aussagen zu den Einflüssen der Ionischen Flüssigkeiten auf die Stabilität von Proteinen sowie deren Wirken bei der Denaturierung, Renaturierung und Aggregation zu erlangen, sind Strukturuntersuchungen bevorzugt mittels spektroskopischer Methoden erforderlich. Viele Ionische Flüssigkeiten basieren jedoch auf aromatischen Systemen und absorbieren selbst in einem spektralen Bereich, in dem üblicherweise spektroskopische Untersuchungen an Proteinen durchgeführt werden. Deshalb wurde EGFP als Modellprotein gewählt, da dieses Protein aufgrund seiner charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften eine spektroskopische Analyse der experimentellen Fragestellungen erlauben sollte.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit liegt darin, mit geeigneten Ionischen Flüssigkeiten Aussagen und mögliche Erklärungen über Wirkmechanismen und Interaktionen mit Proteinen auf struktureller Ebene mittels spektroskopischer Messmethoden zu erheben.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte

Die in der **Tabelle 2.1** gelisteten Geräte sind im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit benutzt worden.

**Tabelle 2.1:** Liste der verwendeten Geräte.

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller / Bezugsquelle</b>
<b>Absorptionsspektrometer</b> Ultraspec® 4000	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
<b>Absorptions-Küvetten</b> Hellma Halbmikro 104 QS, 10 × 4 mm Einmal-Küvetten Halbmikro, Polystyrol	<i>Hellma, Müllheim Roth GmbH, Karlsruhe</i>
<b>Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung</b> Eclipse 2 Separation System Isokratische Pumpe Agilent G 1310A Pufferentgasungsvorrichtung Agilent G 1322A Streulichtdetektor Mini Dawn Tristar UV-Detektor LKB 2152	<i>Wyatt Technology Europe, Dernbach Agilent Technologies, Böblingen Agilent Technologies, Böblingen Wyatt Technology, USA LKB, Schweden</i>
<b>Autoklav</b> Varioklav®	<i>H+P Labortechnik, Oberschleißheim</i>
<b>Bioreaktor</b> Biostat ED (10 Liter, C-DCU, MCFSwing)	<i>B. Braun Melsungen AG, Melsungen</i>
<b>Brutschrank</b> B6030	<i>Heraeus Instruments, Düsseldorf</i>
<b>CD-Spektrometer</b> Jasco J-810 Spektropolarimeter mit Peltierelement PTC-4235	<i>Jasco GmbH, Groß-Umstadt</i>
<b>UV / CD-Küvetten</b> Hellma 106 QS, 0,1 mm – 0,5 mm Hellma Makro 100 QS, 10 × 10 mm Makro QS 10 × 5 mm	<i>Hellma, Müllheim Hellma, Müllheim Hellma, Müllheim</i>
<b>Chromatographieeinheiten</b> ÄKTA FPLC ÄKTA purifier 100 ÄKTA explorer 100 Prozesssteuerung UNICORN Software HPLC – Gynkotech Pumpe: P 580 Autosampler: Gina 50 UV/VIS-Detektor: UVD 170S Kolonnenthermostat: STH 585 Steuersoftware: Chromelion v4.32	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Dionex, Idstein</i>

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Geräte (Fortsetzung)

Geräte	Hersteller / Bezugsquelle
<b>Chromatographiesäulen</b>	
HiTrap Q HP 5 ml	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
HisTrap HP	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Affinitätschromatographiesäule: Ni <sup>2+</sup> -NTA Agarose;	<i>Quiagen, Hilden</i>
Säulenvolumen 25 ml, Säulenkörper: XK16/20	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Nucleosil 500-5 C4-PPn-Säule	<i>Macherey-Nagel, Düren</i>
Nucleosil 300-C4	<i>Phenomenex, Aschaffenburg</i>
<b>Elektroporationsgerät</b>	
Gene Pulser II	<i>Bio Rad, München</i>
Pulse Controller Plus	<i>Bio Rad, München</i>
Elektroporationsküvetten, 2 mm	<i>Bio Rad, München</i>
<b>Fluoreszenzspektrometer</b>	
Fluoromax-3	<i>Isa Instruments, München</i>
Temperaturregler LFI-3751	<i>Wavelength Electronics, USA</i>
<b>Fluoreszenz-Küvetten</b>	
Hellma Makro 101 QS, 10 × 10 mm	<i>Hellma, Müllheim</i>
Hellma Halbmikro 104F QS, 10 × 4 mm	<i>Hellma, Müllheim</i>
Hellma Halbmikro 114F QS, 10 × 4 mm	<i>Hellma, Müllheim</i>
Hellma Makro 111 QS, 10 × 10 mm	<i>Hellma, Müllheim</i>
<b>Gelelektrophoreseeinheiten</b>	
Gelelektrophoreseapparatur GNA-100	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Gelelektrophoreseapparatur SE 250	<i>Hofer Pharmacia, USA</i>
Vertikal-Gelelektrophoresekammer SE260	<i>Hofer Pharmacia, USA</i>
Electrophoresis Power supply 600	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
<b>Hochdruckhomogenisator</b>	
Gaulin Micron Lab 40	<i>APV Homogeniser, Lübeck</i>
<b>Homogenisator</b>	
Ultra Turrax T25	<i>Janke &amp; Kunkel, IKA® Labortechnik</i>
<b>Laminarflowbox</b>	
HERA safe	<i>Heraeus Instruments, Düsseldorf</i>
<b>Lyophilisator</b>	
Beta 1-16 / LMC-1	<i>Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode</i>
<b>Magnetrührer</b>	
MR 3000, MR 3001	<i>Heidolph, Kelheim</i>
<b>Mixer</b>	
Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries, Inc., USA</i>
<b>Microplate Reader</b>	
VERSAMax	<i>Molecular Devices, USA</i>
96 well plate	<i>TPP AG, Schweiz</i>
	<i>Linbro® ICN biomedical, Inc., USA</i>
<b>Pumpen</b>	
Pumpe P-1	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Öl-Drehschieberpumpe RE-2	<i>Vacuubrand GmbH, Wertheim</i>
<b>pH-Messgerät</b>	
pH-Meter: pH 526	<i>WTW, Weilheim</i>
pH-Elektrode SenTiX 61	<i>WTW, Weilheim</i>
pH-Elektrode SenTiX Mic	<i>WTW, Weilheim</i>
<b>Refraktometer</b>	
	<i>Carl Zeiss, Jena</i>
<b>Streulichtdetektor für Dynamische Lichtstreuung</b>	
DynaPro	<i>Wyatt Technology, USA</i>
<b>Schüttelinkubator</b>	
SM30	<i>Edmund Bühler GmbH, Hechingen</i>

**Tabelle 2.1:** Liste der verwendeten Geräte (Fortsetzung)

Geräte	Hersteller / Bezugsquelle
<b>Thermomixer</b>	
Thermomixer 5436	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Thermomixer comfort	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
<b>Waagen</b>	
BP 4100S; KB BA 100; MC1	<i>Sartorius, Göttingen</i>
<b>Zentrifugen</b>	
Tischzentrifuge Biofuge pico	<i>Heraeus Instruments, Düsseldorf</i>
Tischzentrifuge Biofuge fresco	<i>Heraeus Instruments, Düsseldorf</i>
Universal 16	<i>Hettich Zentrifugen, Tuttlingen</i>
Universal 32R	<i>Hettich Zentrifugen, Tuttlingen</i>
Beckman Avanti J-30	<i>Beckman, München</i>
Beckman Avanti J-25	<i>Beckman, München</i>
Beckman Avanti J-20	<i>Beckman, München</i>
<b>Rotoren</b>	
Winkelrotor 6-fach 1620 A	<i>Hettich Zentrifugen, Tuttlingen</i>
Winkelrotor 30-fach 1689	<i>Hettich Zentrifugen, Tuttlingen</i>
JA-25.50; JA-30-50; JLA-8.1000	<i>Beckman, München</i>

## 2.1.2. Sonstige Geräte, Kits, Referenzmarker und Materialien

**Tabelle 2.2** zeigt Geräte, Kits, Referenzmarker und Materialien, welche für die Erstellung der hier vorliegenden Arbeit häufig Anwendung fanden.

**Tabelle 2.2:** Liste sonstiger Geräte, Kits, Referenzmarker und Materialien.

Geräte	Hersteller / Bezugsquelle
<b>Dialyseschläuche</b>	
Spectra/Por® MWCO 6.000–8.000	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
<b>Dialyse-System</b>	
Mikro-Dialysierkapsel QuixSep (1 ml)	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
<b>DNA-isolierungs Kit</b>	
QIAprep® Spin Miniprep Kit (250)	<i>Qiagen, Hilden</i>
<b>Exsikkatoren</b>	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
<b>Filtrations- und Entgasungsanlage</b>	
Rundfiltermembranen:	
Durapore 0,1 µm, VVLP	<i>Millipore, Schwalbach</i>
Isopore 0,4 µm, HTTP	<i>Millipore, Schwalbach</i>
Vakuumfiltrieranlage:	<i>Sartorius, Göttingen</i>
Saugflasche und Aufsatz	
Vakuumpumpe:	<i>IMLAB Laboratory Technology, Belgien</i>
Vacuubrand RE-2	
<b>Glasflaschen</b>	
50 ml; 250 ml; 500 ml; 1 l; 2 l	<i>Schott AG, Mainz</i>
<b>Glaskolben</b>	
Erlenmeyerkolben: 50 ml – 5 l	<i>Schott AG, Mainz</i>
<b>Küvettschleuder</b>	
KS 8 CE	<i>ITS, Hattersheim</i>
<b>Loops für Probenauftrag am Äkta System</b>	
Superloop (150 ml; 50 ml; 10 ml)	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>



**Tabelle 2.2:** Liste sonstiger Geräte, Kits, Referenzmarker und Materialien (Fortsetzung).

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller / Bezugsquelle</b>
<b>Mikrowelle</b> R2V16	<i>SHARP</i>
<b>Spritzen</b> Einmalspritzen: Omnifix 50 ml Prazisionsspritzen 25 µl; 50 µl sterile Spritze 0,5 ml; 5 ml; 10 ml	<i>B. Braun Melsungen AG, Melsungen</i> <i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i> <i>Hamilton Bonaduz AG, Schweiz</i>
<b>Spritzenfilter</b> Rotilabo® Spritzenfilter 0,2µm Rotilabo® Spritzenfilter 0,4µm	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i> <i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
<b>Standards für Elektrophorese</b> Protein-Molekularmassenmarker, LMW <i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i> <i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
<b>pH-Indikator</b> pH-Indikatorstäbchen	<i>Merck, Darmstadt</i>
<b>Pipetten</b> Pipettensatz Research	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
<b>Pipettenspitzen zum Entsalzen</b> ZipTip <sub>C4</sub>	<i>Millipore, Schwabach</i>
<b>Reaktionsgefäße</b> Savelock 1,5 ml; 2,0 ml 15 ml; 50 ml	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i> <i>TPP AG, Schweiz</i>
<b>Trockenschrank</b> Function line T6	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
<b>Zentrifugen-Filtereinheiten</b> Centricon® YM-10 Amicon Ultra-15; 10 KDa Amicon Ultra-4; 3 KDa	<i>Millipore, Schwabach</i> <i>Millipore, Schwabach</i> <i>Millipore, Schwabach</i>

## 2.1.3. Chemikalien

### 2.1.3.1. Ionische Flüssigkeiten

In **Tabelle 2.3** sind die in dieser Arbeit verwendeten Ionischen Flüssigkeiten gelistet. Die Qualität variierte bei den Herstellern sehr stark. Der Reinheitsgrad war > 95 %. Bis auf EMIM Cl und BMIM Cl waren die verwendeten Ionischen Flüssigkeiten bei Raumtemperatur flüssig. Einige der Substanzen zeigten stark hygroskopische Eigenschaften. Aufgrund dessen wurden alle Ionischen Flüssigkeiten in ihren Originalbehältern zur dauerhaften Lagerung in Exsikkatoren mit entsprechenden Trocknungsmitteln aufbewahrt. Die Erzeugung isobarer Verhältnisse beim Öffnen der Exsikkatoren wurde durch Stickstoffzufuhr gewährleistet, um den Kontakt mit der Luftfeuchtigkeit zu minimieren. Alle Substanzen waren in Wasser löslich und wurden für die zeitnahe Anwendung meist als 85 %-ige Stammlösung (w/w) mit Stickstoff überschichtet gelagert. Lösungen wurden in Wasser der Qualität MilliQ mit einer Leitfähigkeit  $\leq 55 \mu\text{S cm}^{-1}$  angesetzt.

**Tabelle 2.3:** Liste der verwendeten Ionischen Flüssigkeiten.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller / Bezugsquelle</b>
HO-EMIM Cl: 1-(2-Hydroxyethyl)-3-methylimidazoliumchlorid	<i>Degussa, Essen / NIGU Chemie GmbH, Waldkrainburg</i>
HO-EPy Cl: 1-(2-Hydroxyethyl)-pyridiniumchlorid	<i>Degussa, Essen</i>
HO-PMIM Cl: 1-(3-Hydroxypropyl)-3-methylimidazoliumchlorid	<i>Degussa, Essen</i>
HO-HMIM Cl: 1-(6-Hydroxyhexyl)-3-methylimidazoliumchlorid	<i>Solvent Innovation, Aachen</i>
MMIM DEP: 1,3-Dimethylimidazoliumdimethylphosphat	<i>Solvent Innovation, Aachen</i>
BMIM Cl: 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid	<i>Degussa, Essen</i>
EMIM Cl: 1-Ethyl-3-methylimidazoliumchlorid	<i>TCl, Japan / Solvent Innovation, Aachen / Fluka, Schweiz</i>
HMIM Cl: 1-Hexyl-3-methylimidazoliumchlorid	<i>Solvent Innovation, Aachen</i>
Ammoeng 100: Cocosaklylpentaethoxymethylammoniummethylsulfat	<i>Solvent Innovation, Aachen</i>
Ammoeng 111: Poly-[oxy(methyl-1,2-ethandiyl)]- $\alpha$ -[2-(diethylhydroxyethylammonio)ethyl]-acetat	<i>Solvent Innovation, Aachen</i>
Ammoeng 112: Poly-[oxy(methyl-1,2-ethandiyl)]- $\alpha$ -[2-(diethylhydroxyethylammonio)-ethyl]-dihydrogenphosphat	<i>Solvent Innovation, Aachen</i>

### 2.1.3.2. Allgemeine Chemikalien

**Tabelle 2.4** zeigt die in der Arbeit verwendeten Chemikalien. Lösungen wurden in Wasser der Qualität MilliQ mit einer Leitfähigkeit  $\leq 55 \mu\text{S cm}^{-1}$  angesetzt. Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad *pro analysi* (p. A.), wenn nicht anders vermerkt.

**Tabelle 2.4:** Liste der verwendeten Chemikalien.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller / Bezugsquelle</b>
2-Mercaptoethanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
30 % Acrylamid / 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Aceton	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Acetonitril	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Agar-Agar	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Agarose	<i>ICN, Meckenheim</i>
Ammoniumacetat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ammoniumchlorid	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Ammoniumchlorid ( $^{15}\text{N}$ ), 99 %	<i>Cambridge Isotope Laboratories, Inc.</i>
Ammoniumperoxodisulfat, APS	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Borsäure	<i>Fluka, Schweiz</i>
Bromphenolblau	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Calciumchlorid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Chloroform	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Citronensäure	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Coomassie Brilliant Blau G250	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Deuteriumchlorid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Deuteriumoxid	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Dimethylsulfoxid, DMSO	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
di-Natriumhydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Dithiothreitol, DTT	<i>ICN, Meckenheim</i>

**Tabelle 2.4:** Liste der verwendeten Chemikalien (Fortsetzung)

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller / Bezugsquelle</b>
Eisen(III)-citrat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Essigsäure	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethanol	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ethidiumbromid	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Tetramethylethyldiamin, TEMED	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	<i>ICN, Meckenheim</i>
Ethylenglykol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Formaldehyd	<i>Fluka, Schweiz</i>
Glucose	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Glutathion (reduziert/oxidiert)	<i>Fluka, Schweiz</i>
Glycerin	<i>Merck, Darmstadt</i>
Glycin	<i>ICN, Meckenheim</i>
Guanidiniumchlorid, GuHCl	<i>NIGU Chemie GmbH, Waldkrainburg</i>
	<i>ICN, Meckenheim</i>
Hefeextrakt	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Imidazol	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Isopropanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid, IPTG	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Kobalt(II)-chlorid	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Kupfer(II)-chlorid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Magnesiumchlorid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Magnesiumsulfat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Mangan(II)-chlorid	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Methanol	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES	<i>ICN, Meckenheim</i>
Natriumchlorid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Natriumdeuteriumoxid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Natriumdihydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumdodecylsulfat, SDS	<i>ICN, Meckenheim</i>
Natriumhydroxid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Natriummolybdat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Natriumselenit	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Nickel(II)-chlorid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Nickelsulfat	<i>Fluka, Schweiz</i>
Salzsäure, HCl	<i>Merck, Darmstadt</i>
Trichloressigsäure, TCA	<i>Merck, Darmstadt</i>
Trifluoressigsäure, TFA	<i>Merck, Darmstadt</i>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris	<i>ICN, Meckenheim</i>
Trypton	<i>DIFCO, USA</i>
Zinksulfat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>

## 2.1.4. Enzyme und Proteine

In **Tabelle 2.5** sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Proteine aufgelistet.

**Tabelle 2.5:** Liste der verwendeten Enzyme und Proteine.

Protein / Enzym	Bezugsquelle
Benzonase:	<i>Merck, Darmstadt</i>
Endonuclease, E.C. 3.4.21.14 1	
EGFP	<i>diese Arbeit</i>
EGFP deuteriert	<i>diese Arbeit</i>
EGFP markiert mit Isotop $^{15}\text{N}$	<i>diese Arbeit</i>
Enterokinase:	<i>Roche, Penzberg</i>
Enteropeptidase, E.C. 3.4.21.9	

## 2.1.5. Organismen und Plasmide

**Tabelle 2.6** zeigt alle in dieser Arbeit genutzten Organismen und Plasmide.

**Tabelle 2.6:** Liste der verwendeten Organismen und Plasmide.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal [dcm] [lon] hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ(DE3)	<i>Novagen, Bad Soden</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>E. coli</i> recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> ΔM15(lacZ) Tn10 (tet <sup>r</sup> )]	<i>Stratagene, USA</i>
Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
pET-19b	prokaryontische Expression des Gens mit 10 N-terminalen Histidinen, Enterokinaseschnittstelle, EGFP-Sequenz (siehe 7.5)	<i>Novagen, Bad Soden</i> <i>Klonierung: Dr. Ulrich Schmidt, Halle</i>

## 2.1.6. Software

**Tabelle 2.7** zeigt die Software, welche zur Erstellung und Auswertung von Datensätzen und Abbildungen verwendet wurde.

**Tabelle 2.7:** Liste der verwendeten Software.

Software	Bezugsquelle
Gene Runner 3.05	<i>Hastings Software, Inc., USA</i>
ISIS™/DRAW 2.4	<i>MDL Information Systems, USA</i>
Origin 7	<i>OriginLab, USA</i>
PyMOL	<i>DeLano Scientific LLC, USA</i>
Sigma Plot 8.0	<i>Jandel / SPSS, Inc., USA</i>

## 2.1.7. Geräte anderer Einrichtungen

**Tabelle 2.8** zeigt Geräte, welche an anderen Einrichtungen und Instituten außerhalb des Institutes für Biotechnologie (MLU Halle-Wittenberg) genutzt wurden.

**Tabelle 2.8:** Liste der verwendeten Geräte anderer Institute.

Gerät/Hersteller	Institution/Ort
<b>IR-Spektrometer</b> IR-Spektrometer Vector 22 <i>Bruker, Karlsruhe</i> DTGS-Detektor Kälte-Thermostat F6-C25 mit Pt100-Temperaturfühler <i>Haake, Karlsruhe</i> BaF <sub>2</sub> -Fenster 13 mm Korth Kristalle GmbH, Kiel Spacer 6 µm – 56 µm Harrick Scientific, Pleasantville	<b>Institut für Physikalische Chemie</b> MLU Halle – Wittenberg
<b>NMR-Spektrometer</b> Bruker Avance II 600 <i>Bruker, Rheinstetten</i> NMR-Probenröhrchen NewEra (NE-UP-5) Analysco Ltd, UK	<b>Institut für Physik</b> MLU Halle – Wittenberg
<b>Massenspektrometer</b> MALDI-TOF REFLEX Spektrometer Bruker-Daltonik GmbH, Bremen ESI-Massenspektrometer Esquire-LC Ionenfallen-Massenspektrometer Bruker-Daltonik GmbH, Bremen	<b>Max-Planck-Forschungsstelle Enzymologie der Proteinfaltung, Halle (Saale)</b>

## 2.1.8. Medien, Lösungen, Puffer

### 2.1.8.1. Bakterienanzucht

Die für die Bakterienanzucht verwendeten Medien (siehe **Tabelle 2.9**), sowie Lösungen und Wasser wurden direkt nach der Herstellung autoklaviert (121 °C, 20 min). Die hitzeinstabilen Bestandteile wie Ampicillin und IPTG wurden steril filtriert und anschließend dem Medium in entsprechender Konzentration beigefügt.

**Tabelle 2.9:** Liste der verwendeten Kulturmedien und deren Zusammensetzung.

Medium	Chemikalie	Konzentration
	Ampicillin	100 mg/ml (Stammlösung) 100 µg/ml (im Medium)
	IPTG	1 M (Stammlösung) 1 mM (im Medium)
LB-Medium (Luria-Bertani-Broth)	Trypton Hefeextrakt NaCl pH 7,5 (NaOH)	10 g/l 5 g/l 5 g/l
LB-Agar	LB-Medium mit Agar-Agar	15 g/l

**Tabelle 2.9:** Liste der verwendeten Kulturmedien und deren Zusammensetzung (Fortsetzung).

Medium	Chemikalie	Konzentration
SOB-Medium***	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
SOC-Medium	SOB-Medium***	
	Magnesium-Stammlösung** (1 M MgSO <sub>4</sub> , 1 M MgCl <sub>2</sub> )	1 % (v/v)
	Glucose**	40 % (w/v)
Bioreaktormedium	Hefeextrakt Vollmedium***	50 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NH <sub>4</sub> Cl
	Glukose-Lösung***	5 g/l Glukose
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung***	11 g/l
	MgSO <sub>4</sub> -Lösung***	0,68 g/l
	pH-Regulatorlösungen	10 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10 % KOH
M9-Minimalmedium		
5 × M9***	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	85 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g/l
	NaCl	2,5 g/l
	NH <sub>4</sub> Cl*	5 g/l
	Wasser	ad 1000 ml
TS2-Lösung**	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	100 mg/l
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	30 mg/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300 mg/l
	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	200 mg/l
	NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	20 mg/l
	CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	900 mg/l
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	20 mg/l
	Wasser	ad 1000 ml
Minimalmedium pro Liter	5 × M9***	200 ml
	MgSO <sub>4</sub> (1 M)***	2 ml
	CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)***	1 ml
	Fe(III)citrate (10 mM)**	1 ml
	TS2-Lösung***	2 ml
	Glucose (20 %, w/v)**	20 ml
	Wasser	ad 1000 ml

\* für die Herstellung <sup>15</sup>N-markierten Proteins <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl verwenden

\*\* sterilfiltrieren

\*\*\* autoklavieren

## 2.1.8.2. Gelelektrophorese

### SDS-Polyacrylamidgele

Für die in dieser Arbeit durchgeführte SDS-PAGE wurden die in **Tabelle 2.10** aufgelisteten Puffersysteme verwendet. Die SDS-Polyacrylamidgele besaßen die in **Tabelle 2.11** gezeigte Zusammensetzung.

**Tabelle 2.10:** Liste der verwendeten Puffersysteme und deren Zusammensetzung für die SDS-PAGE.

Puffer	Chemikalie	Konzentration
5 × SDS-PAGE Laufpuffer**	Tris	15,1 g/l
	Glycin	94 g/l
	SDS	5 g/l
4 × SDS-PAGE Sammelgelpuffer**	Tris-HCl, pH 6,8	60,57 g/l
	SDS	4 g/l
4 × SDS-PAGE Trenngelpuffer**	Tris-HCl, pH 8,8	181,71 g/l
	SDS	4 g/l
5 × SDS-Probenpuffer	Tris-HCl, pH 8,0	250 mM
	SDS	5 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,005 % (w/v)
	2-Mercaptoethanol	5 % (v/v)

\*\* sterilfiltrieren, 0,2 µm Filter

**Tabelle 2.11:** Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.

Bestandteil	6 % Sammelgel	15 % Trenngel
PAA 30 % / 0,8 % <sup>1</sup>	1,2 ml	5 ml
4 × Puffer	1,5 ml Sammelgel	2,5 Trenngelpuffer
Wasser	3,3 ml	2,5 ml
10 % APS	20 µl	35 µl
TEMED	4 µl	7 µl

<sup>1</sup>gebrauchsfertige, gasstabilisierte wässrige 30 %-ige Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 29:1

### Coomassie-Färbung nach FAIRBANKS

Die in dieser Arbeit verwendeten Coomassie-Färbelösungen nach FAIRBANKS enthielten die in **Tabelle 2.12** gelisteten Zusammensetzungen (Fairbanks et al., 1971).

**Tabelle 2.12:** Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung nach FAIRBANKS.

Bestandteil	FAIRBANKS A	FAIRBANKS B	FAIRBANKS C
Coomassie-Brilliant-Blau	0,05 %	0,005 %	0,002 %
Isopropanol	25 %	10 %	0 %
Essigsäure	10 %	10 %	10 %

SDS-PAGE-Entfärber (FAIRBANKS D): Essigsäure 10 % (v/v)

SDS-PAGE-Trocknungslösung: Glycerin 5 % (v/v)

### 2.1.8.3. Chromatographie – Laufmittel und Puffer

Der pH-Wert der Puffer wurde bei einer Temperatur von 20 °C eingestellt. Mit Ausnahme der Laufmittel für die RP-HPLC wurden alle Puffer filtriert\*\* und entgast.

#### Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

Puffer B: 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

#### Anionenaustauschchromatographie

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0

Puffer B: 50 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0

#### *Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography*

Laufmittel A: H<sub>2</sub>O + 0,1 % TFA

Laufmittel B: Acetonitril + 0,1 % TFA

### 2.1.8.4. Sonstige Puffer

#### Zellaufschlusspuffer

50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0 (nach enzymatischem DNA-Abbau mittels Benzonase → Zugabe von NaCl ad 300 mM)

#### Dialysepuffer

50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0

10 mM Borsäure, 10 mM Citronensäure, 10 mM K-Phosphat, 10 mM Tris, 100 mM NaCl (der Mischpuffer wurde entsprechend des gewünschten pH-Werts mit HCl beziehungsweise NaOH eingestellt)

#### Chromatographiesäulen-Lagerungspuffer

20 % (v/v) Ethanol

\*\* sterilfiltrieren, 0,2 µm Filter



## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Klonierung und Sequenzierung

##### 2.2.1.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kits (250) der Firma Qiagen aus dem jeweilig verwendeten *E. coli*-Stamm isoliert. Hierzu wurden die Zellen einer Übernacht-Flüssigkultur für 10 min bei 5000g zentrifugiert. Die Bakterienzellwände wurden anschließend alkalisch lysiert und durch darauffolgende fraktionierte DNA-Präzipitation (Birnboim & Doly, 1979) gewonnen. Im Vergleich zu hochmolekularer chromosomaler *E. coli*-DNA präzipitiert die Plasmid-DNA nicht. Anschließend konnte die DNA mittels eines Anionenaustauschchromatographie-Säulchens isoliert werden.

Im Anschluss wurde die DNA in 30 bis 50 µl sterilem Wasser eluiert. Die Plasmid-DNA besaß eine Konzentration von ca. 100 ng/µl. Es wurde jeweils nach dem beiliegenden Standardprotokoll des Kits verfahren.

##### 2.2.1.1.2. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die DNA-Sequenzanalyse wurde die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) beauftragt. Für die Sequenzierung wurden die DNA-Primer des *T7-Promotors* und *T7-Terminators* verwendet. Die Basensequenz wurde von beiden Strängen (*upstream* und *downstream*) vollständig analysiert.

### 2.2.2. Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen

#### 2.2.2.1. Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen

Die Stammhaltung von *E. coli* erfolgte auf LB-Agar-Platten bei 4 °C bis maximal vier Wochen. Für die langfristige Lagerung wurden die Mikroorganismen als Glycerinkulturen bei -80 °C aufbewahrt. Dazu wurden 1,6 ml einer Übernachtskultur mit 400 µl sterilem 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl pH 8,0 gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Anzucht von Mikroorganismen erfolgte in 15 ml-Reaktionsgefäßen mit 5 ml LB-Medium oder in 100 ml-Schüttelkolben mit 25 ml LB-Medium. Das jeweilige Antibiotikum wurde in entsprechender (siehe **Tabelle 2.9**) Konzentration der Flüssigkultur zugesetzt. Die Anzucht der

Kulturen erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C auf einem Horizontalschüttler bei 130 rpm. Flüssigkulturen wurden entweder mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte oder direkt aus einer Glycerinkultur angeimpft.

### 2.2.2.2. Transformation von Mikroorganismen

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mittels elektrokompenter Zellen. Zur Vervielfältigung wurde Plasmid-DNA in den *E. coli* Stamm XL1-Blue transformiert. Für die Überexpression rekombinanter Gene dienten *E. coli* Zellen des Stammes BL21 (DE3). Ein Aliquot (40 µl) elektrokompenter *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA (1 µl) gemischt und im Anschluss in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte am Gene Pulser II (*Bio Rad, München*) mit folgenden Einstellungen: U = 2,5 kV; R = 200 Ω; C = 25 µF. Direkt nach dem Spannungspuls wurden die Zellen in 1 ml auf 37 °C temperiertes SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Danach erfolgte das Ausplattieren der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten. Um auf transformierte Zellen zu selektieren, wurde den Agar-Platten Ampicillin (100 µg/mL) zugesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.2.3. Expressionstests in M9-Minimalmedium

Für die Expressionstests in M9-Minimalmedium wurde eine Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte gepickt, in 5 ml LB-Medium (siehe **Tabelle 2.9**) überführt und bei 37 °C auf einem Horizontalschüttler bei 130 rpm über Nacht inkubiert. Der Übernachtskultur wurde 5 µl Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben. Es wurden aufeinander folgend zwei Vorkulturen mit M9-Minimalmedium (siehe **Tabelle 2.9**) in 100 ml-Kolben zu 25 ml-Medium und in 500 ml-Kolben zu 100 ml Medium angeimpft, um eine Anpassung an die veränderten Bedingungen des Nährmediums zu gewährleisten. Die anschließende 1 Liter umfassende Hauptkultur in einem 5 l-Schüttelkolben wurde 1 %-ig (v/v) aus der zweiten Vorkultur inokuliert. Der Selektionsdruck der Kulturen (Vorkulturen und Hauptkultur) im M9-Minimalmedium wurde bei einer Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml aufrechterhalten. Die Bestimmung der optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der Hauptkultur erfolgte stündlich am Ultraspec<sup>®</sup> 4000 (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) in Einmal-Küvetten (*Roth GmbH, Karlsruhe*). Beim Erreichen einer optischen Dichte von 0,8 wurde die Hauptkultur auf 30 °C abgekühlt. Nach 30 min erfolgte die Induktion der Expression bei einer OD<sub>600</sub> von 1,1 durch Zugabe von 1 ml 1 M IPTG. Direkt vor der

Induktion wurden Glycerin-Kulturen (siehe 2.2.2.1.) angefertigt. Die Kontrolle des Wachstums der Kultur erfolgte 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 12 h nach Induktion durch die Entnahme von jeweils 1 ml Probe für die Analyse mittels SDS-PAGE. Die Kultur wurde nach 12 h Induktionzeit 20 min bei 6000 rpm (4 °C) zentrifugiert, die Zellfeuchtmasse bestimmt bei -80 °C gelagert. Die Testexpression erfolgte mit dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3). Die angefertigten Glycerinkulturen wurden für die <sup>15</sup>N-Markierung des EGFP benutzt.

## 2.2.2.4. Expression in Komplexmedien

### 2.2.2.4.1. Kultivierung in Schüttelkulturen

Die Produktion des EGFP erfolgte in *Escherischia coli* BL21 (DE3). Es wurde eine Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte gepickt und in einem 100 ml-Kolben mit 25 ml LB-Medium (siehe **Tabelle 2.9**) überführt und bei 37 °C auf einem Horizontalschüttler bei 130 rpm über Nacht, in Gegenwart von 25 µl Ampicillin (100 µg/ml), inkubiert. Aus der Übernachtskultur wurde eine Vorkultur in einem 500 ml-Kolben mit 100 ml LB-Medium angesetzt. Je 4 × 1,5 l LB-Medium in 5 l-Kolben bildeten die Hauptkultur, welche jeweils 1 %ig (v/v) aus der Vorkultur inokuliert wurden. Der Selektionsdruck wurde durch eine Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml aufrechterhalten. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 – 1,5 wurde die Hauptkultur auf 30 °C abgekühlt. Eine Stunde nach Abkühlung erfolgte die Induktion der Expression durch die Zugabe von jeweils 1,5 ml 1 M IPTG. In zeitlichen Abständen von 2 h wurde die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) bestimmt und jeweils eine 1 ml-Probe zur Analyse mittels SDS-PAGE entnommen. Die Zellernte erfolgte ca. 10 h nach Induktion durch Zentrifugation (20 min, 6000 rpm, 4 °C, JLA 8.1000). Das Zellpellet wurde direkt weiterverarbeitet oder bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2.4.2. Kultivierung im Bioreaktor - Fermentation

Für die Kultivierung im Bioreaktor diente ein Biostat ED Reaktor (*B. Braun, Melsungen*) mit digitalem Mess- und Regelsystem (DCU) sowie dem Prozessleitsystem MCFSwinn. Als grundlegendes Kultivierungsverfahren kam das *batch*-Verfahren auf Basis eines Hefeextrakt-Vollmediums (siehe **Tabelle 2.9**) zur Anwendung. Hierfür wurden 8 Liter Medium für 60 min bei 121 °C im Reaktor autoklaviert. Die Vervollständigung des Mediums erfolgte, nach Abkühlung auf 37 °C, mit separat autoklavierten Lösungen von Glukose, Magnesiumsulfat und Kaliumdihydrogenphosphat sowie Einstellung des pH-Wert auf 7,2. Der Selektionsdruck

wurde durch Zugabe von 100 mg/l Ampicillin aufrechterhalten. Das Inokulum erfolgte aus der zweiten Vorkultur mit einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 0,1$  in der Hauptkultur. Die Kultivierungstemperatur betrug 37 °C. Der pH-Wert muss nach Abfall unter pH 7,0 reguliert und konstant bei pH 7,0 gehalten werden. Die Induktion fand nach Temperaturregelung auf 30 °C und einer  $OD_{600}$  von 10 durch Zugabe von 1 mM IPTG statt. Die Zellernte erfolgte 4 h nach Induktion bei einer finalen  $OD_{600} = 34$ , durch 20-minütige Zentrifugation (6000 rpm, JLA 8.1000, 4 °C) der *E. coli* Zellen. Das Zellpellet wurde bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.2.5. Expression in M9-Minimalmedium zur $^{15}\text{N}$ -Markierung von EGFP**

Die Produktion von  $^{15}\text{N}$ -markiertem EGFP erfolgte in M9-Minimalmedium und mit *E. coli* BL21 (DE3). Eine Übernachtskultur im 15 ml-Reaktionsgefäß mit 5 ml M9-Minimalmedium (siehe **Tabelle 2.9**) wurde aus einer Glycerinkultur (siehe **2.2.2.3.**), in Gegenwart von Ampicillin (100 µg/ml), angeimpft. Aus dieser erfolgte das Inokulum von zwei aufeinanderfolgender Vorkulturen mit M9-Minimalmedium in 100 ml-Kolben zu 25 ml Medium und in 500 ml-Kolben zu 100 ml Medium. Die Hauptkultur umfasste 6 Liter  $^{15}\text{N}$ -angereichertes M9-Minimalmedium verteilt auf vier 5 l-Schüttelkolben. Für die Inokulation der Hauptkultur wurde der zweiten Vorkultur in der logarithmischen Wachstumsphase jeweils 15 ml entnommen und zentrifugiert (5 min, 5000g). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die *E. coli*-Zellen in die  $^{15}\text{N}$ -angereicherten Hauptkultur überführt. Der Selektionsdruck blieb durch eine Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml erhalten. Die Kontrolle des Wachstums der Kultur erfolgte in regelmäßigen Abständen über die  $OD_{600}$ . Bei einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 1,6$  wurde die Kultur auf 30 °C abgekühlt und nach einstündiger Inkubationszeit bei 30 °C die Induktion der Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG eingeleitet ( $OD_{600} = 2,0$ ). Die Ernte und Bestimmung der Zellfeuchtmasse der *E. coli*-Zellen erfolgte 10 h nach Induktion durch Zentrifugation (20 min, 6000 rpm, JLA 8.1000, 4 °C). Die Zellen wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Proteinreinigung wie unter **2.2.4.** beschrieben.

#### **2.2.2.6. Zellernte und Zellaufschluss**

Die Hauptkulturen wurden nach entsprechender Induktionsdauer durch Zentrifugation (6000 rpm, JLA 8.1000, 4 °C, 20 min) geerntet. Das erhaltene Zellsediment wurde mit ca. 5 ml Zellaufschlusspuffer (siehe **2.1.8.4.**) pro Gramm Zellfeuchtmasse resuspendiert und

anschließend durch Hochdruckdispersion in 3 Passagen bei einem Druck von  $> 700$  bar aufgeschlossen. Der Zellaufschluss (ca. 40 ml) wurde mit 5  $\mu$ l Benzonase (250 U/ml) und  $MgCl_2$  (2 mM) versetzt, der pH-Wert auf 8,0 nachgestellt und anschließend bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Nach dem DNA-Verdau wurde die NaCl-Konzentration auf 300 mM eingestellt. Durch Zentrifugation bei 30000 rpm (JLA-30.50, 4 °C, 1 h) wurden lösliche Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt, die lösliche Fraktion wurde säulenchromatographisch weiterverarbeitet (siehe unter **2.2.4.**).

## 2.2.3. Proteinchemische Methoden

### 2.2.3.1. Proteinfällung für SDS-PAGE

Für die Fällung von EGFP in Gegenwart hoher Konzentrationen an Ionischen Flüssigkeiten ( $> 100$  mM) wurde die Lösung mit 4 Volumina Methanol durchmischt und zentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT). Im Anschluss wurde 1 Volumen Chloroform zugesetzt und ebenfalls zentrifugiert. Nach der darauffolgenden Zugabe von 3 Volumina Wasser wurde 5 min zentrifugiert (13000 rpm, RT). Die entstandene obere Phase wurde dekantiert und dem Ansatz 3 Volumina Methanol beigegeben. Nach erneutem Zentrifugieren (13000 rpm, 5 min, RT) konnte das Pellet nach Verwerfung des Überstands im Heizblock getrocknet und mit SDS-Probenpuffer versetzt werden.

### 2.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden denaturierte Proteine hinsichtlich ihrer Masse im elektrischen Feld getrennt (Rehm, 1997). Durch Interaktion der hydrophoben Bereiche des SDS und der durch Hitze denaturierten Proteine bilden sich Protein-SDS-Komplexe, die auf Grund der negativen Ladung des anionischen SDS auch eine negative Nettoladung erhalten. Die Protein-SDS-Komplexe besitzen ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis. Somit ist die Beweglichkeit im elektrischen Feld nur von der molaren Masse der Proteine abhängig und die Komplexe werden in der Polyacrylamidmatrix ihrer Größe nach getrennt. In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) verwendet. Die Gele enthielten ein 6 %-iges Sammelgel und ein 15 %-iges Trenngel (siehe **Tabelle 2.11**). Die Proben wurden mit reduzierendem 5  $\times$  SDS-Probenpuffer versetzt ( $\frac{1}{4}$  Volumen) und für 5 min bei 95 °C thermisch denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem elektrischen Feld bei 35 mA und

120 V für 45 Minuten. Die Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung nach FAIRBANKS (siehe **Tabelle 2.12**) sichtbar gemacht und anhand des mitgeführten LMW Protein-Marker (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) identifiziert. Die Gele wurden in der Färbelösung nach FAIRBANKS A erwärmt und für 15 Minuten inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte anschließend mit gleicher Verfahrensweise mit den Lösungen nach FAIRBANKS B bis D. Für die dauerhafte Aufbewahrung wurden die SDS-Polyacrylamidgele 1 h in SDS-PAGE-Trocknungslösung (Glycerin 5 % (v/v)) inkubiert und im Anschluss getrocknet.

### 2.2.3.3. Dialyse von Proteinen

Für einen Wechsel des Puffersystems wurde eine Dialyse durchgeführt. Hierfür wurden Dialyseschläuche (Spectra/Por® MWCO 6.000–8.000; *Roth GmbH, Karlsruhe*) benutzt. Das Verhältnis zwischen Proteinlösung und Pufferreservoir betrug mindestens 1:100, bei größeren zu dialysierenden Mengen wurde in kleineren Fraktionen dialysiert.

Die Dialyse von EGFP in Ionischen Flüssigkeiten wurde mit Mikro-Dialysierkapseln (QuixSep 1 ml; *Roth GmbH, Karlsruhe*) durchgeführt. Die Dialysemembran wurde aus den oben erwähnten Dialyseschläuchen gewonnen. Hoch konzentriertes EGFP wurde in der Ionischen Flüssigkeit mit der gewünschten Zielkonzentration verdünnt und dieses Volumen gegen das 25-fache an Puffervolumen dialysiert. Bei der Dynamischen Differenzkalorimetrie wurde der Dialysepuffer für die Referenzzelle genutzt.

Die Dialyseschläuche wurden vor ihrer Benutzung 3 × mit ddH<sub>2</sub>O ausgekocht. Dialysen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 6 °C – 8 °C durchgeführt.

### 2.2.3.4. Konzentrierung von Proteinen

Für verschiedene Messungen war es erforderlich, hohe EGFP-Konzentrationen bereitzustellen. Die Proteinlösung wurde mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren (*Millipore, Schwabach*) eingengt. Die mit Puffer vorab benetzten Zentrifugalkonzentratoren wurden mit 5000g bei 4 °C in einer Universal 32R (*Hettich Zentrifugen, Tuttlingen*) zentrifugiert. Es wurde so lange zentrifugiert, bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht war. Das Retentat wurde beim Erreichen höherer Proteinkonzentrationen regelmäßig mit einer Pipette gemischt, um eine zu hohe lokale Konzentration auf der Membran zu vermeiden. Die Konzentrationen des Retentats und des Permeats wurden mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt (siehe **2.2.5.1.1.**).

### 2.2.3.5. Deuterierung von Proteinlösungen

Für Infrarotspektroskopische Untersuchungen wurden das EGFP und das dazugehörige Puffersystem deuteriert. Die Puffersubstanzen wie Tris, NaCl, EDTA, GuHCl wurden separat nach Abwiegen in D<sub>2</sub>O gelöst und lyophilisiert. Die Lösungen wurden bei -80 °C eingefroren und mit dem Lyophilisator Beta 1-16 / LMC-1 (*Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode*) bei einer Arbeitstemperatur von 25 °C gefriergetrocknet. Dieser Vorgang wurde vier Mal wiederholt, um einen möglichst hohen Grad an Austausch zwischen Protium und Deuterium zu gewährleisten. Aus den deuterierten Substanzen wurde ein Tris-Puffersystem (50 mM Tris-DCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA) auf einen pD-Wert 8,0 eingestellt (siehe **Gleichung 2.1**; Jackson et al, 1989). Hierfür wurde DCl und NaOD verwendet, um keine zusätzlichen Protonen in das D<sub>2</sub>O-System einzutragen.

**Gleichung 2.1:**

$$pD = pH + 0,4$$

Um das EGFP zu deuterieren wurde die Proteinlösung (1 ml, 12,5 mg/ml) mit Zentrifugationskonzentratoren (*Millipore, Schwabach*) konzentriert (siehe **2.2.3.4.**). Im Anschluss wurde das Konzentrat ( $V \approx 150 \mu\text{l}$ ) mit 2 ml des deuterierten Tris-Puffersystems verdünnt. Der Zyklus wurde 6 Mal wiederholt. Die Inkubationszeit ab dem vierten Zyklus betrug jeweils mehrere Stunden. Das Volumen wurde so eingestellt, dass eine Konzentration von 20 mg/ml vorlag.

### 2.2.4. Chromatographische Methoden und Proteinreinigung

Sämtliche chromatographischen Reinigungsschritte wurden an Äkta-Systemen (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Beendigung der Reinigung wurden die Chromatographie-Säulen mit den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gereinigt (CIP) und in 20 %-igem Ethanol bei 4 °C aufbewahrt.

#### 2.2.4.1. Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie

Das EGFP wurde als Fusionsprotein mit einer Restriktionsschnittstelle für Enterokinase und einem Histidin-tag (His<sub>10</sub>-EGFP) am N-Terminus hergestellt und konnte somit mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt werden. Als Säulenmaterial wurde

Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose) oder HisTrap HP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet.

Für die Primärreinigung des Zellaufschlusses (siehe 2.2.2.6.) wurden selbst gepackte Säulen mit NTA-Agarose (SV ca. 25 ml) benutzt. Für die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie nach der Prozessierung des Proteins (siehe 2.2.4.2.) sowie für die Aufarbeitung  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins kamen HisTrap HP Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) zum Einsatz. Vor Beginn der Proteinreinigung wurde die Säule mit fünf Säulenvolumina Puffer A (siehe 2.1.8.3.) äquilibriert. Die Fließgeschwindigkeit betrug  $5 \text{ ml min}^{-1}$ . Der Überstand des zentrifugierten Zell-Lysats wurde mit Hilfe eines *superloops* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen. Anschließend wurde mit ebenfalls fünf Säulenvolumina Puffer B (siehe 2.1.8.3.) gewaschen. Durch Anlegen eines kontinuierlichen Gradienten von 0 % auf 100 % Puffer B über zehn Säulenvolumina wurde EGFP-(His<sub>10</sub>-tag) eluiert.

Für die Reinigung des EGFP nach der Prozessierung wurde bei der durchgeführten  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie der Durchfluss weiterverarbeitet und das auf der Säulenmatrix gebundene Protein mit 100 % Puffer B eluiert. Die Qualität der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen (siehe 2.2.3.2.) analysiert.

#### 2.2.4.2. Prozessierung von EGFP durch Enterokinase

Die Enterokinase (Roche, Penzberg) ist eine Serinprotease, die mit hoher Spezifität die Aminosäuresequenz



erkennt. Das isolierte Protein His<sub>10</sub>-EGFP besitzt C-terminal nach dem His<sub>10</sub>-tag diese spezifische Restriktionserkennungssequenz. Nach der Reinigung des Fusionsproteins über die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Säule wurde durch Inkubation von His<sub>10</sub>-EGFP mit der Enterokinase das N-terminale Fusionspeptid (His<sub>10</sub>-tag + linker-Sequenz) abgespaltet. Das Lyophilisat der Enterokinase (siehe **Tabelle 2.5**) wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst (Endkonzentration 0,25 – 0,3 mg/ml). Die Prozessierung wurde in einer Schottflasche unter stetigem Schwenken auf einem Horizontalschüttler durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden bei 37 °C im Inkubationspuffer bei einem Verhältnis von 1:400 (Enterokinase:His<sub>10</sub>-EGFP (w/w)) war das Protein fast vollständig prozessiert. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.2.3.2.) verfolgt.



Um den abgespalteten His<sub>10</sub>-tag und das noch unprozessierte Fusionsprotein vom gewünschten Zielprotein (EGFP) zu trennen, wurde nach der Prozessierung des Proteins erneut eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie (siehe **2.2.4.1.**) durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionsansatz bei 30000 rpm (JLA-30.50, 20 min, 4 °C) zentrifugiert, gegen Puffer A (siehe **2.1.8.3.**) dialysiert und aufgetragen.

#### **2.2.4.3. Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie**

Um einen Reinigungseffekt über Anionenaustauschchromatographie zu erzielen, wurde ein Puffer mit einem pH-Wert oberhalb des theoretischen isoelektrischen Punkt (siehe **7.5.**) des Proteins gewählt. Das prozessierte, durch Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie (siehe **2.2.4.1.**) gewonnene EGFP, wurde gegen Puffer A (50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) dialysiert und über Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Das EGFP wurde auf eine HiTrap Q Sepharose HP 5 ml (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml min<sup>-1</sup> aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit Puffer A (5 SV) wurde durch einen Stufengradienten mit Puffer B (50 mM Tris, 2 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) von 0 % bis 20 % über 5 Säulenvolumina und 20 % bis 100 % über 4 Säulenvolumina das Protein eluiert. Die Qualität der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE (siehe **2.2.3.2.**) unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Nach Dialyse (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) wurde das gereinigte EGFP bei -20 °C dauerhaft, oder bei 4 °C für den direkten Gebrauch ( $t \leq 1$  Woche) gelagert.

#### **2.2.4.4. Reversed Phase-High Performance Liquid-Chromatography**

Die RP-HPLC wurde für die Reinheitskontrolle nach der Proteinreinigung und zum Entsalzen von Proteinproben für die massenspektrometrische Analytik angewandt. Für die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde eine HPLC-Anlage von Gynkotech (*Dionex, Idstein*) benutzt. Die Trennung erfolgte über eine Nucleosil 500-5 C4-PPn-Säule (*Macherey-Nagel, Düren*) beziehungsweise Nucleosil 300-C4 (*Phenomenex, Aschaffenburg*). Den Laufmitteln A und B (siehe **2.1.8.3.**) wurde TFA (0,1 % (v/v)) als Ionenpaarreagens zugesetzt. Durch einen linearen Gradienten von 3 % bis 97 % (Wasser/ACN) über 30 min bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml min<sup>-1</sup> erfolgte die Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie. Für das Entsalzen von Proteinproben nach Inkubation in Ionischen Flüssigkeiten wurden verschiedene Gradienten und Laufzeiten getestet. Die Temperatur des

Säulenofens wurde auf 20 °C eingestellt. Zu den üblichen Wellenlängen von 220 nm und 280 nm wurde auch die Absorption bei 385 nm (Absorptionsmaximum des denaturiert vorliegenden Chromophors von EGFP) und 490 nm (Absorptionsmaximum des nativ vorliegenden Chromophors von EGFP) detektiert.

## 2.2.5. Spektroskopische und spektrometrische Methoden

### 2.2.5.1. UV/VIS-Spektroskopie

#### 2.2.5.1.1. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektroskopie wurde genutzt, um die Konzentration von Proteinlösungen zu bestimmen. Hierfür wurde das Ultrospec 4000 UV/VIS-Spektrometer (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) und Küvetten (*Hellma Halbmikro 104 QS, 10 × 4 mm*) aus Quarzglas verwendet. Je nach Anwendung wurden UV/VIS-Spektren in einem spektralen Messbereich von 240-600 nm aufgenommen, in der Regel bei Raumtemperatur. Aromatische Aminosäuren beziehungsweise Chromophore im Allgemeinen, Peptidbindungen und Disulfide absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge im ultravioletten und sichtbaren Bereich. Bei dem EGFP ist durch autokatalytische intramolekulare Zyklisierung der Aminosäuren Thr<sup>65</sup> – Tyr<sup>66</sup> – Gly<sup>67</sup> ein Chromophor existent, welcher ein Absorptionsmaximum bei 488 nm besitzt. Durch das Bestrahlen der Proteinlösung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge nimmt die Intensität mit Zunahme der Konzentration an absorbierenden Substanzen und der optischen Weglänge des Strahls durch die Lösung ab. Aus diesen Abhängigkeiten heraus ergibt sich das Lambert-Beersche-Gesetz wie folgt:

Gleichung 2.2:

$$I_E = I_A \times e^{-\alpha \times c \times d}$$

$I_E$  Intensität des Lichtstrahls nach der Probe (transmittiertes Licht)

$I_A$  Intensität des Lichtstrahls vor der Probe (eingestrahktes Licht)

$\alpha$  Proportionalitätsfaktor

$c$  Konzentration der absorbierenden Substanz

$d$  Schichtdicke der Probe [cm]

Somit nimmt die Intensität exponentiell mit der Schichtdicke der Probe und der Konzentration ab. Eine häufigere Verwendung findet eine andere Form des Lambert-Beerschen-Gesetzes:

**Gleichung 2.3:**

$$E = \log(I_A/I_E) = \varepsilon \times c \times d$$

<b><i>E</i></b>	Extinktion
<b><i>I<sub>E</sub></i></b>	Intensität des Lichtstrahls nach der Probe (transmittiertes Licht)
<b><i>I<sub>A</sub></i></b>	Intensität des Lichtstrahls vor der Probe (eingestrahletes Licht)
<b><i>ε</i></b>	molarer Extinktionskoeffizient [ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]
<b><i>c</i></b>	Konzentration der absorbierenden Substanz
<b><i>d</i></b>	Schichtdicke der Probe (cm)

Die Konzentration des Proteins lässt sich aus der Extinktion ( $E_\lambda$ ) bei einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$ , aus  $\varepsilon_\lambda$ , das mit  $\alpha$  (siehe **Gleichung 2.2**) über  $\varepsilon = \alpha/\ln 10$  definiert ist, sowie der Schichtdicke  $d$  der Probe (cm) ableiten. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt man die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ( $\varepsilon_{280}$ ). Der molare Extinktionskoeffizient ist für jedes Protein spezifisch und kann über die **Gleichung 2.4** unter nativen Bedingungen abgeschätzt werden (Gill und von Hippel, 1989).

**Gleichung 2.4:**

$$\varepsilon_{280} [M^{-1} cm^{-1}] = 5500 \#W + 1490 \#Y + 125 \#C - S - S - C$$

<b><math>\varepsilon_{280}</math></b>	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]
<b><math>\#W</math></b>	Anzahl der Tryptophane
<b><math>\#Y</math></b>	Anzahl der Tyrosine
<b><math>\#C-S-S-C</math></b>	Anzahl der Disulfidbrücken

Aus der **Gleichung 2.4** ergibt sich für das EGFP folgender Extinktionskoeffizient:

$$\varepsilon_{280} = 21890 M^{-1} \times cm^{-1}$$

Des Weiteren besitzt EGFP auf Grund seines ausgedehnten  $\pi$ -Elektronensystems des 4-(p-Hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on und der besonderen räumlichen Umgebung dieses Chromophors einen weiteren charakteristischen Extinktionskoeffizient bei 490 nm (Patterson et al, 2001):

$$\epsilon_{490} = 55000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

Zur Berechnung der Proteinkonzentration ist der spezifische Extinktionskoeffizient bei 490 nm verwendet worden, da in diesem spektralen Bereich Fremdsubstanzen nur eine geringe Absorption zeigen.

#### **2.2.5.1.2. Reinheitsbestimmung Ionischer Flüssigkeiten mittels UV/VIS-Spektroskopie**

Eine Vielzahl spektroskopischer Untersuchungen mittels UV/VIS-, Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie an EGFP wurden in Gegenwart von Ionischen Flüssigkeiten durchgeführt. Da die meisten in dieser Arbeit verwendeten Ionischen Flüssigkeiten selbst aromatische Verbindungen sind oder bei der Synthese dieser Verbindungen auch aromatische Nebenprodukte entstehen können, wurden diese auf ihre Reinheit im UV/VIS-Spektralbereich untersucht. Ziel war es, die Ionischen Flüssigkeiten zu identifizieren, welche die geringsten optischen Verunreinigungen aufwiesen. Weiterhin war entscheidend, bis zu welcher Konzentration diese Ionischen Flüssigkeiten eingesetzt werden konnten, um spektroskopische Messverfahren durchzuführen.

Um die Reinheit mittels UV/VIS-Spektroskopie zu bestimmen, wurden wässrige Lösungen der Ionischen Flüssigkeiten in verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Für bei Raumtemperatur flüssige Stoffe wurde in einigen Fällen auch ein Spektrum der unverdünnten Substanz aufgenommen. Die Verdünnungen wurden mit ddH<sub>2</sub>O angefertigt. Je nach Löslichkeit wurden 85 %-ige Stammlösungen (w/w) angefertigt, welche durch weitere Verdünnungsschritte bis auf eine Konzentration von 1 % (w/w) verdünnt und gemessen wurden. Am Ultrospec 4000 UV/VIS-Spektrometer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden Spektren von 240-600 nm bei Raumtemperatur aufgenommen. Als Referenz diente jeweils ein Spektrum mit ddH<sub>2</sub>O. Es wurden Küvetten aus Quarzglas (Hellma Halbmikro 104 QS, 10 × 4 mm) verwendet.

### 2.2.5.2. Fluoreszenzspektroskopie

Der Prozess der Fluoreszenz beruht auf einer emittierten Strahlung, ausgelöst durch das Einwirken von Licht einer bestimmten Wellenlänge auf eine fluorophore Verbindung. Durch die Bestrahlung werden Elektronen in höhere Energieniveaus ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_{n+1}$ ) promoviert. Bei der Deaktivierung dieser angeregten Energiezustände kann es zur Aussendung von Photonen kommen, welches im Allgemeinen Lumineszenz genannt wird. Die Fluoreszenz ist eine Art der Lichtemission die hier entstehen kann, in den meisten Fällen beim Übergang der Elektronen vom ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ) in den elektronischen Grundzustand ( $S_0$ ).

Bei der Anregung können verschiedene elektronische Niveaus und innerhalb dieser verschiedene Schwingungs- und Rotationsniveaus besetzt werden. Durch Relaxation kann ein strahlungsloser Übergang in Form von Wärmeabgabe in den jeweiligen Grundzustand des entsprechenden Elektronenniveaus erfolgen, wie im Jablonski-Diagramm (siehe **Abbildung 2.1**) dargestellt ist. Der Übergang von einem energetisch höheren zu einem niedrigeren Elektronenniveau kann auch strahlungslos durch *internal conversion* erfolgen. Dies sind Übergänge vom niedrigsten Schwingungszustand ( $V_0$ ) zu einem höheren Schwingungsniveau des darunterliegenden Elektronenniveaus. Ein weiterer strahlungsfreier Deaktivierungsprozess ist das sogenannte *intersystem crossing*. Hierbei entsteht durch Spinumkehr aus dem Singulett-Zustand (S) ein Triplett-Zustand (T). Aus dem  $T_1$ -Zustand kann der elektronische Grundzustand durch Relaxationsvorgänge strahlungslos oder unter Aussendung von Licht, der Phosphoreszenz, erreicht werden. Die Summe aller Deaktivierungsprozesse wie Lumineszenz, *internal conversion* und *intersystem crossing* haben einen Einfluss auf die Lebensdauer des  $S_1$ -Zustands. Durch die Relaxationsprozesse zu niedrigeren Schwingungsniveaus ( $V_{n+1} \rightarrow V_0$ ) im angeregten Elektronenzustand ( $S_1$ ) kommt es zu Energieverlusten, so dass das emittierte Licht, die Fluoreszenz, stets energieärmer beziehungsweise langwelliger als das eingestrahle anregende Licht ist (STOKES-Regel). Die Fluoreszenzeigenschaften können auch noch zusätzlich durch die Umgebung der Fluorophore und durch Lösungsmittel beeinflusst werden. Stark polarisierte Lösungsmittel stabilisieren den angeregten Zustand, was eine energetische Absenkung des angeregten Zustands bewirkt. Dieser Effekt wird als Lösungsmittelrelaxation bezeichnet und hat eine *Bathochromie* (Rotverschiebung) zur Folge.

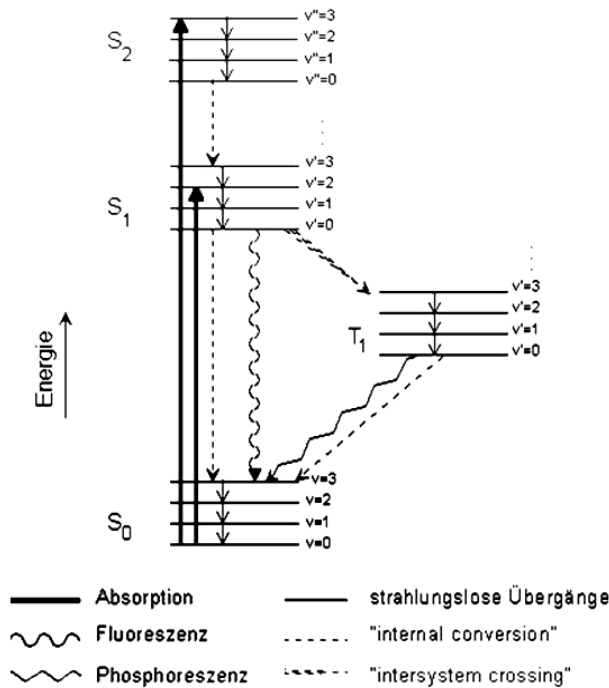


Abbildung 2.1: Vereinfachte Darstellung eines JABLONSKI-Diagramms.

Bei einem Wechsel, der den Fluorophor von einer polaren in eine unpolare Umgebung überführt, ist der gegenteilige Effekt, die *Hypsochromie* (Blauverschiebung) zu beobachten. Befinden sich in der Lösung noch andere Substanzen, so können diese durch inaktivierende Stöße eine Energieabgabe verursachen. Bei dieser Form der Fluoreszenz-Löschung unterscheidet man *dynamisches* und *statisches Quenching*. Bei diesen Prozessen wird die Absorption selbst nicht beeinflusst, sondern die Energie des angeregten Zustandes entweder durch Kollisionsprozesse (*dynamisches Quenching*) oder durch Komplexbildung (*statisches Quenching*) strahlungslos auf die Fluoreszenz-Löscher übertragen. Hierbei ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzabnahme und steigender Konzentrationen der *Quencher*. Eine weitere Abhängigkeit ergibt sich aus der Konzentration des Fluorophors selbst. Bei teilweiser Überlappung von Anregungs- und Emissionsspektrum kommt es bei zunehmender Fluorophorkonzentration zu Reabsorptionsprozessen, dem sogenannten *inner filter effect*. Zu hohe Konzentrationen üben einen störenden Einfluss auf die quantitative Fluoreszenzmessung aus und die Fluoreszenzintensität nimmt ab. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit den linearen Konzentrationsbereich zu ermitteln, bei dem dieser Effekt nicht auftritt, um eine quantitative Bestimmung vornehmen zu können. Eine weitere Einflussgröße ist die Temperatur. Durch Zunahme dieser kommt es vermehrt zu deaktivierenden Kollisionsprozessen, verursacht durch eine erhöhte Mobilität der Moleküle. Dies ist mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität bei steigender Temperatur verbunden.

### 2.2.5.2.1. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an EGFP

Die spektralen Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren und des EGFP-spezifischen Chromophors sind stark von deren Umgebung und Lösungsmitteln beeinflusst. Diese Wechselwirkungen werden wesentlich von der Struktur des Proteins bestimmt. Die Wechselwirkung der aromatischen Aminosäureseitenketten und des Chromophors untereinander beziehungsweise mit Lösungsmitteln prägt deren Absorptionseigenschaften. Daraus resultierend ändern sich auch die Fluoreszenzeigenschaften und können dadurch zu Untersuchungen von Strukturänderungen an Proteinen herangezogen werden. Die für diese Strukturuntersuchungen am häufigsten verwendeten Wellenlängen ( $\lambda$ ) sind 280 nm ( $\lambda_{280}$ ) und 295 nm ( $\lambda_{295}$ ). Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm werden die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren angeregt, bei 295 nm spezifisch die des Tryptophans. Im nativen Proteinzustand befinden sich diese Aminosäuren vermehrt in Inneren des Proteins. Beim Wechsel dieser Aromaten vom Inneren des Proteins, aus hydrophober Umgebung, in eine dem Lösungsmittel exponierte Umgebung, kann es zu Intensitätsänderungen, Wellenlängenverschiebungen und Peakverbreiterungen der Fluoreszenz kommen. Dies kann auch durch den Einfluss chaotroper Salze, durch Temperaturerhöhung und Veränderung des pH-Werts verursacht werden.

### 2.2.5.2.2. Fluoreszenzspektren

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden am Fluoreszenzspektrometer Fluoromax 3 (*Isa Instrument, USA*) durchgeführt. Die gerätespezifischen Einstellungen für die Spaltbreite der Anregung und der Emission waren 2 nm beziehungsweise 5 nm. Bei der Aufnahme von Emissionsspektren wurde bei konstanter Wellenlänge eingestrahlt, schrittweise in 1 nm-Abständen bei einer Integrationszeit von 0,5 s detektiert und im S/R Modus (Signal-/Referenz-Modus) gemessen. Der Wellenlängenbereich, in dem die Fluoreszenz detektiert wurde, war von der jeweiligen Anregungswellenlänge abhängig (siehe **Tabelle 2.13**). Für die Aufnahme von Emissionsspektren wurden Küvetten aus Quarzglas (*Hellma Makro 101 QS, 10 × 10 mm; Hellma Halbmikro 104F QS, 10 × 4 mm, Hellma Halbmikro 114F QS, 10 × 4 mm*) verwendet.

**Tabelle 2.13:** Übersicht der detektierten spektralen Bereiche der Emission bei entsprechender Anregungswellenlänge.

Anregungswellenlänge	Emissionsspektrum
$\lambda_{\text{exc.}}$ 280 nm	$\lambda_{\text{em.}}$ 290 nm – 400 nm
$\lambda_{\text{exc.}}$ 295 nm	$\lambda_{\text{em.}}$ 305 nm – 400 nm
$\lambda_{\text{exc.}}$ 490 nm	$\lambda_{\text{em.}}$ 495 nm – 600 nm

Für die meisten Untersuchungen lag das EGFP in einem Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0) vor. Je nach Verdünnung der Proben waren verschiedenen Konzentrationen an Ionischen Flüssigkeiten, chaotroper Salze wie GuHCl oder Mischungsverhältnisse beider vorhanden. Bei der pH-Stabilitätsmessung wurde ein Mischpuffer (10 mM Borsäure, 10 mM Citronensäure, 10 mM K-Phosphat, 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 3,0 – 12,5; siehe 2.1.8.4.) verwendet. Die Messungen erfolgten zumeist bei einer Temperatur von 30 °C und einer EGFP-Konzentration zwischen 5 µg/ml und 50 µg/ml. Als Referenz wurden die Emissionsspektren der entsprechenden Reaktionspuffer benutzt und gegen das Floreszenzspektrum der Proteinprobe korrigiert.

### 2.2.5.2.3. Kinetische Untersuchungen mittels Fluoreszenz

Bei den kinetischen Fluoreszenzmessungen wurden die strukturelle Integrität des EGFP und deren Beeinflussung durch verschiedene Substanzen untersucht. Hierbei wurden die Renaturierung und die Denaturierung des Proteins in Gegenwart chaotroper Salze wie GuHCl und Ionischer Flüssigkeiten betrachtet und kinetische Parameter des Reaktionsverlaufs bestimmt, sowie die Intensitätsänderungen anhand der spezifischen EGFP-Fluoreszenz verfolgt. Die durch den zentralen Chromophor hervorgerufene Fluoreszenzeigenschaft kann nur im gefalteten Proteinzustand detektiert werden und geht bei Entfaltung des Proteins verloren (Fukuda, et al., 2000). Das Maximum der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm wurde bei 510 nm detektiert. Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden am Fluoreszenzspektrometer Fluoromax 3 (Isa Instrument, USA) durchgeführt. Die gerätespezifischen Einstellungen für die Spaltbreite der Anregung und der Emission waren 2 nm beziehungsweise 5 nm. Bei den kinetischen Betrachtungen in einem Zeitraum von Minuten wurde jeweils alle 1 s und einer Integrationszeit von 0,5 s gemessen. Bei Kinetiken über diesen Zeitraum hinaus wurde die Emission im Abstand von 10 s und einer Integrationszeit von 1 s detektiert. Hierbei wurde eine Einstellung zum automatischen Öffnen des *shutter* gewählt, um einer übermäßigen Bestrahlung des Chromophors entgegenzuwirken und das



*photobleaching* zu minimieren. Hier wurde unter gleichmäßigem Rühren in Quarzglasküvetten (*Hellma Makro 101 QS*,  $10 \times 10$  mm) gemessen. Bei Kinetiken über einen Zeitraum mehrerer Stunden wurden verschließbare Küvetten benutzt (*Hellma Makro 111 QS*,  $10 \times 10$  mm). Es wurde im S/R-Modus bei konstanter Temperatur von  $30$  °C gemessen. Das EGFP lag in einem Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0) vor. Je nach Verdünnung der Proben lagen verschiedene Konzentrationen an Ionischen Flüssigkeiten (0 M – 5,6 M), GuHCl (0 M – 5,5 M) oder ein Verhältnis beider vor. Die Proteinkonzentration wurde auf  $5$  µg/ml oder  $10$  µg/ml für Entfaltung eingestellt. Für die Rückfaltung aus dem GuHCl-induziert denaturierten Zustand lag eine Proteinkonzentration von  $20$  µg/ml und aus dem HMIM Cl-induziert denaturierten Zustand eine EGFP-Konzentration von  $5$  µg/ml vor. Die einphasigen Entfaltungskinetiken wurden nach **Gleichung 2.8** und die dreiphasigen Rückfaltungskinetiken nach **Gleichung 2.13** angepasst und die kinetischen Parameter bestimmt.

#### 2.2.5.2.4. Langzeitkinetiken der GuHCl induzierten Denaturierung

Um kinetische Parameter der chemisch induzierten Denaturierung auch in Gegenwart geringer Konzentrationen an GuHCl zu ermitteln, wurden Endpunktanalysen durchgeführt. Mit 8 Messpunkten, verteilt über einen Zeitraum von 51 Tagen, wurde die Entfaltung fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. Jede der 27 zu messenden Konzentrationen zwischen 0 M und 6 M GuHCl (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 8,0) wurde mit bis zu 8 Reaktionsansätzen parallel zu je 1,2 ml mit  $5$  µg/ml EGFP versetzt. Die Puffer und Stammlösungen wurden im Vorfeld entgast und die Zugabe des EGFP erfolgte unter stetigem  $N_2$ -Strom. Die Reaktionsansätze wurden bei  $30$  °C in einem Exsikkator mit Trockenmittel aufbewahrt. Zur Entnahme der Proben wurde der Exsikkator unter  $N_2$ -Zufuhr geöffnet. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden bei jeder GuHCl-Konzentration drei Fluoreszenzspektren (495 nm – 600 nm) des EGFP akkumuliert. Das Intensitätsmaximum der gemittelten Fluoreszenzspektren ( $\lambda_{exc}$ . 490 nm) wurde bei 510 nm ermittelt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Anpassung der Kurvenverläufe erfolgte nach **Gleichung 2.8**.

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden am Fluoreszenzspektrometer Fluoromax 3 (*Isa Instrument, USA*) durchgeführt. Die gerätespezifischen Einstellungen für die Spaltbreite der Anregung und der Emission waren 2 nm beziehungsweise 5 nm bei einer Integrationszeit von 0,5 s und 1 nm Abständen im S/R Modus. Gemessen wurde in *Hellma 104F QS*,  $10 \times 4$  mm Küvetten.

### 2.2.5.3. Zirkulardichroismus (CD-Spektroskopie)

Grundvoraussetzung für die CD-Spektroskopie ist, dass in dem zu untersuchenden Wellenlängenbereich die Probe absorbiert und Chiralität aufweist. Die Fähigkeit optisch aktiver Substanzen, die zwei zirkular polarisierten Komponenten (rechter und linker Umlaufsinn) des Lichts unterschiedlich stark zu absorbieren, lässt bei Proteinen Aussagen über deren Struktur zu. Die unterschiedliche Absorption der zwei Feldvektoren des Lichts beim Passieren chiraler Moleküle ist die Messgröße des Zirkulardichroismus und findet Ausdruck in der Elliptizität. Bei bekannter Proteinkonzentration kann die molare Elliptizität berechnet werden (siehe **Gleichung 2.5**).

**Gleichung 2.5:**

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta \times [MRW]}{10 \times c \times d} \times (\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1})$$

$\theta$	Elliptizität (mdeg)
$[\theta]_{MRW}$	<i>mean residue weight ellipticity</i> – mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure des Proteins (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )
$[MRW]$	mittlere Molmasse einer Aminosäure des Proteins (g mol <sup>-1</sup> )
$c$	Proteinkonzentration (mg/ml)
$d$	Länge des Lichtwegs in der Messzelle (cm)

Aussagen zu Anteilen verschiedener Sekundärstrukturelemente im Protein lassen sich im Fern-UV (180 nm – 250 nm) treffen. Hier spielen die Peptidbindungen des Proteinrückgrats und deren direkte Nachbarschaft zum asymmetrischen Kohlenstoffatom eine entscheidende Rolle. Die repetitive Anordnung von Strukturen kann optische Chromophore bilden und Grundlage für die Anwendung der CD-Spektroskopie sein. Hier lassen sich  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblätter und *random-coil* als Motive nennen. Die  $\alpha$ -helikalen Strukturelemente zeigen ein Bandenmaximum bei 190 nm und zwei ausgeprägte Minima bei 208 nm und 222 nm. Ein Minimum bei 215 nm, begleitet von einem Maximum bei 196 nm, ist hingegen charakteristisch für  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Unstrukturierte Proteine weisen meist negative Signale auf. Der Anteil an den jeweiligen Sekundärstrukturelementen im Protein kann unter Verwendung verschiedener Software abgeschätzt werden. Ebenfalls von Interesse ist die relative Veränderung der

Sekundärstruktur bei Denaturierungs- bzw. Renaturierungsuntersuchungen. Auch der Nah-UV-Bereich (250 nm – 350 nm) lässt Aussagen über die strukturelle Beschaffenheit des Proteins, die Tertiärstruktur, zu. Hier werden die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren und deren Anordnung zueinander und die Wechselwirkung mit der direkten räumlichen Umgebung innerhalb des Proteins betrachtet. In ungeordneten Strukturbereichen oder im entfalteten Proteinzustand sind die CD-Signale der Aromaten sehr klein, praktisch gleich Null. Im gefalteten Proteinzustand hingegen zeigen die aromatischen Aminosäuren ein spezifisches und für jedes Protein charakteristisches CD-Spektrum, den sogenannten *finger print*.

Das EGFP besitzt noch eine weitere absorbierende Gruppe, die sich für die CD-Spektroskopie eignet (das  $\pi$ -Elektronensystem des 4-(p-Hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on) den charakteristische Chromophor des EGFP. Hier ergeben sich CD-Signale im VIS-Bereich und lassen ebenfalls Rückschlüsse auf den Faltungszustand zu.

#### 2.2.5.3.1. Zirkulardichroismus im Fern-UV

Die Messungen wurden am Jasco J-810 Spektropolarimeter (*Jasco GmbH, Groß-Umstadt*) bei einer Temperatur von 30 °C unter Verwendung von Quarzglasküvetten der Schichtdicke 0,1 mm (*Hellma 106 QS, Hellma, Müllheim*) durchgeführt. Bei einer *scan*-Geschwindigkeit von 20 nm min<sup>-1</sup> und einer Signalintegrationszeit von 2 s (Bandbreite 1 nm, Auflösung 0,1 nm) erfolgte die Aufnahme des Spektrums von 250 nm bis 190 nm. Die Spektren wurden 16 bzw. 20-fach akkumuliert. Das CD-Signal der unter gleichen Bedingungen gemessenen Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 ± 6 M GuHCl) wurde vom CD-Signal der Proteinproben abgezogen. Die daraus resultierende Elliptizität wurde in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure  $[\Theta]_{MRW}$  umgerechnet (siehe **Gleichung 2.5**). Die Proteinkonzentration lag bei 1,03 mg/ml.

#### 2.2.5.3.2. Zirkulardichroismus im Nah-UV

Die Messungen wurden am Jasco J-810 Spektropolarimeter (*Jasco GmbH, Groß-Umstadt*) bei einer Temperatur von 30 °C unter Verwendung von Quarzglasküvetten der Schichtdicke 5 mm (*Makro QS 10 × 5 mm, Hellma, Müllheim*) durchgeführt. Das Spektrum wurde von 350 nm bis 250 nm mit einer *scan*-Geschwindigkeit von 100 nm min<sup>-1</sup> (Signalintegrationszeit 2 s, Bandbreite 1 nm, Auflösung 1 nm) aufgenommen und 20-fach akkumuliert. Die Proteinspektren wurden mit dem entsprechenden Puffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM

EDTA, pH 8,0  $\pm$  6 M GuHCl) korrigiert. Die gemessene Elliptizität wurde im Anschluss in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  umgerechnet (siehe **Gleichung 2.5**). Die Proteinkonzentration lag bei 0,5 mg/ml.

#### 2.2.5.3.3. Zirkulardichroismus im VIS

Die Messungen wurden am Jasco J-810 Spektropolarimeter (*Jasco GmbH, Groß-Umstadt*) bei einer Temperatur von 30 °C unter Verwendung von Quarzglasküvetten der Schichtdicke 5 mm (*Makro QS 10  $\times$  5 mm, Hellma, Müllheim*) durchgeführt. Die Spektren wurden von 600 nm bis 350 nm, mitunter auch in den Nah-UV-Bereich bis 250 nm aufgenommen. Die Geschwindigkeit des *scans* betrug 100 nm min<sup>-1</sup> und es wurden mindestens 20 Spektren akkumuliert. Die Signalintegrationszeit wurde auf 2 s, die Bandbreite auf 1 nm und die Auflösung auf 1 nm eingestellt. Die Proteinspektren wurden in Gegenwart von 6 M GuHCl und unterschiedlicher Konzentrationen von Ionischen Flüssigkeiten aufgenommen. Die jeweiligen Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0  $\pm$  6 M GuHCl bzw.  $\pm$  Ionische Flüssigkeit) dienten als Referenz und wurden gegen das CD-Spektrum der Proteinlösung korrigiert. Die gemessene Elliptizität wurde in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  umgerechnet (siehe **Gleichung 2.5**). Die Proteinkonzentration lag bei 0,5 mg/ml.

#### 2.2.5.3.4. Kinetiken der Änderung des Zirkulardichroismus im Nah-UV

Messungen der Elliptizität bei konstanter Wellenlänge wurden am Jasco J-810 Spektropolarimeter (*Jasco GmbH, Groß-Umstadt*) bei einer Temperatur von 30 °C unter Verwendung von verschleißbaren Quarzglasküvetten der Schichtdicke 5 mm (*Makro QS 10  $\times$  5 mm, Hellma, Müllheim*) durchgeführt. Der zeitliche Verlauf der chemisch induzierten Denaturierung in Gegenwart verschiedener Ionischer Flüssigkeiten in unterschiedlichen Konzentrationen und GuHCl wurde bei einer Wellenlänge von 278 nm detektiert. In Abständen von 10 s mit einer Integrationszeit von 8 s unter Verwendung eines *shutters* (zur Minimierung des *photobleaching*) wurde der zeitliche Verlauf der Reaktion verfolgt. Die Kinetiken wurden normiert, da an zwei Spektropolarimetern (baugleich) mit unterschiedlichen Signalintensitäten gemessen wurde. Im Anschluss erfolgte nach Kurvenanpassung mit **Gleichung 2.8** die Bestimmung der kinetischen Parameter. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 mg/ml. Der verwendete Puffer war 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 zuzüglich der entsprechenden Konzentration an GuHCl beziehungsweise Ionischer Flüssigkeit.

#### 2.2.5.4. Infrarotspektroskopie (IR)

Die Infrarot-Spektroskopie liefert Hinweise auf strukturelle Eigenschaften und lässt Aussagen zur Identifizierung von Proteinen und ihren Zuständen zu. Es handelt sich hierbei um eine Absorptionsmethode, welche zur Anregung von Molekülschwingungen führt. Die Absorptionsbanden werden durch intramolekulare und intermolekulare Schwingungen erzeugt. Der relevante spektrale Bereich für Untersuchungen an Proteinen liegt bei einer Wellenzahl ( $\tilde{\nu}$ ) zwischen  $4000\text{ cm}^{-1}$  und  $400\text{ cm}^{-1}$ .

Eine weitere Voraussetzung für eine Aktivität im Infrarot-Bereich ist die Änderung des Dipolmoments durch die Anregung. Man unterscheidet zwei Arten von Schwingungen, die symmetrischen und asymmetrischen Schwingungen, die zeigen, ob die Molekülsymmetrie erhalten bleibt oder nicht. Hierbei lassen sich zusätzlich Unterscheidungen zwischen Valenz- und Deformationsschwingungen treffen. Bei der Valenzschwingung ( $\nu$ ), auch als Streckschwingung bezeichnet, wird die Bindungslänge zwischen den Atomen geändert. Bei der Deformationsschwingung ( $\delta$ ) ändern sich die Bindungswinkel, deshalb wird sie auch Beugungsschwingung genannt. Somit kann eine Einteilung in symmetrische und asymmetrische Valenzschwingung ( $\nu_s$  und  $\nu_{as}$ ) und Deformationsschwingung ( $\delta_a$  und  $\delta_{as}$ ) erfolgen.

Für Proteine im besonderen Maße interessant sind drei Absorptionsbanden. Diese betreffen die Peptidbindung und deren Wechselwirkung in Strukturelementen. Die Amid A-Bande bei einer Wellenzahl um  $3300\text{ cm}^{-1}$  ist Ausdruck der N—H-Valenzschwingung, die Amid I-Bande bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  charakterisiert hauptsächlich die C=O-Streckschwingung und die Amid II-Bande bei  $1550\text{ cm}^{-1}$  hauptsächlich die N—H-Beugeschwingung. Diese Atombindungen der Peptidbindung gehen auch untereinander Wechselwirkungen ein und beeinflussen sich in Sekundärstrukturelementen unterschiedlich stark. Die C=O-Bindung ist in der Lage Wasserstoffbrücken zu bilden. Je nach Strukturelement in unterschiedlicher Bindungsstärke ausgeprägt, unterliegt sie somit besonders starken Veränderungen. Hier kommt es zur Verschiebung der Amid I-Bande je nach vorliegender Sekundärstruktur. Bei  $\alpha$ -helikalen Strukturen ergeben sich Banden bei  $1655\text{ cm}^{-1}$ , bei  $\beta$ -Strängen im Bereich um  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Ungeordnete Strukturen wie *random coil* zeigen Absorptionsbanden bei  $1645\text{ cm}^{-1}$ , und bei aggregierten  $\beta$ -Strängen kommt es zu einer Aufspaltung der Wellenzahlen zu  $1618\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1682\text{ cm}^{-1}$  (Goormaghtigh et al., 1994).

#### 2.2.5.4.1. IR-spektroskopische Untersuchungen

Die IR-spektroskopischen Untersuchungen wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Kerth und technischer Unterstützung von Frau Ingrid Schaller am Institut für Physikalische Chemie der MLU Halle-Wittenberg (*Halle / Saale*) durchgeführt. Es wurden Spektren von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl in wässrigen und deuterierten Puffersystemen aufgenommen. Verglichen wurden die IR-Signale im zeitlichen Verlauf und bei unterschiedlichen Temperaturen.

IR-Messungen wurden an einem IR-Spektrometer Vector 22 mit einem DTGS-Detektor (*Bruker, Karlsruhe*) durchgeführt. Die Proben wurden zwischen zwei BaF<sub>2</sub>-Fenster mit *spacer* unterschiedlicher Schichtdicken von 6 µm (in H<sub>2</sub>O – Systemen) bis 56 µm (in D<sub>2</sub>O – Systemen) gefüllt. Der Probenraum wurde kontinuierlich mit getrockneter Luft gespült. Für ein Spektrum wurden jeweils 32 *scans* bei einer spektralen Auflösung von 2 cm<sup>-1</sup> und einer Blackman-Harris-3-Term-Apodisierung mit Zerofill-Faktor 2 durchgeführt. Die Spektren wurden bei Wellenzahlen von 4000 cm<sup>-1</sup> bis 400 cm<sup>-1</sup> aufgenommen, nähere Betrachtungen lagen im Bereich der Amid I-Bande bei einer Wellenzahl zwischen 1700 cm<sup>-1</sup> und 1600 cm<sup>-1</sup>. Die Messungen wurden in einem D<sub>2</sub>O-Tris-Puffersystem (50 mM Tris-DCI, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pD 8,0) mit deuteriertem EGFP durchgeführt (siehe 2.2.3.5.), da die Deformationsschwingung des H<sub>2</sub>O die Amid I-Bande überdeckt. Gemessen wurde bei einer Temperatur von 30 °C. Die Proteinkonzentration wurde auf 20 mg/ml eingestellt. Die IR-Spektren wurden unter nativen Bedingungen und in Gegenwart von deuteriertem Guanidinhydrochlorid (GuDCI) und Ionischen Flüssigkeiten angefertigt. Hier wurde der Einfluss dieser Additive auf das EGFP im zeitlichen Verlauf von Stunden bis 5 Tage untersucht. Es wurden Zuordnungen zu Sekundärstrukturelementen vorgenommen und deren Veränderung verfolgt.

#### 2.2.5.5. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Bei der Dynamischen Lichtstreuung kann der Oligomergrad von Proteinen in Lösungen bestimmt werden. Es handelt sich hier um eine zeitaufgelöste Messung. Das Streulicht fluktuiert in seiner Intensität beim Auftreffen des monochromatischen Lichtstrahls auf die Partikel. Diese Fluktuation ist mit veränderbaren Abständen der Partikel in der Lösung, der Diffusion, erklärbar und korreliert mit ihr. Mit der Dynamischen Lichtstreuung können Aussagen zum Diffusionskoeffizient und dem hydrodynamischen Radius getroffen werden. Die Auswertung

der in dieser Arbeit durchgeführten DLS-Messungen mit EGFP in HMIM Cl wurde mit der Viskosität einer 6%igen Ethylenglycol-Lösung durchgeführt. Für die Berechnung korrekter hydrodynamischer Radien wird die Viskosität des Lösungsmittels benötigt. Dieser Wert war zum Zeitpunkt der durchgeführten Messungen für HMIM Cl jedoch nicht bekannt. Die DLS-Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Dierk Roessner (*Wyatt Technology Europe GmbH*) durchgeführt. In den zu messenden Proben lag das EGFP in Gegenwart von 3 M HMIM Cl (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml beziehungsweise 1,95 mg/ml vor. Die Inkubationszeit des EGFP betrug bei der Probe mit 1 mg/ml circa 2 Tage und bei der der Probe mit 1,95 mg/ml 1 Woche. Für die Bestimmung des hydrodynamischen Radius wurde ein DynaPro (*Wyatt Technology, USA*) verwendet. Die DLS-Messungen wurden in einer Küvette mit jeweils 100  $\mu$ l Probenvolumen durchgeführt. Die höher konzentrierte Probe wurde nach 15-minütiger Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge erneut unter gleichen Bedingungen gemessen.

### **2.2.5.6. Kernresonanzspektroskopie (NMR)**

Die Untersuchungen an EGFP mittels NMR-spektroskopischer Methoden erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Physik der MLU Halle-Wittenberg (*Halle / Saale*), Abteilung Biophysik. Hierbei oblagen Herrn Dr. Ulrich Weininger die kompletten gerätespezifischen Einstellungen, Bedienung und Abstimmung des NMR-Spektrometers. Die Zusammenarbeit betraf darüber hinaus auch die Auswertung der NMR-Messsignale.

#### **2.2.5.6.1. 1D-NMR-Spektren**

Die zu untersuchenden Proben wurden an einem Bruker Avance II 600 NMR-Spektrometer (*Bruker, Rheinstetten*) gemessen. Um eine Verwendung der Ionische Flüssigkeiten für die NMR-Spektroskopie zu ermöglichen, wurden im Vorfeld verschiedene Ionische Flüssigkeiten getestet. Die extrem starken  $^1\text{H}$ -Signale der Verbindungen wurden durch Vorsättigung (frequenzspezifisches Einstrahlen) mit einer Abfolge entsprechender Pulsfrequenzen in ihrer Signalintensität minimiert. Alle Messungen wurden in NMR-Röhrchen NewEra NE-UP-5 (*Analysco Ltd, UK*) bei 30 °C durchgeführt. Das Probenvolumen von 540  $\mu$ l wurde 1:10 mit  $\text{D}_2\text{O}$  verdünnt. Das EGFP lag final in 50 mM Na-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 8,0 mit einer Konzentration von 0,45 mM (12 mg/ml) vor. Für Spektren unter denaturierten Bedingungen enthielt der Puffer 6 M GuHCl. EGFP wurde auch in hochkonzentrierten Lösungen Ionischer

Flüssigkeiten gemessen. Die NMR-Signale der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren konnten anhand der chemischen Verschiebung den Protonensignalen verschiedener Molekülgruppen zugeordnet werden. Daraus ließen sich allgemein gültige Aussagen über den Faltungszustand des EGFP ableiten.

#### 2.2.5.6.2. 2D-NMR-Spektren

Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren wurden an einem Bruker Avance II 600 NMR-Spektrometer (*Bruker, Rheinstetten*) bei 30 °C aufgenommen. Das  $^{15}\text{N}$ -angereicherte EGFP (siehe 2.2.2.5.) wurde bei einer Konzentration von 0,45 mM (12 mg/ml) in einem Phosphatpuffer (50 mM Na-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 8,0) unter nativen Bedingungen und in Gegenwart von GuHCl (4,4 M und 6,0 M) beziehungsweise unterschiedlichen Konzentrationen (1 M bis 3 M) von 1-Hexyl-3-methylimidazoliumchlorid (HMIM Cl) gemessen. Die Proteinlösung von 600 µl enthielt 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ . In diesen Experimenten wurde mittels Gradienten (gezielte lineare Instabilitäten, also De- und Rephasierungen im Magnetfeld in z-Richtung) auf  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Signale selektiert und dadurch andere Signale (ohne  $^{15}\text{N}$ ), die zum Beispiel von GuHCl oder HMIM Cl hervorgerufen werden, unterdrückt. Dies ermöglichte die spezifische Untersuchung von EGFP auf Basis einzelner Aminosäuren. Um eine größere Signalschärfe zu erhalten, wurden die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren mehrfach akkumuliert. Anhand von Vergleichsdaten aus der Literatur ([Khan et al., 2003](#)) konnte eine Vielzahl gemessener Signale den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden. Diese zugeordneten NMR-Signale wurden mit denen in GuHCl oder HMIM Cl gemessenen verglichen und deren Veränderung im zeitlichen Verlauf verfolgt.

#### 2.2.5.6.3. Kinetische Auswertung von $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren

Die Veränderung einiger NMR-Signale des  $^{15}\text{N}$ -markierten EGFP in Gegenwart von GuHCl oder HMIM Cl wurde in einem Zeitraum mehrerer Tage verfolgt. Dazu wurden die jeweils über 40 min akkumulierten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren in ihrer zeitlichen Abfolge miteinander verglichen. Einzelne Signale konnten isoliert betrachtet und in ihren Intensitätsänderungen kinetisch verfolgt werden. Der Intensitätsverlauf (Zu- oder Abnahme) einzelner Signale wurde gegen die Zeit aufgetragen und die kinetischen Parameter der Reaktion bestimmt (siehe **Gleichung 2.8** und **Gleichung 2.9**).



### 2.2.5.7. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle Enzymologie der Proteinfaltung, *Halle / Saale*) angefertigt. Die Bestimmung der Molmassen des gereinigten und entsalzten EGFP (siehe 2.2.4.4.) wurden mittels MALDI-TOF (REFLEX Spektrometer; *Bruker-Daltonik GmbH, Bremen*) beziehungsweise ESI-Massenspektrometer (Esquire-LC Ionenfallen-Massenspektrometer; *Bruker-Daltonik GmbH, Bremen*) durchgeführt. Zur Entsalzung von Proteinproben wurden auch ZipTip<sub>C4</sub> (*Millipore, Schwabach*) verwendet.

### 2.2.5.8. Refraktometrische Bestimmung der GuHCl-Konzentration

Konzentrationen von hygroskopischen Substanzen wie GuHCl lassen sich über die Einwaage nur sehr ungenau bestimmen. Eine genaue Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung solcher Substanzen in Lösung ist über die Bestimmung der Brechzahl ( $n$ ) mittels Refraktometer realisierbar. Mit dem Refraktometer kann der Grenzwinkel einer nur sehr dünnen Flüssigkeitsschicht zwischen zwei Glasprismen präzise bestimmt werden und somit auch die Brechzahl. Um die genaue Konzentration von hochmolekularen GuHCl-Stammlösungen zu bestimmen, wurden diese und die Pufferlösung nacheinander gemessen. Aus der Dreifachbestimmung wurde jeweils der Mittelwert gebildet und der Differenzbetrag (siehe **Gleichung 2.6**) beider Lösungen bestimmt. Mit der **Gleichung 2.7** wurde die genaue Konzentration für GuHCl berechnet.

**Gleichung 2.6:**

$$\Delta n = n_{\text{probe}} - n_{\text{puffer}}$$

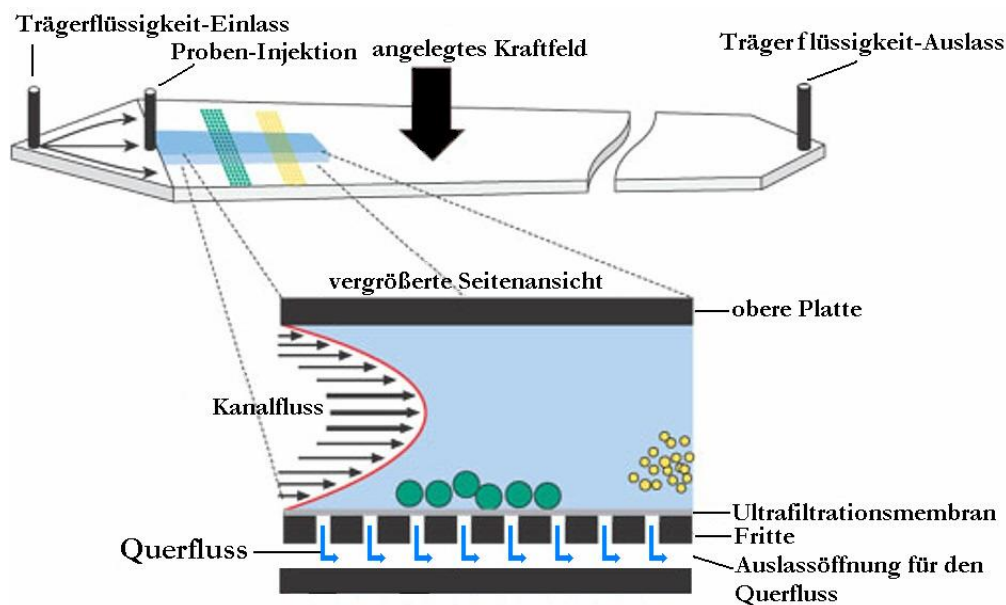
**Gleichung 2.7:**

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

### 2.2.6. Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (AF4)

Die asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung ist eine analytische Methode, mit deren Hilfe lösliche Gemische ihrer Größe nach aufgetrennt und analysiert werden können ([Wahlund et al., 1986](#)). Das analytische Einsatzspektrum erstreckt sich von großen Partikeln wie Polymeren und Viruspartikeln bis hin zu kleineren Proteinen, bei denen auch Aussagen über

den Oligomerstatus getroffen werden können. Mit einem sequenziell geschalteten Streulichtdetektor wird die mittlere Molmassenverteilung der einzelnen Fraktionen bestimmt. In einem länglichen Kanal mit einem Ein- und Auslass, begrenzt durch eine parallele Anordnung einer oberen undurchlässigen Wand und einer unteren durchlässigen Membran, kommt es zu einem konstanten Fluss von Trägerflüssigkeit durch diesen Kanal. Die separat in den Kanal injizierte zu analysierende Probe bildet unter diesen Bedingungen ein parabolisches Flussprofil aus, in dessen Mitte die höchste Fließgeschwindigkeit entlang der Fließrichtung vorliegt (siehe **Abbildung 2.2**). Durch einen zweiten Fließstrom mit Trägerflüssigkeit quer zur Flussrichtung kommt es zur Akkumulation und Austritt der Probe durch die Membran in Richtung des angelegten Querflusses. Durch die unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeit verschieden großer Partikel in diesem Kraftfeld kommt es zu einer Auftrennung der Partikel ihrer Größe nach. Kleinere Partikel mit der höheren Diffusionsgeschwindigkeit eluieren eher als größere. Die Auftrennung und Migration der Partikel geschieht an der Akkumulationswand, da hier die Unterschiede in der Fließgeschwindigkeit am größten sind.



**Abbildung 2.2:** Aufbau des Trennkanals und Trennprinzip der AF4.

Die Trägerflüssigkeit wird durch den Einlass in den Kanal gepumpt und verlässt diesen durch die Akkumulationswand und den Auslass. Die injizierte Probe wird durch das Anlegen eines Gegenflusses fokussiert. Durch den angelegten Querfluss kommt es zur Auftrennung der zu analysierenden Probe der Größe nach an der Akkumulationswand.

Quelle: <http://www.wyatt.com/solutions/hardware/Eclipse-AFFF.cfm>.

Der Ablauf einer AF4-Messung besteht aus Äquilibration, Fokussierung und Elution. Bei der AF4 gibt es mehrere Modifikationsmöglichkeiten, um eine Fraktionierung zu optimieren, wie die Erzeugung eines Gegenstroms (komprimiert und fokussiert die injizierte Probe), die

Variationen der Fließgeschwindigkeit des Flussfeldes und durch Querflussgradienten. Der *Void-Peak* bildet den Start der Trennung, hier eluieren große Partikel, welche stark in das parabolische Flussprofil hineinragen. Im Anschluss folgen der Größe nach die Partikel der zu analysierende Probe mit einer charakteristischen Retentionszeit.

Die AF4-Messungen mit nativem EGFP wurden an einem Eclipse 2 Separation System (*Wyatt Technology Europe, Dernbach*) mit einem in Serie geschalteten Streulichtdetektor (Mini Dawn Tristar; *Wyatt Technology, USA*) zur Bestimmung der Masse der Elutionsfraktionen durchgeführt. Die Trägerflüssigkeit (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) wurde filtriert (MWCO 0,1  $\mu\text{m}$ ). Bei einem Fluss der Trägerflüssigkeit von 1 ml pro Minute wurde die Probe über eine 100  $\mu\text{l}$  Probeschleife in den Trennkanal injiziert. Die Proteinkonzentration betrug 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Messungen mit EGFP in Ionischer Flüssigkeiten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Dierk Roessner (*Wyatt Technology Europe GmbH*) durchgeführt. Die zu analysierenden Proben mit einer Proteinkonzentration von 1,0 mg/ml beziehungsweise 1,95 mg/ml in Gegenwart von 3,0 M HMIM Cl wurden mit der mobilen Phase 1:50 (bei 1,0 mg/ml) oder 1:100 (bei 1,95 mg/ml) gemischt. Es wurden jeweils 800  $\mu\text{l}$  der verdünnten Lösungen injiziert und gemessen. Die mobile Phase (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) wurde ebenfalls über eine 0,1  $\mu\text{m}$  Membran filtriert.

### 2.2.7. Kinetische Analysen

Für die Bestimmung kinetischer Parameter der Faltung und Entfaltung wurde nach Überführung des nativen beziehungsweise denaturierten EGFP in die entsprechenden Reaktionspuffer die Änderung spektroskopischer Amplituden zeitabhängig verfolgt.

Reaktionen mit einem monophasischen Verlauf wurden mit Hilfe einfach exponentieller Funktionen 1. Ordnung (siehe **Gleichung 2.8** – Intensitätsabnahme, **Gleichung 2.9** – Intensitätszunahme) ausgewertet. Bei komplexeren Reaktionen mit bi- und triphasischem Verlauf wurden die Kurven mit doppelt exponentiellen (siehe **Gleichung 2.10** – Intensitätsabnahme, **Gleichung 2.11** – Intensitätszunahme) beziehungsweise dreifach exponentiellen Funktionen 1. Ordnung (siehe **Gleichung 2.12** – Intensitätsabnahme, **Gleichung 2.13** – Intensitätszunahme) angepasst. Die Amplitude im Gleichgewicht nach Abschluss der Reaktion entspricht  $A_0$ . Die Amplituden  $A_1$ ,  $A_2$  und  $A_3$  sowie die Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$ ,  $k_2$  und  $k_3$  können der entsprechenden ersten, zweiten oder dritten Phase bei mehrphasischen Kurvenverläufen zugeordnet werden.

Gleichung 2.8:

$$F = A_0 + A_1 \times e^{-k_1 \times t}$$

Gleichung 2.9:

$$F = A_0 + A_1 \times (1 - e^{-k_1 \times t})$$

Gleichung 2.10:

$$F = A_0 + A_1 \times e^{-k_1 \times t} + A_2 \times e^{-k_2 \times t}$$

Gleichung 2.11:

$$F = A_0 + A_1 \times (1 - e^{-k_1 \times t}) + A_2 \times (1 - e^{-k_2 \times t})$$

Gleichung 2.12:

$$F = A_0 + A_1 \times e^{-k_1 \times t} + A_2 \times e^{-k_2 \times t} + A_3 \times e^{-k_3 \times t}$$

Gleichung 2.13:

$$F = A_0 + A_1 \times (1 - e^{-k_1 \times t}) + A_2 \times (1 - e^{-k_2 \times t}) + A_3 \times (1 - e^{-k_3 \times t})$$

## 2.2.8. Statistik

Zur statistischen Absicherung der bestimmten Parameter erfolgten alle Messungen in der Regel in Mehrfachbestimmungen, die jeweils benannt sind. Die Auswertung der Daten, nach den in den entsprechenden Kapiteln genannten mathematischen Gleichungen, erfolgte mit der Software Sigma Plot 8.0, die statistische Parameter der Fits präsentierte. Diese sind in den Tabellen aufgeführt.

## 3. Ergebnisse

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete EGFP diente als Modellprotein, um den erst vor einigen Jahren entdeckten positiven Einfluss auf die Faltung von Proteinen durch Ionische Flüssigkeiten zu untersuchen und den bisherigen Kenntnisstand diesbezüglich zu erweitern. Der Einsatz dieser für diese Anwendung noch recht neuen und unbekannteren Verbindungen eröffnet für die Proteinchemie einen neuen Ansatzpunkt und gibt Raum für gezielte Anwendungen bei der Rückfaltung von Proteinen. Aufgrund der besonderen spektroskopischen Eigenschaften des Modellproteins konnten die Einflüsse der Ionischen Flüssigkeiten auf Proteine mittels unterschiedlicher spektroskopischer Messmethoden untersucht werden. Die stabilisierenden beziehungsweise destabilisierenden Eigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten auf EGFP wurden durch Analysen von Denaturierung, Renaturierung und Aggregation ermittelt.

### 3.1. Ionische Flüssigkeiten

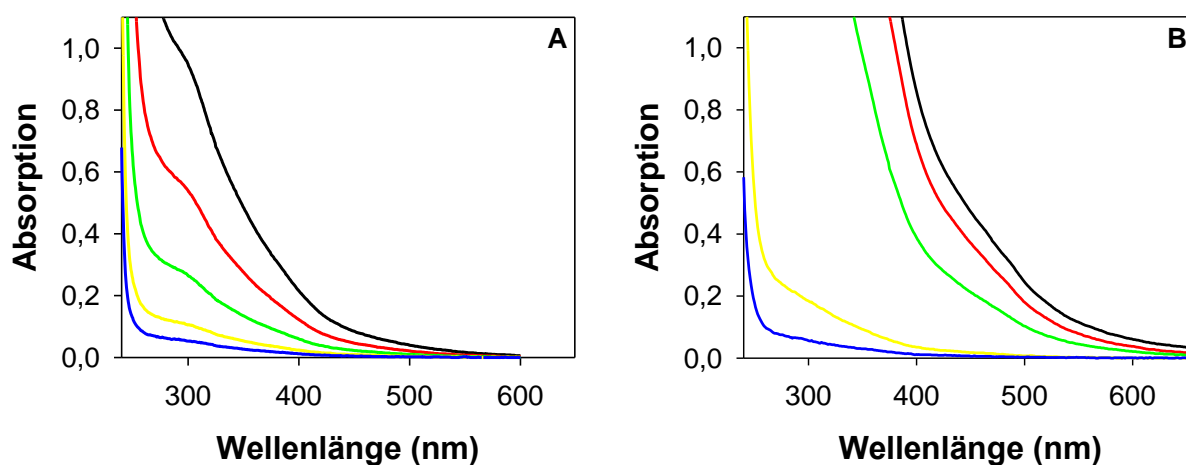
Bei den in dieser Arbeit verwendeten Ionischen Flüssigkeiten handelt es sich vorwiegend um heterozyklische aromatische Verbindungen. Die Kationen basieren vorrangig auf einer Imidazolgrundstruktur mit aliphatischen Substitutionen an den Heteroatomen (siehe **Tabelle 2.3** und Kapitel **7.6.**). Es wurden auch aliphatisch substituierte quartäre Amine eingesetzt. Die Anionen sind von unterschiedlichem anorganischem und organischem Ursprung.

#### 3.1.1. Spektroskopische Eigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten

Aufgrund des aromatischen Charakters der auf einer Imidazolgrundstruktur basierenden Ionischen Flüssigkeiten und der durch Verunreinigungen bedingten leicht gelb bis bräunliche Färbung der Verbindungen wurden im Vorfeld spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hiermit wurde die Eignung dieser Verbindungen für Strukturuntersuchungen an Proteinen im jeweils relevanten spektralen Bereich mittels Absorptions-, Fluoreszenz- und infrarotspektroskopischer Analysen geprüft. Grundvoraussetzung war hier, dass sich die spektroskopischen Signale der Ionischen Flüssigkeiten nicht zu stark mit denen des EGFP überschneiden und in ihrer Intensität nicht zu ausgeprägt sind, um zuverlässige spektroskopische Analysen mit EGFP zuzulassen.

### 3.1.1.1. Absorptionseigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten

Alle Ionischen Flüssigkeiten wurden vor deren Anwendung auf ihre absorbierenden Eigenschaften untersucht. Entscheidend war hier, dass diese Verbindungen in Lösung zumeist eine gelblich braune Färbung aufwiesen, die sich störend auf die spektroskopischen Untersuchungen an EGFP auswirken würde. Hierzu wurden wässrige Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen in einem Wellenlängenbereich von 240 nm bis 600 nm gemessen. Für die zwei am häufigsten verwendeten Ionischen Flüssigkeiten EMIM Cl (**A**) und HMIM Cl (**B**) sind in **Abbildung 3.1** die Absorptionsspektren dargestellt. Die Spektren gaben Aufschluss über die optische Reinheit der Substanzen. Die starke Absorption unterhalb von 250 nm ist intrinsisch und dem aromatischen Charakter der Ionischen Flüssigkeiten geschuldet. Trotz der chemisch gleichen Struktur der Kopfgruppe beider Verbindungen war der Unterschied in der Absorption im Bereich höherer Wellenlängen sehr deutlich ersichtlich. Die Absorptionsbanden oder Schultern im Spektrum oberhalb von 300 nm sind farbigen Verunreinigungen zuzuordnen und im Falle des HMIM Cl wesentlich intensiver, was letztlich den subjektiven Eindruck über die Reinheit der Verbindungen bestätigt.



**Abbildung 3.1:** Absorptionsspektren von Ionischen Flüssigkeiten.

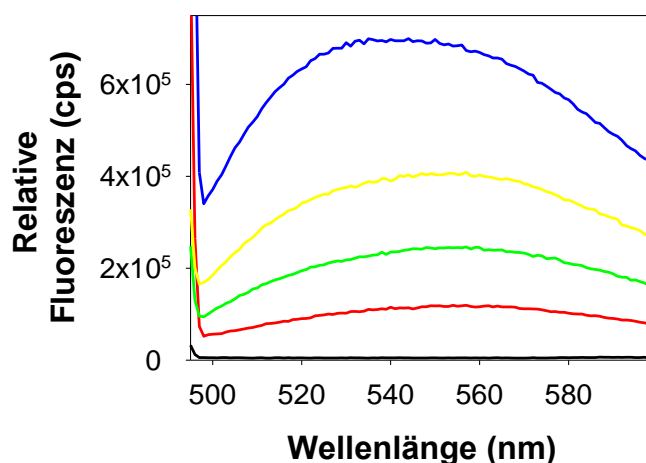
**A** zeigt die Absorptionsspektren von 1-Ethyl-3-methylimidazoliumchlorid (EMIM Cl) bei Konzentrationen (w/w) von (—) 85 %, (—) 50 %, (—) 25 %, (—) 10 %, (—) 5 %. In **B** sind Absorptionsspektren von (—) 100 %, (—) 85 %, (—) 50 %, (—) 5 %, (—) 1 % 1-Hexyl-3-methylimidazoliumchlorid (HMIM Cl) dargestellt. Die Ionischen Flüssigkeiten wurden in Wasser gelöst (20 °C) und in einem Wellenlängenbereich von 240 nm bis 600 nm (**A**) beziehungsweise von 240 nm bis 650 nm (**B**) bei einer optischen Weglänge von 10 mm gemessen.

Anhand der Spektren wurde über die mögliche Anwendung der einzelnen Ionischen Flüssigkeiten und die maximal einsetzbare Konzentration für spektroskopische Untersuchungen entschieden. Konzentrationen, bei denen die Absorption bei einer entsprechenden Wellenlänge größer 0,5 war, konnten für spektroskopische Untersuchungen mittels Zirkulardichroismus oder Fluoreszenzspektroskopie in diesem Wellenlängenbereich

nicht genutzt werden. Bei einer derart hohen Absorption der Ionischen Flüssigkeiten (IL) würde die Lichtintensität, mit der Chromophore angeregt beziehungsweise bestrahlt werden, zu stark reduziert, um repräsentative Messergebnisse zu erhalten. Ein weiterer negativer Effekt der hohen Eigenabsorptionen der Verbindungen ist, dass emittierte Strahlung reabsorbiert wird. Die Summe aus Löschprozessen und *inner-filter*-Effekt würde eine zuverlässige Analyse bei hohen Absorptionswerten zu stark beeinträchtigen.

### 3.1.1.2. Fluoreszenzeigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten

Zu den unter 3.1.1.1. beschriebenen Absorptionseigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten zeigten sich auch unterschiedlich stark ausgeprägte Fluoreszenzeigenschaften. Diese wurden durch den heterozyklischen Charakter der auf Imidazolium basierenden Ionischen Flüssigkeiten aber auch durch die optisch störenden Verunreinigungen hervorgerufen.



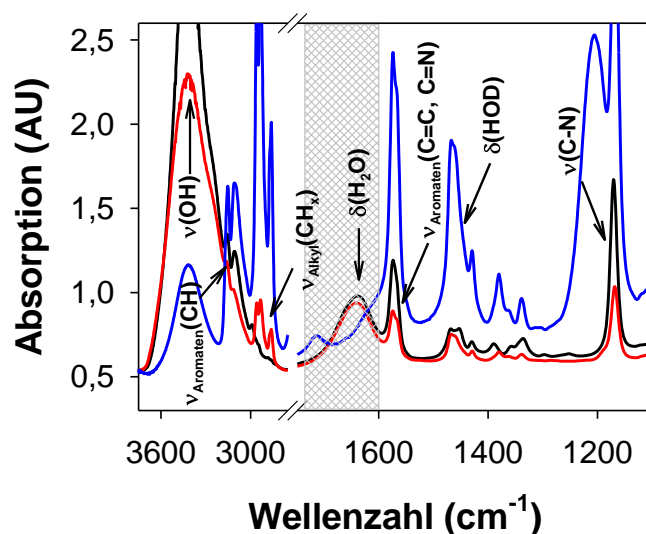
**Abbildung 3.2:** Fluoreszenzspektren der Ionischen Flüssigkeit HMIM Cl bei verschiedenen Konzentrationen. Die Ionische Flüssigkeit wurde in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 gelöst (—) 0 M HMIM Cl, (—) 1,0 M HMIM Cl (—) 2,0 M HMIM Cl, (—) 3,0 M HMIM Cl, (—) 4,0 M HMIM Cl. Bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm wurde das Spektrum von 495 nm bis 600 nm aufgenommen. Die Einstellungen für den Anregungsspalt waren 5,0 nm und 2,0 nm für den Emissionsspalt. Es wurde im S/R-Modus bei 30 °C und einer optischen Weglänge von 10 mm gemessen.

Fluoreszenzspektren der Ionischen Flüssigkeiten wurden in 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA bei einem pH-Wert von 8,0 bei verschiedenen Konzentrationen der IL aufgenommen. In **Abbildung 3.2** sind Fluoreszenzspektren des HMIM Cl in einem spektralen Bereich dargestellt, in dem spektroskopische Untersuchungen am spezifischen Chromophor des EGFP durchgeführt wurden. Bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm wurde die Fluoreszenz von 495 nm bis 600 nm detektiert. Die je nach Ionischer Flüssigkeit unterschiedlich stark ausgeprägten Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften können zu starken *quench-*

Effekten führen, wobei diese von der Konzentration der IL abhängig sind und mit zunehmender Konzentration steigen. Auch bei anderen Anregungswellenlängen konnte die Eigenfluoreszenz der Ionischen Flüssigkeiten gezeigt werden. Durch die Eigenabsorption der Ionischen Flüssigkeiten tritt bei hoher Konzentration ein *inner-filter*-Effekt auf. Bei fluoreszenzspektroskopischen Messungen an EGFP in Gegenwart von Ionischen Flüssigkeiten kommt es, bedingt durch das *quenchen* der Fluoreszenz und dem *inner-filter*-Effekt, konzentrationsabhängig zu einer starken Reduktion des Messsignals.

### 3.1.1.3. Eigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten im Infrarot

Im Vorfeld wurden für zwei Ionische Flüssigkeiten, mit denen infrarotspektroskopische Untersuchungen an EGFP durchgeführt wurden, IR-Spektren aufgenommen. Die Ionischen Flüssigkeiten EMIM Cl und HMIM Cl zeigten charakteristische Absorptionsbanden im Infrarotspektrum (siehe **Abbildung 3.3**). Charakteristisch für diese Verbindungen sind die Valenzschwingungen der Aromaten ( $\nu_{\text{Aromaten}}(\text{CH})$ ) im Bereich oberhalb der Wellenzahl ( $\tilde{\nu}$ ) von  $3000 \text{ cm}^{-1}$  und die Valenzschwingungen der gesättigten aliphatischen Substituenten ( $\nu_{\text{Alkyl}}(\text{CH}_x)$ ) zwischen  $3000 \text{ cm}^{-1}$  und  $2800 \text{ cm}^{-1}$ . Dieser Bereich wurde für die in Wasser aufgenommenen Spektren sehr stark von der Streckschwingung des Wassers ( $\nu(\text{OH})$ ) überlagert. Im Bereich der für Strukturuntersuchungen an Proteinen wichtigen Amid I-Bande (grau unterlegter Bereich in **Abbildung 3.3**) zeigte sich auch eine, durch die Deformationsschwingung des Wassers ( $\delta(\text{H}_2\text{O})$ ) hervorgerufene, starke Absorption.



**Abbildung 3.3:** Infrarotspektren von Ionischen Flüssigkeiten.

Die Ionischen Flüssigkeiten wurden in  $\text{H}_2\text{O}$  beziehungsweise in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst und bei entsprechenden Konzentrationen (—) 5,2 M EMIM Cl in  $\text{H}_2\text{O}$ , (—) 3,0 M HMIM Cl in  $\text{H}_2\text{O}$ , (—) 3,0 M HMIM Cl in  $\text{D}_2\text{O}$  in einem Wellenzahlbereich zwischen  $4000 \text{ cm}^{-1}$  und  $400 \text{ cm}^{-1}$  bei einer optischen Weglänge von  $56 \mu\text{m}$  bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  gemessen.



Ein in D<sub>2</sub>O aufgenommenes IR-Spektrum zeigte für HMIM Cl hingegen eine starke Reduktion der Absorption im Bereich der Amid I-Bande. Die ebenfalls sehr prominente Ringschwingung der Aromaten ( $\nu_{\text{Aromaten}}[\text{C}=\text{C}, \text{C}=\text{N}]$ ) lag außerhalb dieses Wellenzahlfensters und unterhalb von 1600 cm<sup>-1</sup>. Die gemessene IR-Absorption in diesem Bereich ließ somit für HMIM Cl eine Untersuchung zu Strukturelementen in Proteinen in einem D<sub>2</sub>O-System zu. Weitere deutlich ausgeprägte IR-Banden im Bereich von 1500 cm<sup>-1</sup> bis 1400 cm<sup>-1</sup> für die  $\delta(\text{HOD})$  und unterhalb von 1200 cm<sup>-1</sup> für die  $\nu(\text{C}-\text{N})$  beeinträchtigen diese Analysen aufgrund ihrer Bandenlage nicht.

## 3.2. Herstellung und Reinigung von EGFP

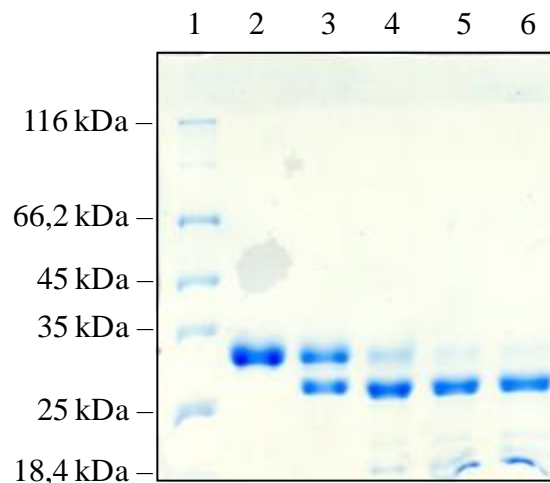
Das für diese Arbeit verwendete EGFP ist eine in Fluoreszenz und Expression für Säugerzellen optimierte Variante des *wt*-GFP (Cormack et al., 1996; Yang, 1996). Das Gen wurde über *primer* aus dem Vektor pEGFP-N1 (Clontech, USA) amplifiziert und in den pET-19b Vektor (Novagen, Bad Soden) überführt. Durch Klonierung wurde das Protein mit einem 10 Histidine langen *tag* (His<sub>10</sub>-*tag*) N-terminal fusioniert, um die Aufreinigung aus Primärmaterial zu erleichtern. Darüber hinaus wurde eine Spaltstelle für Enterokinase genutzt, um den fusionierten His<sub>10</sub>-*tag* nach erfolgter chromatographischer Aufreinigung wieder zu entfernen. Das Plasmid lag in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) vor und wurde zu Beginn dieser Arbeit freundlicherweise von Dr. Dirk Esser (Esser, 2000) zur Verfügung gestellt.

### 3.2.1. Heterologe Genexpression in *E. coli*

Die Produktion des EGFP wurde im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (Novagen, Bad Soden) durchgeführt. Das Expressionsprodukt wurde als Fusion mit N-terminalem His<sub>10</sub>-*tag* und einer 20 Aminosäuren umfassenden *linker*-Sequenz, die eine Enterokinaseschnittstelle beinhaltet, hergestellt (siehe 7.5. Aminosäuresequenz des EGFP). Die Produktion des EGFP in *E. coli* erfolgte nach Induktion der Expression bei 30 °C in löslicher Form. Die Biofeuchtmasse aus einer Schüttelkultur ergab ca. 8 g pro Liter Kulturmedium, die einer *batch*-Fermentation lag um den Faktor 5,6 höher und ergab 360 g Zellen. Das mit <sup>15</sup>N angereicherte EGFP (99 %) wurde in einer 6 Liter Schüttelkultur in M9-Minimalmedium hergestellt (siehe 2.2.2.5.). Es konnten 4,2 g Biofeuchtmasse pro Liter Kulturmedium bereitgestellt werden.

### 3.2.2. Reinigung und Prozessierung von EGFP

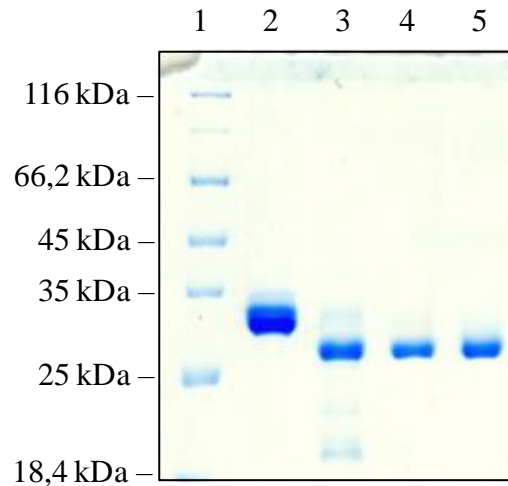
Die Proteinreinigung wurde für beide Proteine (EGFP und  $^{15}\text{N}$ -markiertes EGFP) nach dem gleichen Reinigungsprotokoll (siehe 2.2.4.) durchgeführt. Aufgrund der N-terminalen Fusion eines His<sub>10</sub>-tag wurde nach dem Zellaufschluss (siehe 2.2.2.6.) als erster Reinigungsschritt eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie (siehe 2.2.4.1.) angewandt. Bei einer Imidazolkonzentration von circa 140 mM eluierte das EGFP mit einer Reinheit von > 95 %. In einem nachgeschalteten Prozessierungsschritt (siehe 2.2.4.2.) mit Enterokinase wurde der N-terminale Fusions-tag proteolytisch abgespaltet. Die Prozessierungsreaktion wurde in einer Zeitreihe getestet und durch SDS-PAGE visualisiert. Nach etwa 2 Tagen war die enzymatische Spaltung abgeschlossen und kein Fusionsprodukt mehr detektierbar. Die Analyse der enzymatischen Abspaltung des N-terminalen His<sub>10</sub>-tag ist in **Abbildung 3.4** für das  $^{15}\text{N}$ -markierte EGFP gezeigt.



**Abbildung 3.4:** Analyse der Prozessierung des  $^{15}\text{N}$ -markierten EGFP durch Enterokinase bei 37 °C. Alle Proben wurden mit einem reduzierenden Probenpuffer behandelt und auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Färbung und Entfärbung erfolgte nach FAIRBANKS. (1) Proteinmarker, (2-6) zeigt den zeitlichen Verlauf der Prozessierung mit Enterokinase, (2) 0 h, (3) 17,5 h, (4) 30 h, (5) 41,5 h, (6) 66 h. Der verwendete Reaktionspuffer war 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0. Die Proteinkonzentration des His<sub>10</sub>-EGFP wurde auf 1 mg/ml eingestellt. Das Verhältnis His<sub>10</sub>-EGFP zur eingesetzten Menge an Enterokinase war 1 zu 400 (w/w).

Durch eine erneut durchgeführte Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie (siehe 2.2.4.1.) wurde das noch unprozessierte His<sub>10</sub>-EGFP vom EGFP (Durchlauf) getrennt. Der Durchlauf wurde im Anschluss einem finalen Reinigungsschritt durch Anionenaustauschchromatographie (siehe 2.2.4.3.) unterzogen. Das bei einer Eluentenkonzentration von 135 mM NaCl erhaltene EGFP zeigte eine Reinheit von mindestens 98 % in der SDS-PAGE. Das final gereinigte Produkt wurde gegen 50 mM Tris-HCl, 50 mM

NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 dialysiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die einzelnen Proteinreinigungsschritte für EGFP sind am Beispiel für die  $^{15}\text{N}$ -markierte Variante in **Abbildung 3.5** dargestellt. Zur Qualitätskontrolle des final gereinigten Proteins wurde eine analytische RP-HPLC (siehe 2.2.4.4.) durchgeführt. Diese ergab einen Reinheitsgrad von  $> 98\%$ . Die durch RP-HPLC entsalzte Elutionfraktion des EGFP wurde mittels Massenspektrometrie (siehe 2.2.5.7.) auf deren korrekte molekulare Masse überprüft (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.5:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE verschiedener Reinigungsstufen des  $^{15}\text{N}$ -markierten EGFP. Alle Proben wurden mit einem reduzierenden Probenpuffer behandelt und auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Färbung und Entfärbung erfolgte nach FAIRBANKS. (1) Proteinmarker, (2) Elution nach  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Affinitätschromatographie, (3) EGFP nach 66 h Prozessierung mit Enterokinase, (4) Durchlauf nach  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie an HisTrap HP und (5) Elution nach Anionenaustauschchromatographie.

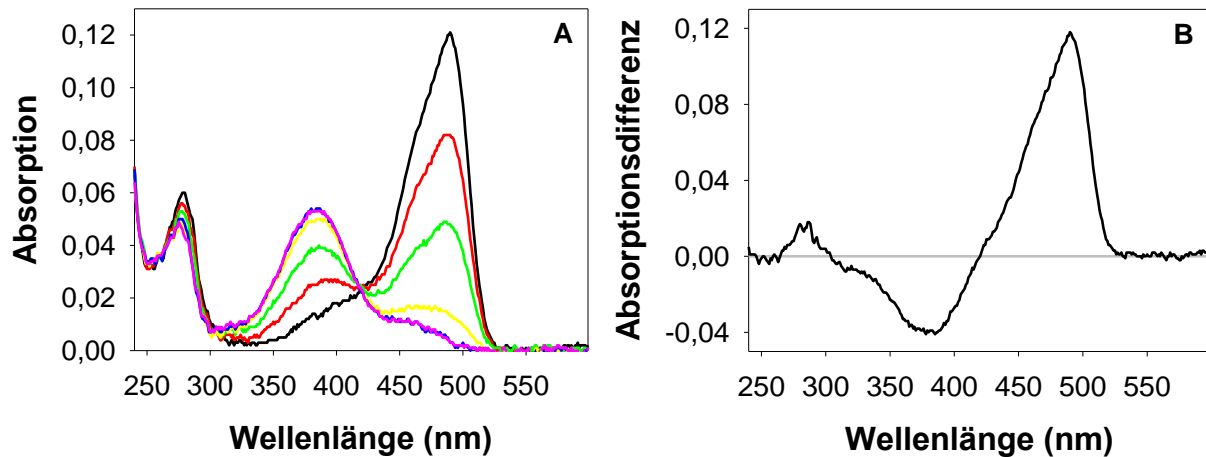
Aus der Biofeuchtmasse von 45 g Zellen konnte nach Zellaufschluss und Proteinreinigung 200 mg EGFP mit hohem Reinheitsgrad ( $> 98\%$ ) und der exakten Molmasse aufgearbeitet werden. Für das  $^{15}\text{N}$ -markierte EGFP konnten aus 25 g Zellfeuchtmasse, den gleichen Qualitätsmerkmalen folgend, etwa 60 mg Protein gereinigt werden. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. Spektroskopische Charakterisierung von EGFP

#### 3.3.1. Absorptionsspektren des EGFP

In **Abbildung 3.6** sind die UV/VIS-Spektren (**A**) und das dazugehörige Differenzspektrum (**B**) von nativem und durch GuHCl denaturiertem EGFP gezeigt. Im UV-Bereich ist ein für native globuläre Proteine typisches Proteinspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 280 nm und

einer Schulter bei 287 nm ersichtlich. Durch den spezifischen Chromophor des EGFP (4-(p-Hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on) hervorgerufen, konnte ein sehr starkes Maximum bei 490 nm mit einer Schulter bei 460 nm und eine schwächere Absorptionsbande bei 385 nm detektiert werden.



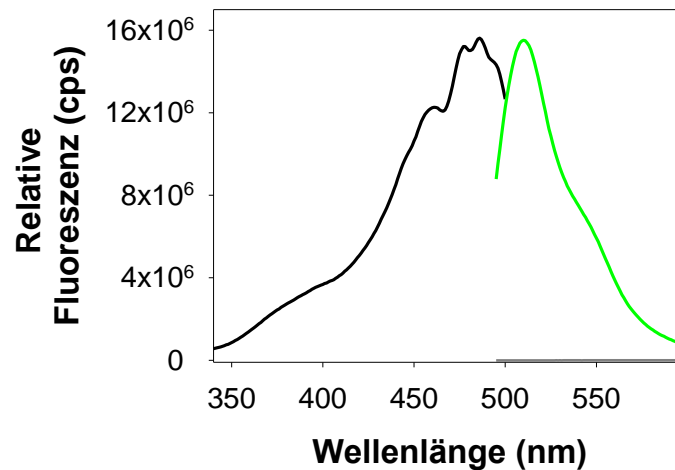
**Abbildung 3.6:** Absorptionsspektren von EGFP und Differenzspektrum zwischen nativem und in 6 M GuHCl denaturiertem EGFP.

In **A** wurde EGFP (3 mg/ml) 1:50 in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 verdünnt (—) und unter gleichen Bedingungen in Gegenwart von 6 M GuHCl inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (—) 1 min, (—) 3 min, (—) 10 min, (—) 25 min, (—) 60 min wurden die UV/VIS-Spektren von 240 nm bis 600 nm bei 20 °C und einer optischen Weglänge von 10 mm aufgenommen. **B** zeigt das berechnete Differenzspektrum zwischen nativem EGFP (60 µg/ml) und durch 6 M GuHCl denaturiertem EGFP nach einer Inkubationszeit von (—) 60 min.

In Gegenwart von 6,0 M GuHCl kam es sukzessive zum Verlust der strukturellen Integrität des EGFP, einhergehend mit einem Intensitätsverlust der Absorptionsbanden um das Maximum bei 490 nm. Unter diesen denaturierenden Bedingungen ging die hydrophobe Umgebung des delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystem des Chromophors verloren und wurde durch eine Wasserhülle ersetzt. Die kovalente Struktur des Chromophors hingegen blieb in Gegenwart von Denaturanzien intakt und zeigte verstärkt ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 385 nm und ein weiteres bei 460 nm. Nach 60 min Inkubationszeit in 6,0 M GuHCl war keine weitere Veränderung im Absorptionsverhalten ersichtlich, sodass von einer vollständigen Entfaltung des EGFP unter diesen Bedingungen ausgegangen werden konnte. Bei einer Wellenlänge von 420 nm liegt ein isosbestischer Punkt. Im UV-Absorptionsbereich der aromatischen Aminosäuren wurde ebenfalls eine Hypochromie ersichtlich, welche von einer Blauverschiebung (Hypsochromie) begleitet wurde. Diese Veränderung im Absorptionsverhalten ist ebenfalls kennzeichnend für denaturiert vorliegenden Proteine, war aber in ihrer Intensität im Vergleich mit den Absorptionsänderungen des Chromophors weit weniger stark ausgeprägt.

### 3.3.2. Fluoreszenzspektren des EGFP

Die spezifischen Fluoreszenzeigenschaften des EGFP-Chromophors sind in **Abbildung 3.7** gezeigt. Das Fluoreszenz-Anregungsspektrum (—) wurde bei konstanter Emissionswellenlänge und veränderter Wellenlänge der anregenden Strahlung aufgenommen. Das EGFP wurde in einem Wellenlängenbereich zwischen 340 nm und 500 nm angeregt.

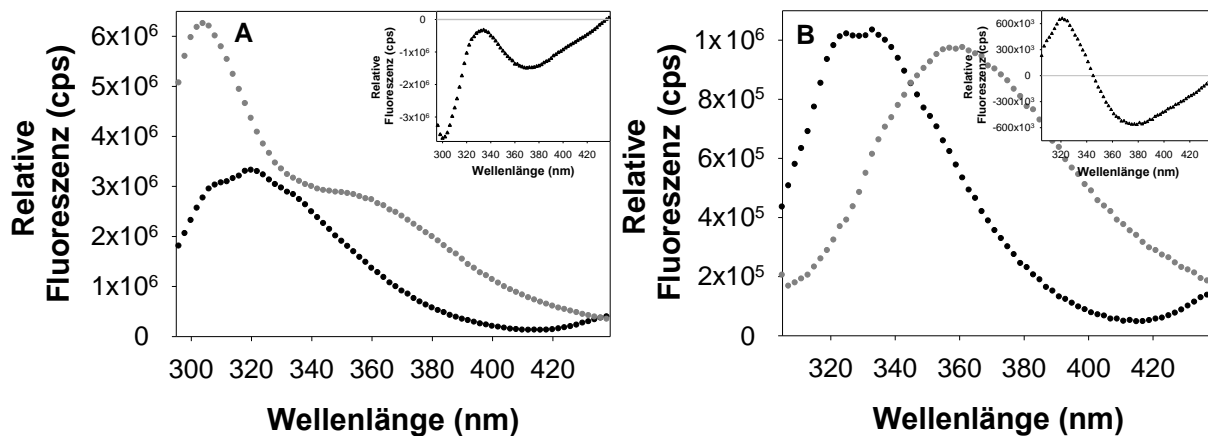


**Abbildung 3.7:** Anregungs- und Emissionsspektrum von EGFP.

Anregungsspektrum (—) und Emissionsspektrum (—) von EGFP (10 µg/ml) in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0 bei 30 °C und in Gegenwart von 6 M GuHCl (—). Gemessen wurde mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungsspektrum (340 nm – 500 nm) bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm; Emissionsspektrum von (495 nm – 600 nm) bei einer Anregungswellenlänge von 486 nm; Anregungsspalt 5,0 nm; Emissionsspalt 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 104F QS, 10 × 4 mm.

Es wurden verschiedene Maxima ersichtlich, bei 460 nm sowie 478 nm, 486 nm und Schultern bei 495 nm und bei 385 nm, hier jedoch mit weitaus geringerer Intensität. Für das Emissionsspektrum (—) wurde EGFP konstant mit der Wellenlänge des Fluoreszenz-Anregungsmaximums von 486 nm angeregt und die Fluoreszenzintensität zwischen 495 nm und 600 nm detektiert. Das Emissionsspektrum zeigt ein deutliches Maximum bei 510 nm und eine Schulter bei 545 nm. Die Signalintensität der grünen Fluoreszenz ist sehr intensiv und ermöglicht so Fluoreszenzuntersuchungen bei geringen Proteinkonzentrationen. Im durch GuHCl induzierten denaturierten Zustand (—) kommt es zum totalen Verlust der Fluoreszenz nach Anregung bei 486 nm. Wie in der Literatur beschrieben (Bokman & Ward, 1981), konnte nur im nativen Zustand des GFP (intakte Sekundär- und Tertiärstruktur) die fluoreszierende Eigenschaft des Chromophors bei 510 nm detektiert werden. In **Abbildung 3.8** sind die Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung der Seitenketten aromatischer Aminosäuren des EGFP gezeigt.

Die jeweiligen kleinen Grafiken stellen die berechneten Differenzspektren zwischen dem nativen (●) und dem durch 6,0 M GuHCl denaturierten (●) EGFP dar. In **Abbildung 3.8 A** wurde EGFP bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt. Das native Protein zeigt eine kleine Schulter bei 308 nm sowie ein Maximum bei 320 nm mit einer Schulter bei 334 nm, die der Tyrosin- beziehungsweise der Tryptophanfluoreszenz in apolarer Umgebung zugeordnet werden können. Dominierend war hier der Einfluss des Tryptophans.



**Abbildung 3.8:** Fluoreszenzspektren von EGFP.

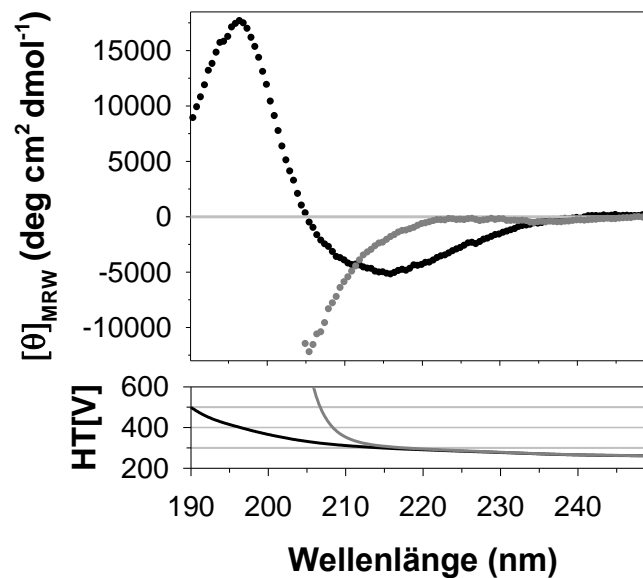
(A) Fluoreszenzspektrum von nativem EGFP (●) und durch 6 M GuHCl chemisch denaturiertem EGFP (●) bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm. Die kleine Grafik zeigt das berechnete Differenzspektrum zwischen nativem und denaturiertem EGFP. (B) Fluoreszenzspektrum von nativem EGFP (●) und denaturiertem EGFP in Gegenwart von 6 M GuHCl (●) bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm. Die kleine Grafik zeigt das berechnete Differenzspektrum zwischen nativem und denaturiertem EGFP.

Die Messungen wurden an einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen durchgeführt: Anregungsspalz 5,0 nm; Emissionsspalz 2,0 nm; S/R Modus, Hellma Makro 111 QS, 30 °C. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0.

Im GuHCl induzierten denaturierten Zustand kam es zu einer deutlichen Aufspaltung des Emissionsspektrums mit Maxima bei 304 nm und 358 nm. Durch die räumliche Distanz der Tyrosine zum Tryptophan im entfalteten Zustand wurde der strahlungslose Energietransfer unterbunden. Daraus folgt eine Hyperchromie der Tyrosinfloureszenz, begleitet von der Herausbildung eines ausgeprägten Maximums bei 304 nm. Bedingt durch die polare Umgebung der aromatischen Aminosäureketten unter denaturierten Bedingungen, konnte eine Rotverschiebung (Bathochromie) des Maximums der Tryptophanfluoreszenz auf 358 nm detektiert werden. Bei der selektiven Anregung des Tryptophans bei 295 nm **Abbildung 3.8 B** zeigte sich für das gefaltete EGFP ein Emissionsspektrum mit zwei Maxima bei 325 nm und 333 nm. In Gegenwart von 6 M GuHCl kam es unter nahezu gleichbleibender Fluoreszenzintensität zu einer Bathochromie. Das Tryptophan wies in wässriger Umgebung unter entfalteten Bedingungen ein Maximum bei 358 nm auf.

### 3.3.3. CD-Spektren des EGFP

Die Fern-UV-CD-Messung des EGFP zeigte ein, für ein vorwiegend aus  $\beta$ -Strängen und einem geringen Anteil an  $\alpha$ -helikalen Elementen bestehendes Protein, charakteristisches Spektrum. Das hierfür typische Maximum bei 196 nm und Minimum bei 216 nm ist in **Abbildung 3.9** (●) ersichtlich. Unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 6 M GuHCl ließen sich keine spezifischen Sekundärstrukturelemente erkennen (●).

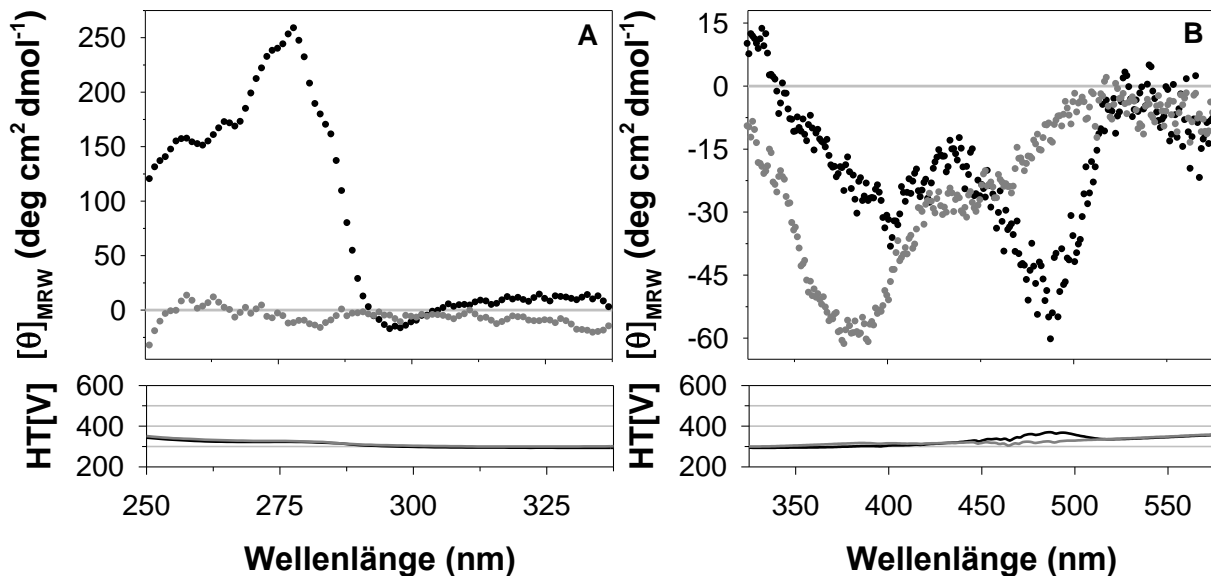


**Abbildung 3.9:** Fern-UV-CD-Spektren von EGFP.

Zirkulardichroismus von EGFP im Fern-UV-Bereich in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 (●) und in Gegenwart von 6 M GuHCl (●) aufgenommen bei 30 °C mit einem Jasco J-810 Spektropolarimeter und einer 0,01 cm Küvette. Die Proteinkonzentration betrug 1,03 mg/ml die Scangeschwindigkeit 20 nm min<sup>-1</sup>, die Auflösung 0,1 nm, die Bandenbreite 1 nm und die Zeitkonstante 2 s. Die Spektren wurden 20-fach akkumuliert.

Die negative Elliptizität des aufgenommenen CD-Spektrums spiegelt den typischen Verlauf für denaturierte Proteine wider. Der Zirkulardichroismus im Nah-UV gibt Aussagen über die Tertiärstruktur eines Proteins. Eine genaue Zuordnung der Banden zu Strukturelementen ist jedoch nicht möglich. In diesem spektralen Bereich werden die Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäuren mit deren Umgebung wiedergespiegelt. Diese sind für jedes Protein charakteristisch und bilden den sogenannten *finger print*. Die CD-Signale im Nah-UV waren erwartungsgemäß von geringerer Intensität als im Fern-UV, zeigten aber ein spezifisches CD-Spektrum. In **Abbildung 3.10 A** sind für das native EGFP (●) die Maxima bei 257 nm, 265 nm, 274 nm und das mit der höchsten Intensität bei 278 nm zu erkennen. Bei 296 nm ist ein Minimum ersichtlich. Unter 6 M GuHCl waren die Signale im Bereich der Aromaten sehr gering, was auf eine vollständige Denaturierung des EGFP schließen lässt. Der

charakteristische EGFP-Chromophor zeigte im spektralen VIS-Bereich definierbare CD-Signale auf **Abbildung 3.10 B**.



**Abbildung 3.10:** Nah-UV- und VIS-CD-Spektren von EGFP.

(A) Nah-UV-CD-Spektrum von EGFP in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 (●) und in Gegenwart von 6 M GuHCl (●) aufgenommen bei 30 °C und einer Scangeschwindigkeit von 50 nm min<sup>-1</sup>. (B) VIS-CD-Spektrum von EGFP in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 (●) und in Gegenwart von 6 M GuHCl (●) aufgenommen bei 30 °C und einer Scangeschwindigkeit von 100 nm min<sup>-1</sup>. Gemessen wurde mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter und mit einer 0,5 cm Küvette. Die Auflösung betrug 1 nm, die Bandenbreite 1 nm und die Zeitkonstante 2 s.

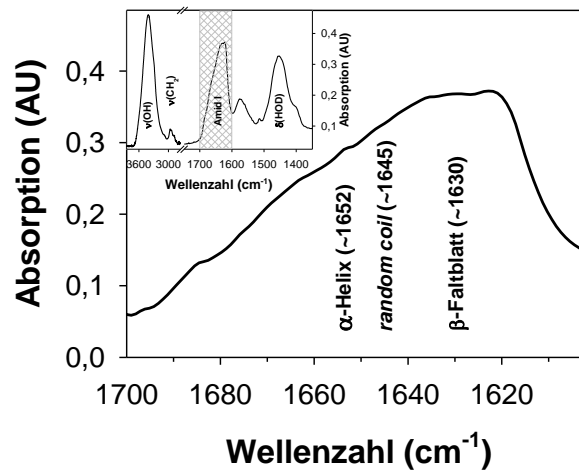
Unter nativen Bedingungen (●) sind zwei Minima bei 488 nm und 402 nm erkennbar. Im Gegensatz zum CD-Spektrum im Nah-UV zeigte sich hier in Gegenwart von 6,0 M GuHCl (●) kein nahezu vollständiger Verlust der CD-Signale. Unter denaturierenden Bedingungen änderte sich zwar die Umgebung des Chromophors, aber die chemische Struktur blieb erhalten, welche letztlich deutliche CD-Signale lieferte. Im entfalteten EGFP sind im VIS-CD-Spektrum ein Minimum bei 385 nm und eine ausgeprägte Schulter bei circa 442 nm zu erkennen. Die CD-Spektren unter nativen Bedingungen im Fern- und Nah-UV decken sich mit denen von [Visser et al., 2002](#) publizierten Spektren für EGFP.

### 3.3.4. IR-Spektren des EGFP

In **Abbildung 3.11** ist ein Infrarotspektrum von EGFP unter nativen Bedingungen dargestellt. Die kleine Grafik zeigt die Wellenzahlfenster, welche für strukturelevante Aussagen an Proteinen bedeutend sind, die Amid A-, Amid I- sowie die Amid II-Banden. Trotz der experimentellen Durchführung der IR-Messungen mit deuteriertem EGFP in einem D<sub>2</sub>O-



haltigem Puffersystem kam es zur Überlagerung der Amid A-Bande um  $3300\text{ cm}^{-1}$  mit der Valenzschwingung des Wassers ( $\nu(\text{OH})$ ). Dieser IR-Bereich stand im Folgenden für Strukturuntersuchungen an EGFP nicht zur Verfügung. Im Wellenzahlenbereich der Amid I-Bande von  $1700\text{ cm}^{-1}$  bis  $1600\text{ cm}^{-1}$  ließen sich dem EGFP Sekundärstrukturelemente zuordnen (Byler & Susi, 1986).



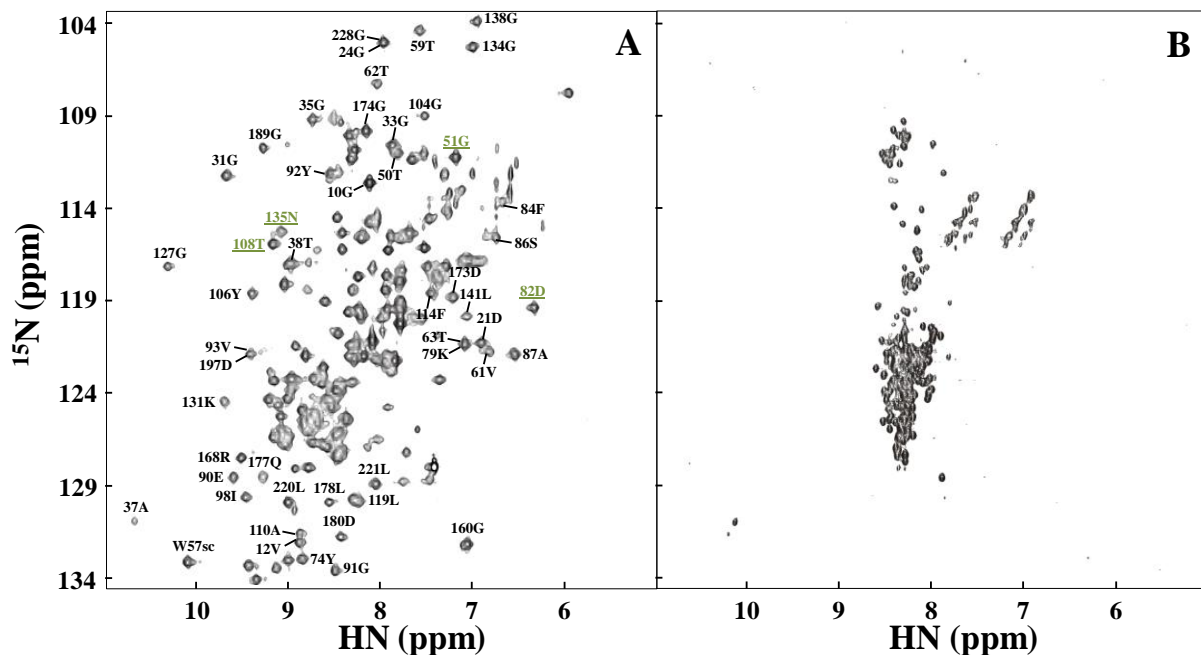
**Abbildung 3.11:** Infrarotspektrum von EGFP.

Infrarotspektrum von EGFP (—) aufgenommen an einem IR-Spektrometer Vector 22 mit 13 mm BaF<sub>2</sub>-Fenstern und 56  $\mu\text{m}$  spacer. Das IR-Spektrum zeigt die Amid I-Bande des deuterierten EGFP (20 mg/ml) gemessen in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pD 8,0 (in D<sub>2</sub>O) bei einer spektralen Auflösung von  $2\text{ cm}^{-1}$  und 32 scans mit Blackman-Harris-3-Term-Apodisierung. Die kleine Grafik zeigt das IR-Spektrum von  $3850\text{ cm}^{-1}$  bis  $1350\text{ cm}^{-1}$ .

Das Bandenmuster der Amid I-Bande von EGFP (—) zeigte eine starke Intensität der Streckschwingung der C=O-Gruppe der Peptidbindung ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ ) um  $1635\text{ cm}^{-1}$  bis  $1620\text{ cm}^{-1}$ , was auf einen hohen Anteil an  $\beta$ -Strängen und Faltblattstrukturen hindeutet. Bei  $1652\text{ cm}^{-1}$ , der charakteristischen Wellenzahl für  $\alpha$ -helikale Strukturen, war hingegen nur eine geringere Bandenintensität ersichtlich. Somit spiegelt das vorliegende IR-Spektrum die zylindrische  $\beta$ -Kannenstruktur ( $\beta$ -can fold) des EGFP mit einem starken Übergewicht an  $\beta$ -Strängen wider. Vergleichbare IR-Spektren von GFP sind in der Literatur (Scheyhing et al., 2002; Herberhold et al., 2003) zu finden. Ein IR-Spektrum unter chemisch denaturierten Bedingungen in GuDCI oder GuHCl im Vergleich zum nativen EGFP konnte nicht aufgenommen werden. Die C–N-Valenzschwingung des GuHCl liegt im Bereich der Amid I-Bande und zeigte eine zu hohe Absorption. Das deuterierte GuDCI zeigte ebenso zu hohe Absorptionswerte, sodass mit der hier verwendeten FTIR-Spektroskopie keine Messungen in hohen GuHCl- beziehungsweise GuDCI-Konzentrationen an EGFP durchgeführt werden konnten.

### 3.3.5. 2D-NMR-Spektren des EGFP

Mit  $^{15}\text{N}$ -markiertem EGFP konnten heteronukleare 2D-NMR-Strukturdaten aufgenommen werden. Die **Abbildung 3.12 A** zeigt ein hochaufgelöstes  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum von EGFP. Die Kopplung der Amidprotonen mit den  $^{15}\text{N}$ -Atomen lieferte eine Vielzahl von gut separierten NMR-Signalen. Anhand von Literaturdaten, einer verkürzten Variante des GFPuv (Met1-Ile229) (Khan et al., 2003), konnten 51 Aminosäurereste dem in dieser Arbeit benutzten EGFP zugeordnet werden. Bei den identifizierten Aminosäuren handelt es sich zum größten Teil um Glycine, hier konnten 15 der in EGFP existierenden 22 Glycine zugeordnet werden. Die anderen 36 Aminosäuren, wurden vorrangig in den Randbereichen des hier dargestellten 2D-NMR-Spektrums (siehe **Abbildung 3.12 A**) zugeordnet.



**Abbildung 3.12:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von EGFP.

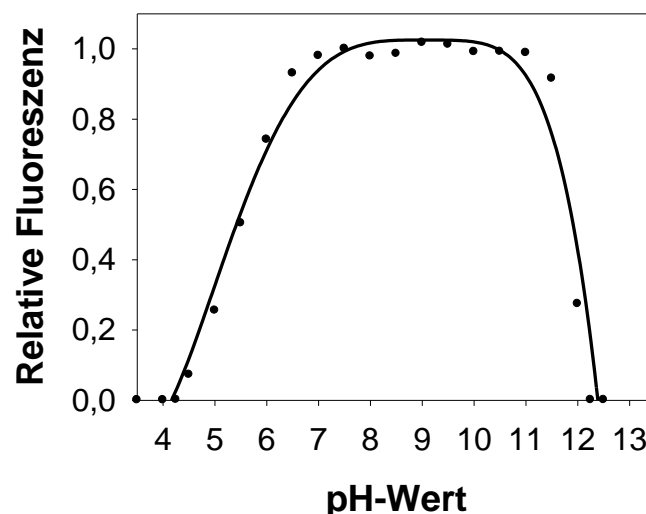
**A** zeigt ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum von nativem EGFP in 50 mM Na-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 8,0. In **B** ist ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum von chemisch denaturiertem EGFP in Gegenwart von 4,4 M GuHCl nach einer Inkubationszeit von 11 h in 50 mM Na-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6,5 dargestellt. Die Messungen wurden an einem Bruker Avance II 600 NMR-Spektrometer bei einer Temperatur von 303 K unter Zusatz von 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  und einer Proteinkonzentration von 12 mg/ml (0,45 mM) durchgeführt. Die Zuordnung der Aminosäuren erfolgte auf Basis einer verkürzten GFPuv-Variante (Met1-Ile229) nach Khan et al., 2003. Die grünen Markierungen in **A** zeigen Aminosäuren welche unter denaturierenden Bedingungen sowohl in Gegenwart GuHCl als auch HMIM Cl zugeordnet werden konnten.

Im zentralen Bereich des Spektrums kommt es mitunter zu Überlagerungen, sodass eine genaue Separierung in Einzelfällen erschwert ist. Aus diesem Grund ist die genaue Lokalisierung der Aminosäuren, wie auch in der Literatur beschrieben, nicht eindeutig und die Zuordnung blieb deshalb aus. In **Abbildung 3.12 B** ist ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum von EGFP unter

chemisch denaturierten Bedingungen in Gegenwart von 4,4 M GuHCl und einer Inkubationszeit von 11 h gezeigt. Die NMR-Messung an EGFP in GuHCl konnte nicht wie für das unter nativen Bedingungen aufgenommene Spektrum bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt werden. Bei diesen hohen pH-Werten tauschen sich die Amidprotonen zu schnell mit den Protonen des GuHCl aus. Dies führte zu einer massiven Verbreiterung und Intensitätsabnahme der Signale und eine gerätetechnische Abstimmung (*shimming*) war sehr stark eingeschränkt. Eine erfolgreiche Durchführung der Messungen konnte jedoch bei einem pH-Wert von 6,5 gewährleistet werden. Daraus ergab sich ein für denaturierte Proteine typisches Spektrum mit sehr starker Überlagerung der Signale. Die größte Anzahl der Signale ist bei einer chemischen Verschiebung zwischen 8,0 – 8,8 ppm ( $^1\text{H}$ ) und 119 – 127 ppm ( $^{15}\text{N}$ ) lokalisiert. Darüber hinaus zeigten sich jedoch vereinzelt separierte Signale. Eine eindeutige Zuordnung dieser Signale zu Aminosäuren, wie für das native EGFP gezeigt, war jedoch nur begrenzt möglich. Weitere Untersuchungen und Aussagen an EGFP zur GuHCl induzierten Denaturierung in Abhängigkeit der Denaturierungszeit sind unter **3.8.** beschrieben.

### 3.3.6. pH-Stabilität des EGFP

EGFP weist über einen großen pH-Bereich eine hohe Stabilität auf (Bokman & Ward, 1981; Enoki et al., 2004). In **Abbildung 3.13** ist die spezifische Fluoreszenz des EGFP-Chromophors in Abhängigkeit des pH-Wertes gezeigt.



**Abbildung 3.13:** pH-Stabilität des EGFP.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min in 10 mM Borsäure, 10 mM Citronensäure, 10 mM K-Phosphat, 10 mM Tris, 100 mM NaCl bei verschiedenen pH-Werten (pH 3 – 12,5) wurden jeweils Fluoreszenzspektren von EGFP aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität bei 510 nm wurde normiert und gegen den pH-Wert aufgetragen (●). Die Proteinkonzentration betrug 20 µg/ml. Gemessen wurde mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungswellenlänge 490 nm, Temperatur 30 °C, Anregungsspalz 5,0 nm; Emissionsspalz 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 104F QS, 10 × 4 mm.

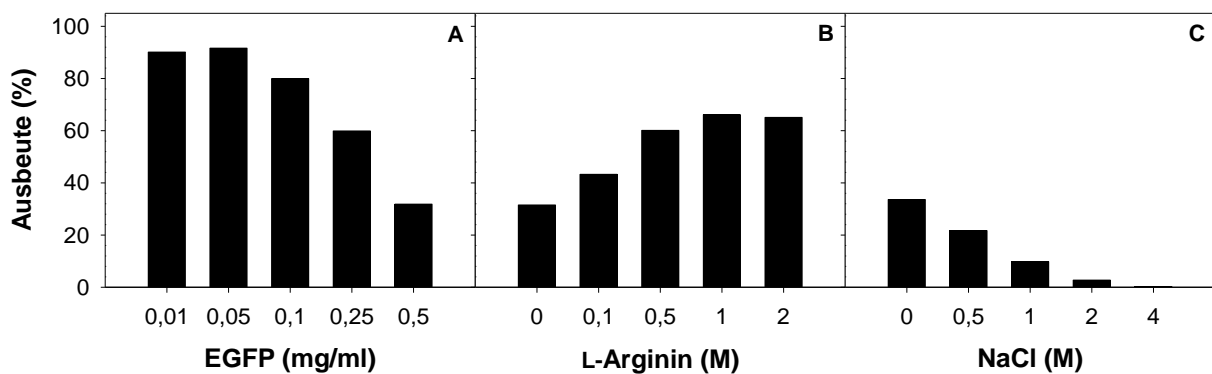
In einem Bereich zwischen pH 7,0 und 11,0 zeigte sich ein Plateau mit gleichbleibender Fluoreszenzintensität. Im sauren Milieu ab pH 6,0 sowie im basischen ab pH 11,5 war ein starker Verlust der Fluoreszenzintensität ersichtlich. Durch den Verlust der strukturellen Integrität wurde der Chromophor für das Lösungsmittel frei zugänglich. Die hydrophobe Umgebung sowie die ausgebildeten Wasserstoffbrücken mit benachbarten Aminosäuren wurden verändert, sodass die spezifische Fluoreszenz verloren ging. Zudem kommt es bei hoher Azidität zur Protonierung des phenolischen Sauerstoffs der chromophoren Struktur einhergehend mit veränderten Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften (Voityuk et al., 1998). Die Fluoreszenzabnahme ist jedoch vorrangig auf den Verlust der strukturellen Integrität des EGFP zurückzuführen.

### 3.4. *in vitro*-Faltung von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten

In früheren Arbeiten wurde für zwei Ionische Flüssigkeiten, 4-Methyl-N-butylpyridiniumtetrafluoroborat (MBPY BF<sub>4</sub>) und EMIM Cl, eine Unterdrückung der Aggregationsreaktion während der Rückfaltung von Proteinen beschrieben (Pultke, 2003). Bei einer EGFP-Konzentration von 0,1 mg/ml konnte bereits bei geringen Konzentrationen an Ionischer Flüssigkeiten im Rückfaltungsansatz dieser Effekt gezeigt werden, bei circa 200 mM wurde die Aggregation nahezu vollständig unterdrückt. Im Umkehrschluss sollte eine Reduktion der Aggregation, als Konkurrenzreaktion zur Rückfaltung, mit einer Erhöhung der Ausbeute im Rückfaltungsprozess einhergehen. Dies wurde im Folgenden zielgerichtet mit verschiedenen Ionischen Flüssigkeiten getestet. In diesem *screening* wurde systematisch die Kettenlänge von N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden und deren endständig hydroxylierten Analoga variiert. Zu den verschiedenen Imidazoliumchloriden wurden weiterhin auch quartäre Amine (Ammonium-Reihe) und auf Pyridin basierende Ionische Flüssigkeiten in Kombination mit unterschiedlichen Anionen untersucht.

Ausgangspunkt aller in diesem *screening* stattfindenden Rückfaltungsuntersuchungen war eine EGFP-Stammlösung mit einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml, welche für 3 Stunden in Gegenwart von 6,0 M GuHCl (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0, 30 °C) inkubiert und somit vollständig denaturiert wurde. In **Abbildung 3.14 A** ist die Abhängigkeit der Ausbeute von der Proteinkonzentration bei der Überführung des EGFP in einen Rückfaltungspuffer (0,6 M GuHCl, 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM

DTT, pH 8,0, 30 °C) und einer Verweilzeit von 24 Stunden unter diesen Reaktionsbedingungen gezeigt. Bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml konnte eine Ausbeute von etwa 90 % erreicht werden. Mit weiterer Zunahme der Proteinkonzentration im Rückfaltungsansatz sank die Ausbeute, sodass bei 0,5 mg/ml nur noch circa 30 % natives Protein detektiert werden konnte. Um die Ausbeute der Rückfaltung fluoreszenzspektroskopisch zu untersuchen, wurde aus den Rückfaltungsansätzen heraus verdünnt und jeweils bei einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml gemessen. Bei dieser EGFP-Konzentration war gewährleistet, dass kein *inner filter*-Effekt auftritt und das gemessene Fluoreszenzsignal direkt proportional zur eingesetzten Konzentration an nativem EGFP ist. In diesen verdünnten Messansätzen lagen jeweils dieselben Pufferbedingungen wie im Rückfaltungsansatz vor. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde in Relation zur Intensität von 10 µg/ml nativem EGFP (100 %) gesetzt.



**Abbildung 3.14:** Ausbeutebestimmung nach Rückfaltung von EGFP.

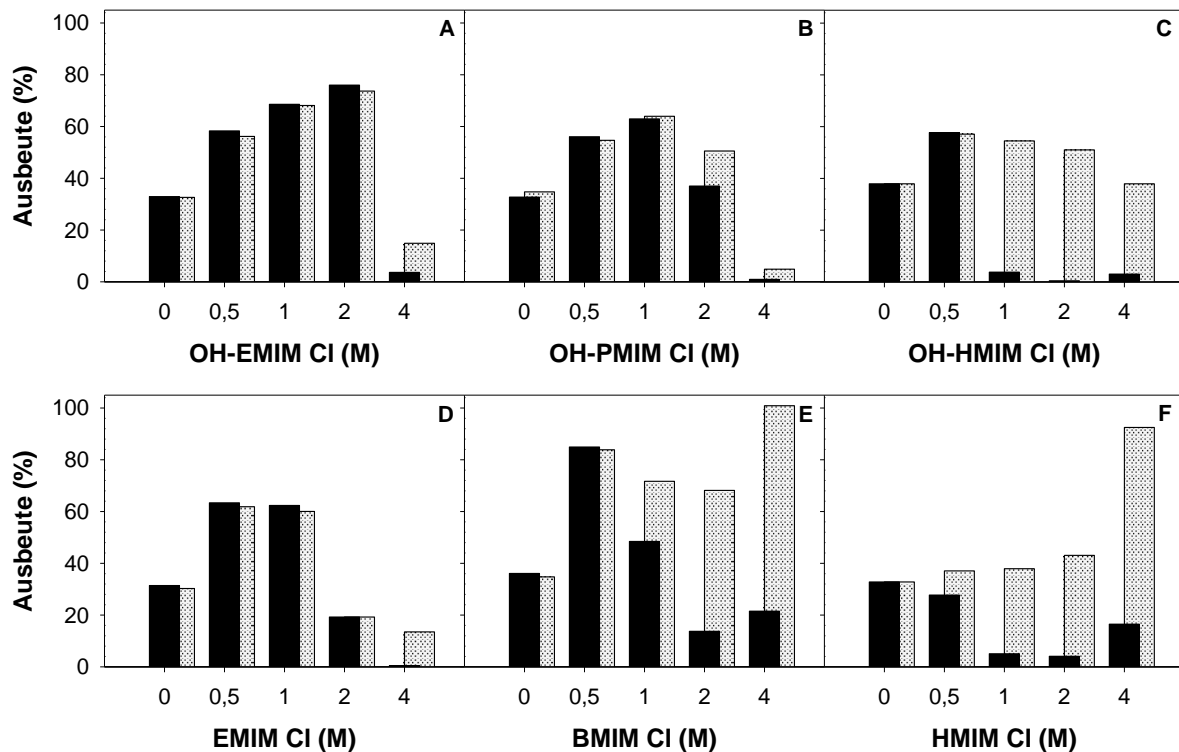
EGFP (5 mg/ml) wurden in Gegenwart von 6 M GuHCl 3 Stunden denaturiert und anschließend in einen Rückfaltungspuffer überführt (0,6 M GuHCl, 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0). **A** zeigt die Ausbeute der Rückfaltung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Bei einer festen Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml im Rückfaltungsansatz wurden steigende Konzentrationen an L-Argininhydrochlorid (**B**) und Natriumchlorid (**C**) zugesetzt und 24 Stunden inkubiert. Für die jeweiligen fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurde auf eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml verdünnt. Bei allen Verdünnungen aus unterschiedlichen Konzentrationen heraus wurden im Messansatz jeweils identische Pufferbedingungen gewährleistet (0,6 M GuHCl, 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0 + 40 mM L-Arginin beziehungsweise 80 mM NaCl). Die Fluoreszenzintensität bei 510 nm aus den Fluoreszenzspektren wurde in Relation zu dem Fluoreszenzsignal von 10 µg/ml nativem EGFP (100 %) gesetzt. Gemessen wurde mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungswellenlänge 490 nm, Temperatur 30 °C, Anregungsspalz 5,0 nm; Emissionsspalz 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 104F QS, 10 × 4 mm.

In **Abbildung 3.14 B** wurde zum Vergleich L-Arginin, ein für die Proteinfaltung sehr häufig genutzter und effektiver Faltungszusatz, verwendet. Hier, wie auch bei allen anderen im Folgenden beschriebenen Untersuchungen zur Ausbeutebestimmung, wurde bei einer fixen Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml im Rückfaltungspuffer gearbeitet. Bei dieser Proteinkonzentration sollte gewährleistet sein, dass in Gegenwart der jeweiligen Additive mit positivem Einfluss eine Zunahme beziehungsweise eine Abnahme bei negativem Einfluss die

Änderung der Ausbeute in ausreichendem Maße detektierbar ist. Mit steigender Konzentration an L-Arginin im Rückfaltungsansatz konnte die Ausbeute sukzessive erhöht und eine maximale Ausbeute von 66 % bei 1,0 M L-Arginin erreicht werden. Bis zu einer Konzentration von 2,0 M, welche nahe der Löslichkeitsgrenze für L-Arginin lag, konnte dieses Niveau gehalten werden. Für NaCl, wie in **Abbildung 3.14 C** gezeigt, spiegelte sich ein negativer Effekt während der Rückfaltung wider. Ausgehend von 30 % Ausbeute ohne NaCl wurde bei dessen Zusatz im Rückfaltungsansatz eine Abnahme der Ausbeute auf nahezu 0 % bei 4,0 M NaCl detektiert. Das NaCl wurde benutzt, um zu verdeutlichen, dass die im Folgenden dargestellten Einflüsse auf die Ausbeuten bei den Rückfaltungsuntersuchungen mit EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten nicht allein auf Effekte der Ionenstärke zurückzuführen sind. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde, sowohl für NaCl als auch für die Ionischen Flüssigkeiten, in allen Messansätzen nach Verdünnung aus den jeweiligen Rückfaltungsansätzen, eine Konzentration von 80 mM des jeweiligen Additivs (L-Arginin 40 mM, Ammoeng-Reihe 0,2 % w/v) realisiert. Diese Konzentration entsprach jener, welche nach der Verdünnung um Faktor 50 (von 0,5 mg/ml auf 10 µg/ml EGFP) aus den in 4,0 M des jeweiligen Additivs inkubierten Faltungsansätzen resultierte.

Im Folgenden ist die Ausbeutebestimmung an renaturiertem EGFP in Gegenwart von N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden und deren endständig hydroxylierten Analoga (siehe **Abbildung 3.15**) dargestellt, um den Einfluss der Länge der substituierten Alkylkette der Imidazoliumsalze bei der Rückfaltung aufzuzeigen. Die systematische Reihe war nicht vollständig, da wegen zu starker Verunreinigung (PMIM Cl) bzw. Syntheseproblemen des Herstellers (HO-BMIM Cl) Substanzen fehlten. Dennoch ließen sich eindeutige Trends ausmachen. In **Abbildung 3.15** sind in den schwarzen Balken die Ausbeuten nach 24-stündiger Inkubationsdauer in den jeweiligen Rückfaltungspuffer dargestellt. Ein positiver Einfluss ist durchweg, bis auf HMIM Cl, bei allen Faltungszusätzen in Abhängigkeit der Konzentration an Ionischen Flüssigkeiten ersichtlich. Bei HO-EMIM Cl konnte eine Ausbeutesteigerung auf nahezu 75 % bei 2,0 M erreicht werden (**A**). Dieses Niveau übertraf somit das Ergebnis, welches mit L-Arginin erzielt werden konnte. Bei höheren Konzentrationen war jedoch ein starker Abfall der Ausbeute auf nahezu 0 % zu verzeichnen. Mit zunehmender Länge der substituierten Alkylkette fiel das erreichte Maximum jedoch geringer (64 % für HO-PMIM Cl beziehungsweise 57 % für HO-HMIM Cl) aus. Ein weiterer klarer Trend war, dass die erzielten Maxima mit zunehmender Kettenlänge der Substituenten bei geringeren Molaritäten erreicht wurden. Die Tendenz der Ausbeuteabnahme bei weiterer Erhöhung der IL-Konzentration war

allen hier getesteten endständig hydroxylierten N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden gemein.



**Abbildung 3.15:** Ausbeutebestimmung nach Rückfaltung von EGFP in Gegenwart von N-alkylierter 3-Methylimidazoliumchloride und deren endständig hydroxylierter Analoga.

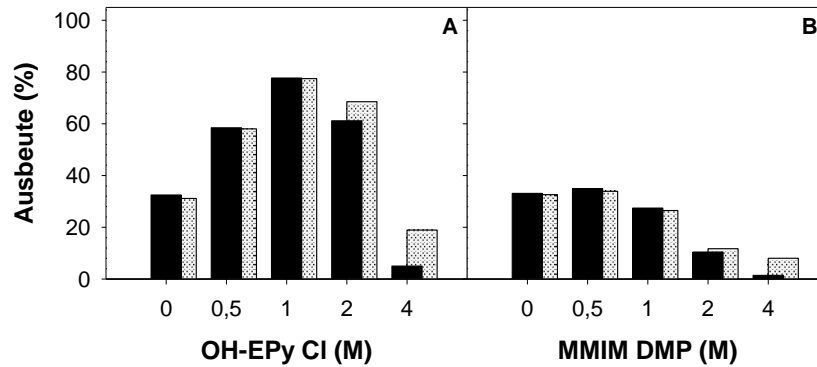
Aus einer für 3 Stunden in 6 M GuHCl inkubierten EGFP-Stammlösung (5 mg/ml) wurden 0,5 mg/ml in einen Rückfaltungspuffer mit 0,6 M GuHCl, 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0 und steigender Konzentrationen an HO-EMIM Cl (A), HO-PMIM Cl (B), HO-HMIM Cl (C), EMIM Cl (D), BMIM Cl (E) und HMIM Cl (F) überführt. Nach einer circa 24 stündigen Inkubationszeit wurden die Proben aus dem Rückfaltungsansatz 1:50 auf 10 µg/ml verdünnt und fluorenszenzspektroskopisch gemessen. Mit (■) ist der Startwert und (▨) das Maximum der Ausbeute nach Überführung in den Messansatz dargestellt. Bei allen Verdünnungen aus unterschiedlichen Konzentrationen heraus wurden im Messansatz jeweils identische Pufferbedingungen gewährleistet (0,6 M GuHCl, 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0 + 80 mM Ionische Flüssigkeit). Die Fluoreszenzintensität bei 510 nm aus den Fluoreszenzspektren wurde in Relation zu dem Fluoreszenzsignal von 10 µg/ml nativem EGFP (100 %) gesetzt. Gemessen wurde mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungswellenlänge 490 nm, Temperatur 30 °C, Anregungsspalt 5,0 nm; Emissionsspalt 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 104F QS, 10 × 4 mm.

Bei den Imidazoliumderivaten mit den nicht endständig hydroxylierten Alkylketten (siehe **Abbildung 3.15 D – F**) waren diese Trends nicht ganz so deutlich ausgeprägt. Für das EMIM Cl mit 63% Ausbeute bei 0,5 M – 1,0 M und BMIM Cl mit 85 % bei 0,5 M konnte eine signifikante Erhöhung der Ausbeute gezeigt werden. Für das HMIM Cl hingegen traf dies nicht zu. Bei weiterer Konzentrationserhöhung war zudem eine Abnahme der Ausbeute ersichtlich. Innerhalb dieser Serie wurden die Maxima ebenfalls mit zunehmender Länge der Alkylkette, respektive steigender Hydrophobizität, bei geringeren Konzentrationen erreicht.

Bei diesen Rückfaltungsexperimenten konnte zudem eine zusätzliche Erkenntnis gewonnen werden. Bei hohen Konzentrationen Ionischer Flüssigkeiten im Rückfaltungsansatz, bei denen zunächst eine Abnahme der Ausbeute nachgewiesen wurde, konnte nach Überführung der Probe aus dem Rückfaltungsansatz in den Messansatz eine stetige Intensitätszunahme der Fluoreszenz aufgezeigt werden. Bei diesen hohen Konzentrationen im Faltungsansatz wirkten die Ionischen Flüssigkeiten nicht faltungsfördernd (wie oben beschrieben) auf das EGFP, jedoch stieg mit zunehmender Verweildauer im Messansatz die Fluoreszenz stetig. Dies zeigt eine Renaturierung des EGFP im Messansatz an. Aufgrund der dortigen niedrigen Proteinkonzentration herrschten somit günstige Bedingungen, unter denen Ausbeuten von > 90 % erreicht wurden. Die Resultate dieses Effekts spiegeln jeweils die grauen Balken (siehe **Abbildung 3.15**) wider. Am deutlichsten ist dies in **Abbildung 3.15 C, E und F** gezeigt. Für das BMIM Cl und HMIM Cl wurden hier, nach Abschluss dieses zeitlichen Prozesses, finale Ausbeuten von etwa 90 % gemessen. Aber auch bei den anderen Ionischen Flüssigkeiten war bei den IL-Konzentrationen, bei denen das eigentliche Maximum der Ausbeute bereits überschritten worden war, dieser Effekt ersichtlich, jedoch nicht so stark ausgeprägt.

Neben dieser systematischen Variation der Kationen beziehungsweise des untersuchten Einflusses der Hydrophobizität auf die Ausbeute während der Rückfaltung des EGFP wurden auch noch weitere Ionische Flüssigkeiten untersucht. Hiermit wurde das *screening* auf Ionische Flüssigkeiten mit sehr voluminösen Kationen mit hoher Hydrophobizität (Ammonium-Salze) ausgedehnt und außerdem Verbindungen mit geringerer Hydrophobizität getestet. In **Abbildung 3.16** und **Abbildung 3.17** sind die Ausbeuten der *in vitro*-Faltung des EGFP in Gegenwart eines auf Pyridin basierenden Salzes (HO-EPy Cl), eines 1,3-Dimethylimidazoliums mit Dimethylphosphat als Anion (MMIM DMP) und quartäre Amine mit unterschiedlichen Substituenten am zentralen Stickstoff und unterschiedlichen Anionen dargestellt. Für das HO-EPy Cl (**Abbildung 3.16 A**) konnte bei einer Konzentration von 1,0 M eine bedeutsame Ausbeutesteigerung auf etwa 80 % gemessen werden. Bei Konzentrationen über 1,0 M war bei diesem Salz analog eine stete Abnahme der Ausbeute zu verzeichnen, welche bei 4,0 M im einstelligen Prozentbereich lag. Die Verwendung von Dimethylphosphat, eines im Vergleich zu dem bisherig verwendeten Chlorid voluminöseren Anions eines Imidazoliumderivats (in **Abbildung 3.16 B** dargestellt), zeigte keinen positiven Einfluss. Bei höheren Konzentrationen war hier lediglich eine Abnahme der Ausbeute ersichtlich, welche bei 4 M gegen 0 % tendierte.

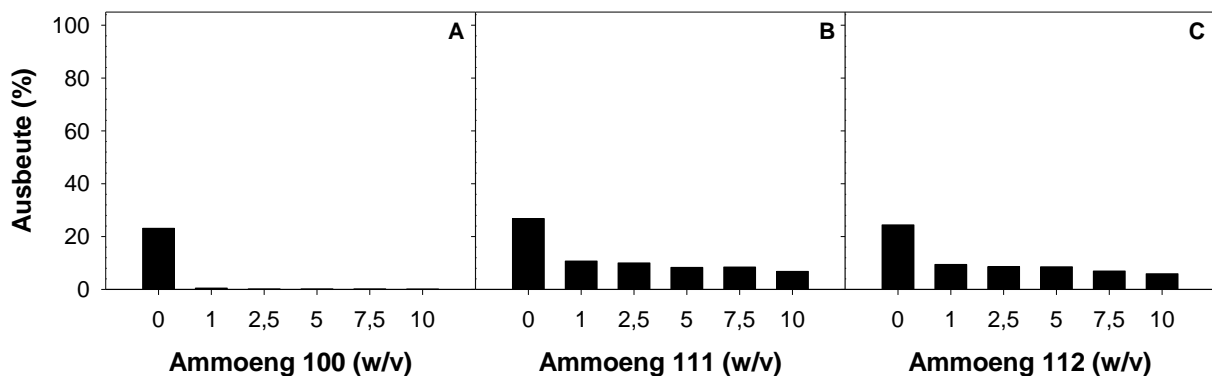




**Abbildung 3.16:** Ausbeutebestimmung nach Rückfaltung in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten.

Aus einer für 3 Stunden in 6 M GuHCl inkubierten EGFP-Stammlösung (5 mg/ml) wurden 0,5 mg/ml in einen Rückfaltungspuffer mit 0,6 M GuHCl, 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0 und steigender Konzentrationen an HO-EPy Cl (A), MMIM DMP (B) überführt. Nach einer circa 24-stündigen Inkubationszeit wurden die Proben aus dem Rückfaltungsansatz 1:50 auf 10 µg/ml verdünnt und fluoreszenzspektroskopisch gemessen. Mit (■) ist der Startwert und (▨) die maximal erreichte Ausbeute nach Überführung in den Messansatz dargestellt. Bei allen Verdünnungen aus unterschiedlichen Konzentrationen heraus wurden im Messansatz jeweils identische Pufferbedingungen gewährleistet (0,6 M GuHCl, 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0 + 80 mM Ionische Flüssigkeit). Die Fluoreszenzintensität bei 510 nm aus den Fluoreszenzspektren wurde in Relation zu dem Fluoreszenzsignal von 10 µg/ml nativem EGFP (100 %) gesetzt. Gemessen wurde mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungswellenlänge 490 nm, Temperatur 30 °C, Anregungsspannung 5,0 nm; Emissionsspannung 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 104F QS, 10 × 4 mm.

Bei der hier getesteten Reihe von Ammoeng-Salzen handelte es sich um sehr viskose, langkettige und nur bedingt in Wasser lösliche Verbindungen. Aufgrund der begrenzten Wasserlöslichkeit wurden die Ammoeng-Salze nur bis zu einer Konzentration von maximal 10 % (w/v) im Faltungspuffer gelöst.



**Abbildung 3.17:** Ausbeutebestimmung nach Rückfaltung in Gegenwart von quartären Aminen basierenden Ionischen Flüssigkeiten.

Aus einer für 3 Stunden in 6 M GuHCl inkubierten EGFP-Stammlösung (5 mg/ml) wurden 0,5 mg/ml in einen Rückfaltungspuffer mit 0,6 M GuHCl, 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0 und steigender Konzentrationen an Ammoeng 100 (A), Ammoeng 111 (B), Ammoeng 112 (C) überführt. Nach einer circa 24-stündigen Inkubationszeit wurden die Proben aus dem Rückfaltungsansatz 1:50 auf 10 µg/ml verdünnt und fluoreszenzspektroskopisch gemessen. Bei allen Verdünnungen aus unterschiedlichen Konzentrationen heraus wurden im Messansatz jeweils identische Pufferbedingungen gewährleistet (0,6 M GuHCl, 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0 + 0,2 % (w/v) Ionische Flüssigkeit). Die Fluoreszenzintensität bei 510 nm aus den Fluoreszenzspektren wurde in Relation zu dem Fluoreszenzsignal von 10 µg/ml nativem EGFP (100 %) gesetzt. Gemessen wurde mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungswellenlänge 490 nm, Temperatur 30 °C, Anregungsspannung 5,0 nm; Emissionsspannung 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 104F QS, 10 × 4 mm.

Die Ausbeutebestimmung zeigte für keine der hier untersuchten quartären Amine einen positiven Effekt. Bei allen getesteten Konzentrationen wurden schlechtere Ausbeuten erzielt als bei der spontanen Rückfaltung ohne Zusatz der Ammoeng-Salze. Am deutlichsten war die Reduzierung der Ausbeute auf nahezu 0 % in Gegenwart Ammoeng 100. Hierbei handelte es sich auch um das mit der Cocosalkylkette stärkste hydrophobe Salz in dieser Reihe. Bei den beiden anderen Salzen (siehe **Abbildung 3.17 B** und **C**) wurden zumindest Ausbeuten im oberen einstelligen Prozentbereich gemessen. Zudem konnte visuell eine starke Trübung in den Faltungsansätzen beobachtet werden, dies auch unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Diese Salze scheinen unter den gegebenen Bedingungen ein Aggregieren des EGFP zu begünstigen. Eine Zunahme der Fluoreszenz nach der Überführung des EGFP vom Rückfaltungsansatz in den Messansatz, wie sie bei den anderen auf Imidazolium oder Pyridinium basierten Ionischen Flüssigkeiten gezeigt werden konnte, war für die Ammoeng-Reihe nicht nachweisbar.

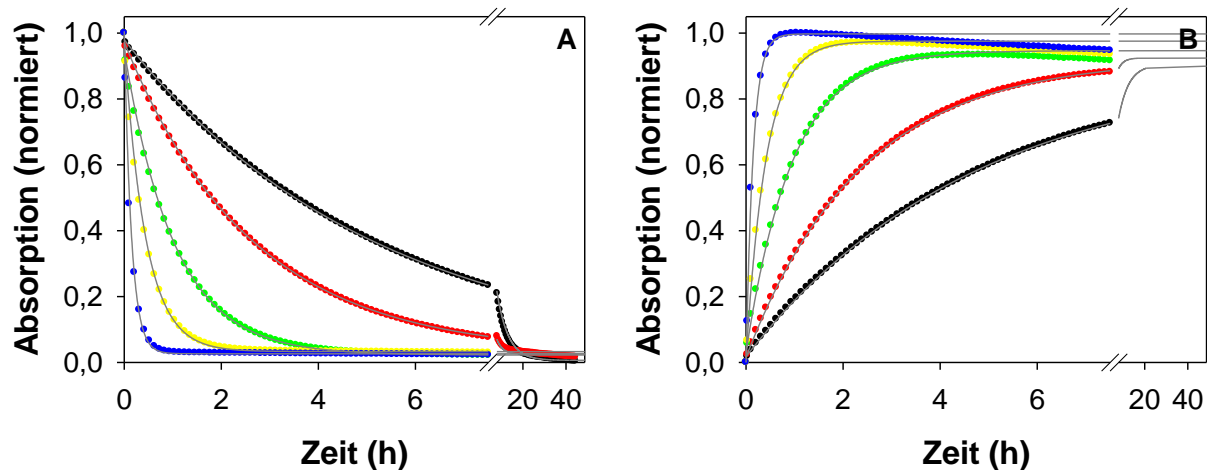
Im *screening* konnte gezeigt werden, dass einige Ionische Flüssigkeiten bei der *in vitro*-Faltung von EGFP einen positiven Einfluss auf die Ausbeute ausüben. So konnte für fast alle Salze in einer systematischen Reihe von N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden und deren endständig hydroxylierten Analoga die Ausbeute deutlich erhöht werden. Für die endständig hydroxylierten Verbindungen konnte die klare Beziehung aufgezeigt werden, dass mit zunehmender Kettenlänge das Maximum der Ausbeute niedriger ausfiel und bei geringeren Konzentrationen an Ionischen Flüssigkeiten erreicht wurde. In Gegenwart der N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloride zeigte sich hingegen, dass in Anwesenheit von BMIM Cl ein Optimum durchlaufen wurde und bei kürzer oder länger substituierten Verbindungen die Ausbeute geringer ausfiel. Für BMIM Cl wurde bei den gewählten Reaktionsbedingungen mehr als eine Verdopplung der Ausbeute auf 85 % im Gegensatz zu 35 % in Abwesenheit des Salzes erzielt. Der positive Effekt bei der *in vitro*-Faltung ist vermutlich auf eine löslichkeitvermittelnde Wirkung der Ionischen Flüssigkeiten zurückzuführen. In früheren Arbeiten (Pultke, 2003) konnte anhand von zwei Ionischen Flüssigkeiten (EMIM Cl, MBPy BF<sub>4</sub>) eine aggregationsunterdrückende Wirkung nachgewiesen werden. Durch Suppression der Aggregation als Konkurrenzreaktion zur Rückfaltung und die löslichkeitvermittelnde Wirkung resultiert eine Erhöhung der Faltungsausbeute. Neben diesem positiven Ergebnis konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Alkylkettenlänge, respektive steigender Hydrophobizität, und in Gegenwart hoher Konzentrationen der Ionischen Flüssigkeiten ein destabilisierender Einfluss auf EGFP ausgeübt wird und eine Abnahme der Ausbeute die Folge ist. Dass einige Ionische Flüssigkeiten destabilisierend auf Proteine in Gegenwart sehr hoher Konzentrationen

wirken und letztlich zur Aggregation der Proteine führen, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Summers & Flowers II, 2000; Constantinescu et al., 2007 & 2010). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass diese destabilisierenden Bedingungen nicht generell zu irreversiblen Prozessen führen, da für einige langkettigere Verbindungen wie BMIM Cl, HMIM Cl und HO-HMIM Cl bei nachgeschalteter Abreicherung der Ionischen Flüssigkeit durch Verdünnung eine Renaturierung von EGFP detektiert werden konnte.

## 3.5. Denaturierung und Renaturierung von EGFP

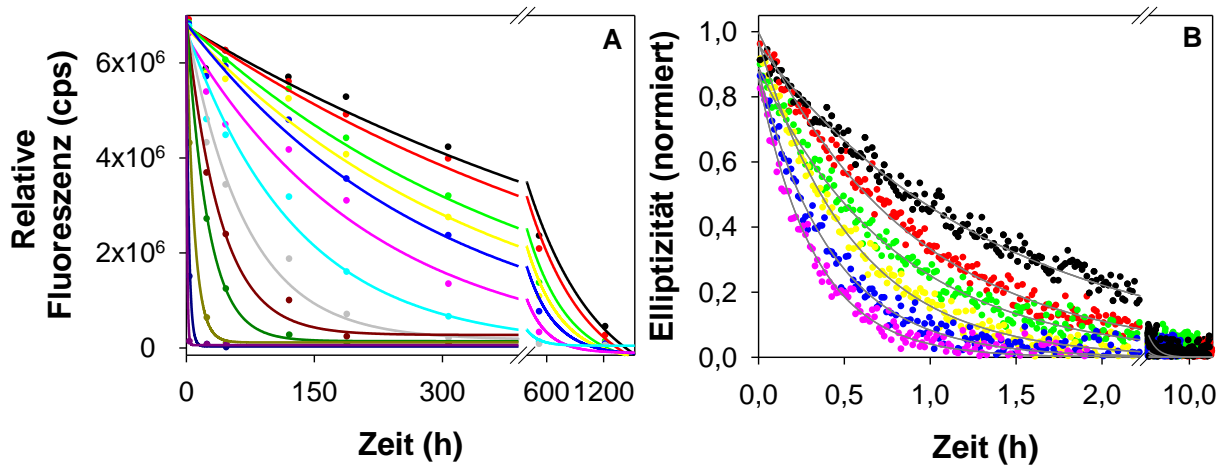
### 3.5.1. Denaturierung des EGFP durch GuHCl

Die unter 3.3.1. beschriebene direkte Korrelation der Hyperchromie bei 385 nm mit der Hypochromie bei 490 nm, bei der chemisch induzierten Denaturierung durch Guanidinhydrochlorid, eignete sich für kinetische Betrachtungen der Faltungsreaktion. Dies zeigten Denaturierungsversuche mit EGFP unter Verwendung von GuHCl als destabilisierendes Agens. In **Abbildung 3.18 (A)** ist die Abnahme der Absorptionsbande bei 490 nm des EGFP (1 mg/ml) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Guanidinhydrochlorid dargestellt. Mit der kontinuierlichen Intensitätsabnahme der Absorption bei 490 nm ging eine direkte Intensitätszunahme der Absorptionsbande bei 385 nm (**B**) einher. Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten der durch Guanidinhydrochlorid induzierten Entfaltung des EGFP wurden durch einfach exponentielle Kurvenanpassung (siehe **Gleichung 2.8, Gleichung 2.9**) ermittelt und sind in **Abbildung 3.20** dargestellt und zudem in **Tabelle 7.1** gelistet. Der Vergleich der hier gezeigten kinetischen Parameter spiegelte eine sehr gute Übereinstimmung der Parameter aus der Absorptionsabnahme bei 490 nm beziehungsweise aus der Absorptionszunahme bei 385 nm wider. Bei einer logarithmischen Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung ( $k_{n \rightarrow d}$ ) gegen die GuHCl-Konzentration (siehe **Abbildung 3.20**) ist diese Linearität durch die Regressionsgeraden veranschaulicht. Zudem konnte auch zwischen den Absorptionsparametern von 490 nm und 385 nm eine sehr gute Übereinstimmung gezeigt und letztlich die direkte Korrelation der Signaländerung bei diesen Wellenlängen während der Entfaltung bestätigt werden.



**Abbildung 3.18:** Chemisch induzierte Denaturierung von EGFP durch Guanidiniumhydrochlorid. Abnahme der Absorption bei 490 nm (A) beziehungsweise Zunahme der Absorption bei 385 nm (B) des EGFP in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Guanidiniumhydrochlorid 4,7 M (●), 5,0 M (●), 5,3 M (●), 5,6 M (●), 5,9 M (●). Der Kurvenverlauf wurde jeweils mit einer einfach exponentiellen Funktion 1. Ordnung angepasst (durchgängige Linien). Gemessen wurde bei einer EGFP-Konzentration von 1 mg/ml in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0 bei 30 °C mit einem Microplate Reader VERSAMax in 96 well plates. In direkt aufeinander folgenden *scans* wurde in einem Abstand von 2,5 min die Absorption bei 490 und 385 nm gemessen.

Die hohe Stabilität des GFP und vieler Varianten gegenüber Denaturanzien wie Guanidiniumhydrochlorid ist in der Literatur (Ward & Bokman, 1982; Fukuda et al., 2000) beschrieben und durch eigene Messungen in **Abbildung 3.19** bestätigt. Für die Ermittlung kinetischer Parameter der Entfaltung ( $k_{n \rightarrow d}$ ) wurde die Reaktion des EGFP in Gegenwart steigender Konzentrationen an GuHCl über einen Zeitraum von bis zu 51 Tage verfolgt (siehe **2.2.5.2.4.**). Diese Langzeituntersuchungen wurden mittels fluoreszenzspektroskopischer Methoden durchgeführt und zeigen die Änderung der Intensitäten über die Zeit (siehe **Abbildung 3.19** A). Hier zeigte sich, dass für eine vollständige Entfaltung bei einer Konzentration von 2,6 M GuHCl ein Zeitintervall von Monaten erforderlich war. Unterhalb von 2,6 M GuHCl war eine Analyse der Denaturierungsparameter nicht möglich, da die Kurvenanpassung keine annähernd gute Auswertung ermöglichte. Bei höheren Konzentrationen (> 5,0 M GuHCl) konnte die Entfaltung innerhalb weniger Stunden detektiert werden. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden durch eine einfach exponentielle Funktion 1. Ordnung (siehe **Gleichung 2.8**) bestimmt und sind in **Tabelle 7.3** gelistet. Eine logarithmische Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung ( $k_{n \rightarrow d}$ ) gegen die GuHCl-Konzentration (siehe **Abbildung 3.20**) zeigte einen nahezu deckungsgleichen Verlauf der Regressionsgerade mit denen der über Absorption ermittelten.

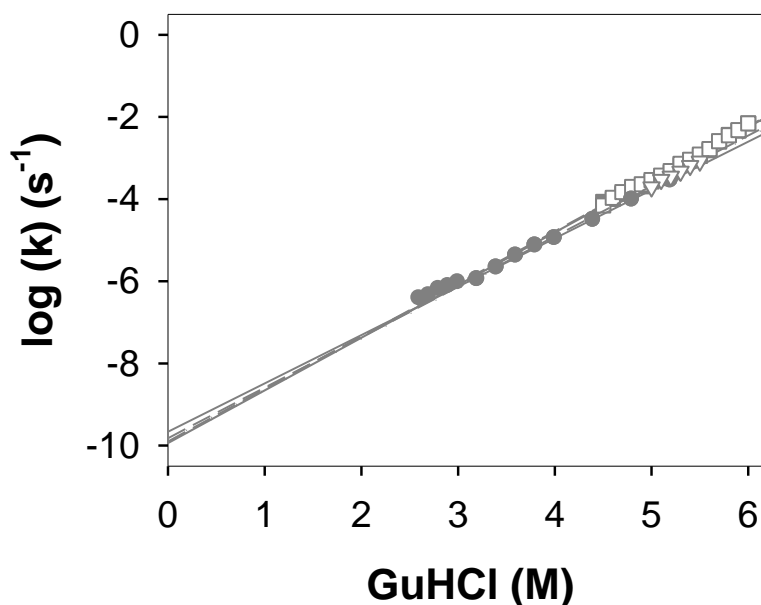


**Abbildung 3.19:** Chemisch induzierte Denaturierung von EGFP durch Guanidinhydrochlorid.

(A) Abnahme der Fluoreszenzintensität des EGFP. Zu verschiedenen Zeitpunkten (bis 51 Tage) wurden Fluoreszenzemissionsspektren vorgefertigter Proben mit steigender Konzentration von Guanidinhydrochlorid 2,6 M (●), 2,7 M (●), 2,8 M (●), 2,9 M (●), 3,0 M (●), 3,2 M (●), 3,4 M (●), 3,6 M (●), 3,8 M (●), 4,0 M (●), 4,4 M (●), 4,8 M (●), 5,2 M (●) gemessen. Das Maximum der Fluoreszenzemission (510 nm) bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm wurde gegen die Inkubationszeit des EGFP in Gegenwart verschiedener Denaturationskonzentrationen aufgetragen. Der Kurvenverlauf wurde jeweils mit einer einfach exponentiellen Funktion 1. Ordnung angepasst (durchgängige Linien). Gemessen wurde bei einer EGFP-Konzentration von 5 µg/ml in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 8,0 bei 30 °C mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungsspalz 5,0 nm; Emissionsspalz 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 104F QS, 10 × 4 mm. (B) Abnahme der Elliptizität des EGFP im Nah-UV-CD-Bereich. Der zeitliche Verlauf der Guanidinhydrochlorid-induzierten Denaturierung des EGFP wurde mittels Zirkulardichroismus bei einer Wellenlänge von 278 nm verfolgt. Gemessen wurde bei einer EGFP-Konzentration von 0,5 mg/ml in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an GuHCl 5,0 M (●), 5,1 M (●), 5,2 M (●), 5,3 M (●), 5,4 M (●), 5,5 M (●) bei 30 °C mit einem Jasco J-810 Spektropolarimeter und einer 0,5 cm Küvette. In einem Abstand von 10 s wurde die Elliptizität detektiert, die Auflösung betrug 1 nm, die Bandenbreite 1 nm und die Zeitkonstante 8 s.

Dies war zu erwarten da durch beide Methoden (Absorption und Fluoreszenz) dasselbe Messsignal betrachtet wurde, also die Änderungen der Signalintensität am Chromophor in Gegenwart steigender GuHCl-Konzentration. Darüber hinaus sollten Aussagen über andere strukturelle Veränderungen während der Denaturierung ermöglicht werden. Dies konnte durch Zirkulardichroismus im Nah-UV gezeigt werden. Der Verlust der Tertiärstruktur in Abhängigkeit der Denaturationskonzentration wurde in einem Bereich von 3,0 M bis 5,5 M GuHCl bei einer Wellenlänge von 278 nm verfolgt (siehe **Abbildung 3.19 B**). Die Analyse der kinetischen Parameter erfolgte ebenso über eine einfach exponentielle Funktion 1. Ordnung (siehe **Gleichung 2.8**). Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{n \rightarrow d}$ ) sind in **Tabelle 7.3** gelistet. In der logarithmischen Auftragung dieser Geschwindigkeiten in **Abbildung 3.20** zeigte sich, dass die über Zirkulardichroismus erhaltenen denen der über Absorption und Fluoreszenz ermittelten entsprechen. Dies zeigt, dass der Verlust der Tertiärstruktur mit den Veränderungen, denen der Chromophor während der Denaturierung unterliegt, in der gleichen Abhängigkeit steht. Über die lineare freie Energie-Beziehung, wonach der Logarithmus der

Geschwindigkeitskonstanten proportional zur Denaturationskonzentration ist, ergaben sich durch Extrapolation der linearen Regressionsgeraden auf 0 M GuHCl Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung von EGFP im Bereich  $10^{-9}$  bis  $10^{-10} \text{ s}^{-1}$ . Dies entspräche einem zeitlichen Bereich von Jahren und verdeutlicht somit wie langsam EGFP entfaltet.



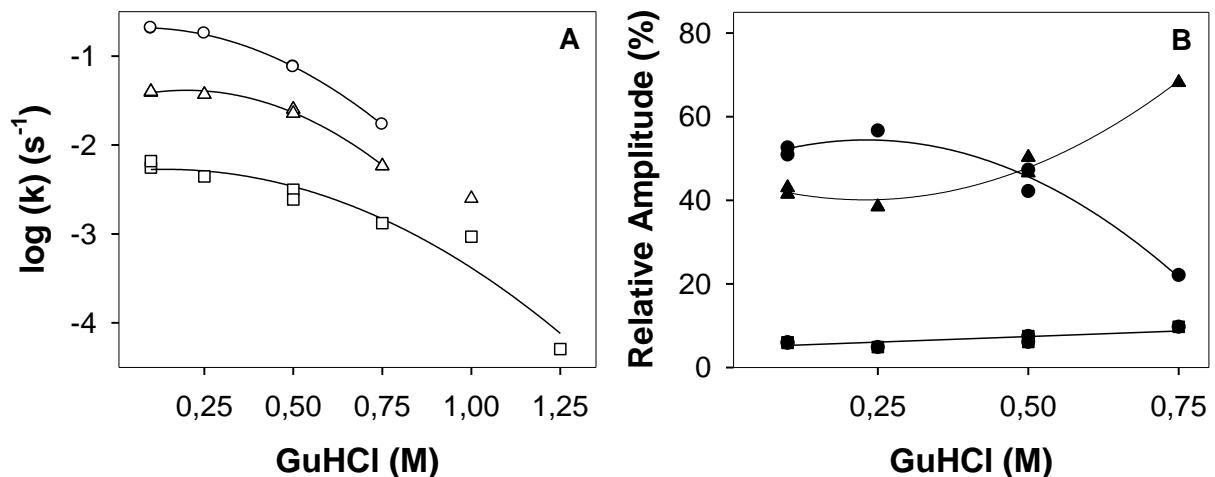
**Abbildung 3.20:** Entfaltungskinetik des EGFP in Gegenwart von GuHCl.

Graphische Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten der durch GuHCl induzierten Entfaltung basierend auf Intensitätsänderung der Absorption bei 490 nm (■) und 385 nm (□), der Fluoreszenz bei 510 nm (●) und des Zirkulardichroismus im Nah-UV-Bereich bei 278 nm (▽). Die Linien stellen jeweils die lineare Regressionsgerade zur Extrapolation der Konzentrationsabhängigkeit dar. Eine Auflistung der kinetischen Parameter erfolgte ebenso in **Tabelle 7.1** und **Tabelle 7.3**.

### 3.5.2. Renaturierung des EGFP aus dem GuHCl-induziert denaturierten Zustand

Die Renaturierung des EGFP (20  $\mu\text{g/ml}$ ) aus dem 6 M GuHCl-induziert denaturierten Zustand wurde anhand der spezifischen Fluoreszenz des Chromophors bei einer Wellenlänge von 510 nm verfolgt. Im Gegensatz zur Denaturierung (siehe **3.5.1.**) zeigte die Rückfaltungsreaktion eine komplexe Kinetik. Bei Konzentrationen bis 0,75 M GuHCl kam es zu einer fast vollständigen Renaturierung innerhalb weniger Minuten. In Abhängigkeit der eingesetzten GuHCl-Konzentration im Rückfaltungsansatz konnten bis zu drei Phasen gezeigt werden (siehe **Abbildung 3.21 A**). Bei Konzentrationen um 1,0 M GuHCl konnte der Kurvenverlauf nur mit einer zweifach exponentiellen Funktion (siehe **Gleichung 2.11**) und bei 1,25 M nur mit einer einfach exponentiellen Funktion (siehe **Gleichung 2.9**) beschrieben werden. Die kinetischen Parameter der Rückfaltungsreaktion sind in **Abbildung 3.21**

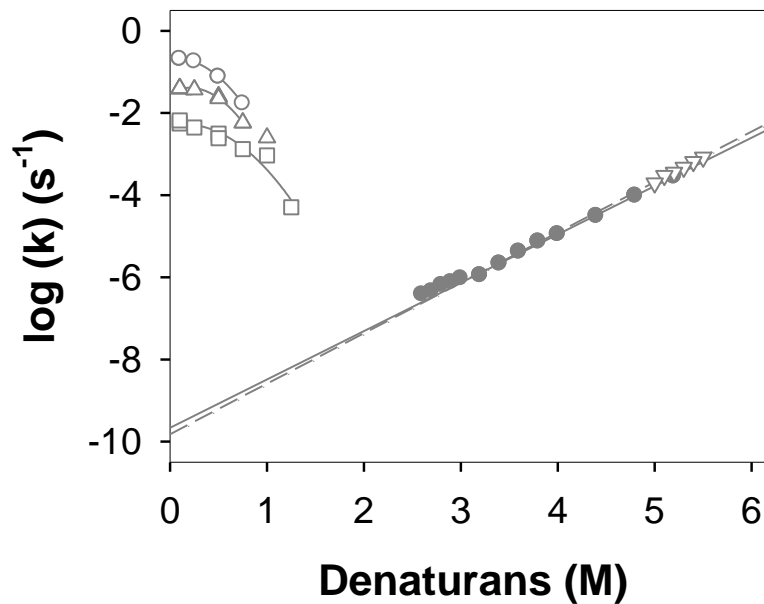
dargestellt und in **Tabelle 7.2** gelistet. Auf eine schnelle Phase ( $k_1$ ) zu Beginn der Rückfaltung folgten eine mittlere ( $k_2$ ) und eine langsame Phase ( $k_3$ ). Mit steigender GuHCl-Konzentration verliefen die Rückfaltungskinetiken zunehmend langsamer und der relative Anteil der Amplituden der entsprechenden Phasen veränderte sich (siehe **Abbildung 3.21 B**). Bei 0,1 M GuHCl war die schnelle Phase mit 52 % relativer Anteil der Amplitude ( $\text{amp}_1$ ) prominent, gefolgt von 42 % für die mittlere ( $\text{amp}_2$ ) und 6 % für die langsame Phase ( $\text{amp}_3$ ). Mit steigender Denaturanskonzentration nahm der Anteil der Amplitude der schnellen Phase deutlich ab und die der beiden anderen Phasen zu, wobei die langsame Phase nur gering anstieg. Bei GuHCl-Konzentrationen, bei denen die Kinetik einen zweiphasigen Charakter aufwies, war die Amplitude der langsamen Phase mit 84 % dominant und bei 1,25 M GuHCl trat apparent nur eine Phase auf.



**Abbildung 3.21:** Kinetische Parameter der Renaturierung aus der chemisch induzierten Denaturierung von EGFP durch GuHCl.

Die Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{d \rightarrow n}$ ) der Rückfaltung wurden durch Änderung der Intensität der Fluoreszenz bei 510 nm aus dem 6 M GuHCl-induziert denaturierten Zustand nach Überführung in steigende Denaturanskonzentrationen im Rückfaltungsansatz ermittelt. Die Kurvenanpassung erfolgte je nach Anzahl der detektierbaren Phasen durch dreifach, zweifach oder einfach exponentielle Gleichungen 1. Ordnung. In **A** sind die aus den Kurvenanpassungen resultierenden Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{d \rightarrow n}$ ) der schnellen  $k_1$  (○), mittleren  $k_2$  (△) und langsamen Phase  $k_3$  (□) dargestellt. **B** zeigt die entsprechenden relativen Amplituden  $\text{amp}_1$  (●),  $\text{amp}_2$  (▲) und  $\text{amp}_3$  (■). Die Linien dienen der Veranschaulichung und verdeutlichen den Trend der Kurvenverläufe. Eine Auflistung der kinetischen Parameter erfolgt in **Tabelle 7.2**.

In Gegenwart noch höherer Konzentrationen an GuHCl konnte die Rückfaltungskinetik nicht adäquat beschrieben werden, da die Reaktion sehr langsam verlief und im betrachteten Zeitraum nur eine geringe Intensitätszunahme der Fluoreszenz detektiert wurde. Generell war der Faltungsprozess sehr langsam, sodass im Denaturierungs–Renaturierungs–Übergang keine Gleichgewichtseinstellung von nativer und denaturierter Spezies erreicht werden kann (siehe **Abbildung 3.22**).



**Abbildung 3.22:** Chevron-Plot der Faltungskinetik von EGFP.

Die Auftragung zeigt die Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung ( $k_{n \rightarrow d}$ ) und der Renaturierung ( $k_{d \rightarrow n}$ ) in einer halblogarithmischen Auftragung gegen die GuHCl-Konzentration. Die Geschwindigkeitskonstanten der durch GuHCl induzierten Entfaltung basieren auf Intensitätsänderung der Fluoreszenz bei 510 nm (●) und des Zirkulardichroismus im Nah-UV-Bereich bei 278 nm (▽). Die Geschwindigkeitskonstanten der Renaturierung repräsentieren die aus den Kurvenanpassungen resultierenden  $k_{d \rightarrow n}$  der schnellen  $k_1$  (○), mittleren  $k_2$  (△) und langsamen Phase  $k_3$  (□) und basieren auf Fluoreszenzmessungen bei 510 nm nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden in 6 M GuHCl. Die Linien bei der Denaturierung stellen jeweils die lineare Regressionsgerade zur Extrapolation der Konzentrationsabhängigkeit dar. Die Linien bei der Renaturierung dienen der Veranschaulichung und verdeutlichen den Trend der Kurvenverläufe. Die kinetischen Parameter der Faltung sind aus **Tabelle 7.1**, **Tabelle 7.2** und **Tabelle 7.3** zu entnehmen.

Die prozentuale Verschiebung der Amplitudenanteile mit steigender GuHCl-Konzentration, wenn auch nur anfänglich mehrphasig und im weiteren Verlauf mit apparent einphasiger Rückfaltungskinetik, ist ebenso von [Fukuda et al., 2000](#) und [Battistutta et al., 2000](#) für die GFP-Variante Cycle3 beschrieben worden. Die langsame Phase wurde hier einer Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung zugeordnet. Auch von [Enoki et al., 2004](#) wurden zwei langsamere Phasen der Rückfaltung (hier äquivalent zur langsamen und mittleren Phase), durch zeitabhängige Inkubation im denaturierten Zustand bei Doppelsprungexperimenten und durch Zugabe von Cyclophilin A, einer *cis/trans*-Isomerisierung der Proline zugeschrieben. Auch in eigenen Experimenten an EGFP ([Pultke, 2003](#)) konnte gezeigt werden, dass die langsame Phase der Renaturierungskinetik durch Zugabe von PPI (zweifacher Überschuss zu EGFP im Rückfaltungsansatz) um das Doppelte beschleunigt wird. Die Geschwindigkeitskonstante der schnellen Phase wurde aber auch um den gleichen Betrag erhöht, was letztlich nahelegt, dass die *cis/trans*-Isomerisierung der zehn Proline eine dominante Rolle im Rückfaltungsweg des EGFP spielt und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.



Der Vergleich mit der Literatur zeigt für die bestimmten kinetischen Parameter der Faltung von EGFP (siehe **Tabelle 3.1**) eine sehr gute Übereinstimmung zu den von ENOKI präsentierten drei langsameren von insgesamt fünf kinetischen Phasen der Rückfaltung der GFP-Variante Cycle3 (Enoki et al., 2004).

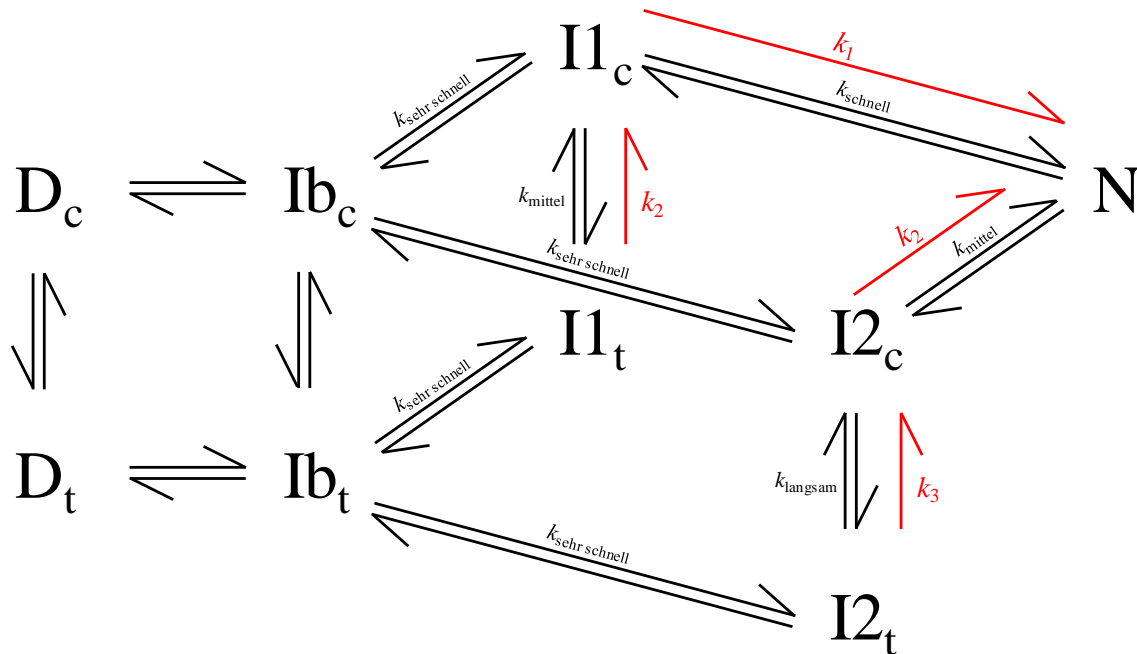
**Tabelle 3.1:** Vergleich der kinetischen Parameter der Renaturierung von EGFP und Cycle3.

Dargestellt sind die Geschwindigkeitskonstanten und relativen Amplituden der Renaturierung  $k_{d \rightarrow n}$  der schnellen  $k_1$ , mittleren  $k_2$  und langsamen Phase  $k_3$  von EGFP. Die Rückfaltung wurde nach dreistündiger Inkubationsdauer in 6 M GuHCl und nachfolgender Überführung in 0,1 M GuHCl eingeleitet und die spezifische Chromophor-Fluoreszenz bei 510 nm detektiert. Die Implementierung der kinetischen Parameter  $k_1$ ,  $k_2$  und  $k_3$  erfolgt in **Abbildung 3.23**.

		Geschwindigkeitskonstanten $k$ ( $s^{-1}$ ) und relative Amplituden $A$ (%)		
		schnelle Phase <sup>a</sup>	mittlere Phase <sup>b</sup>	langsame Phase <sup>c</sup>
Chromophor- Fluoreszenz (EGFP)	$k$ [ $s^{-1}$ ]	<b>0,206 ± 0,0012</b>	<b>0,0395 ± 0,00022</b>	<b>0,00608 ± 0,000056</b>
	$A$ [%]	<b>51,8 ± 0,21</b>	<b>42,2 ± 0,19</b>	<b>5,97 ± 0,07</b>
Chromophor- Fluoreszenz (Cycle3)*	$k$ [ $s^{-1}$ ]	0,154 ± 0,001	0,0270 ± 0,0001	0,00591 ± 0,00006
	$A$ [%]	34,5 ± 0,09	55,4 ± 0,1	13,1 ± 0,1

(\* Datenauszug aus Enoki et al., 2004); <sup>a</sup> entspricht  $k_1$ , <sup>b</sup> entspricht  $k_2$ , <sup>c</sup> entspricht  $k_3$  in **Abbildung 3.23**

Die weiterhin beschriebenen beiden schnellsten der fünf Phasen konnten nur unter Verwendung von *stopped-flow*-Methoden mit Fern-UV-CD-Messungen (225 nm) und über die Tryptophan-Fluoreszenz (Anregung bei 295 nm) in einem Zeitfenster weniger Sekunden dargestellt werden. Diese Techniken standen in der hier vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung und die postulierten *burst phase*- und *on-pathway molten globule state*-Intermediate konnten somit nicht gezeigt werden. Dennoch erlauben die vorliegenden Daten im Kontext der Literatur die Einordnung in das von ENOKI vorgeschlagene und derzeit umfassendste etablierte Faltungsmodell von Cycle3 (siehe **Abbildung 3.23**) und erweitern dieses Modell um die Faltung von EGFP in Gegenwart von Guanidiniumhydrochlorid (Enoki et al., 2004). Somit bestätigte sich auch, dass der Mechanismus der Rückfaltung dieser GFP-Varianten, zumindest für diese drei hier beschriebenen kinetischen Phasen, unabhängig von der verwendeten Denaturierungsmethode ist, also ob der entfaltete Zustand durch GuHCl oder durch saure pH-Werte hervorgerufen wurde.



**Abbildung 3.23:** Vereinfachtes Schema der Rückfaltung von EGFP aus dem GuHCl-induziert denaturierten Zustand.

Das von ENOKI vorgeschlagene (**Abbildung 1.8**) und nach JACKSON modifizierte Modell zeigt das Faltungsschema von GFP (Cycle3) mit der Implementierung der eigens erhobenen kinetischen Parametern (in rot) der EGFP-Rückfaltung aus dem 6 M GuHCl-induziert denaturierten Zustand (Enoki et al., 2004; Jackson et al., 2006). Zum Vergleich der Übereinstimmung der kinetischen Parameter siehe **Tabelle 3.1**.

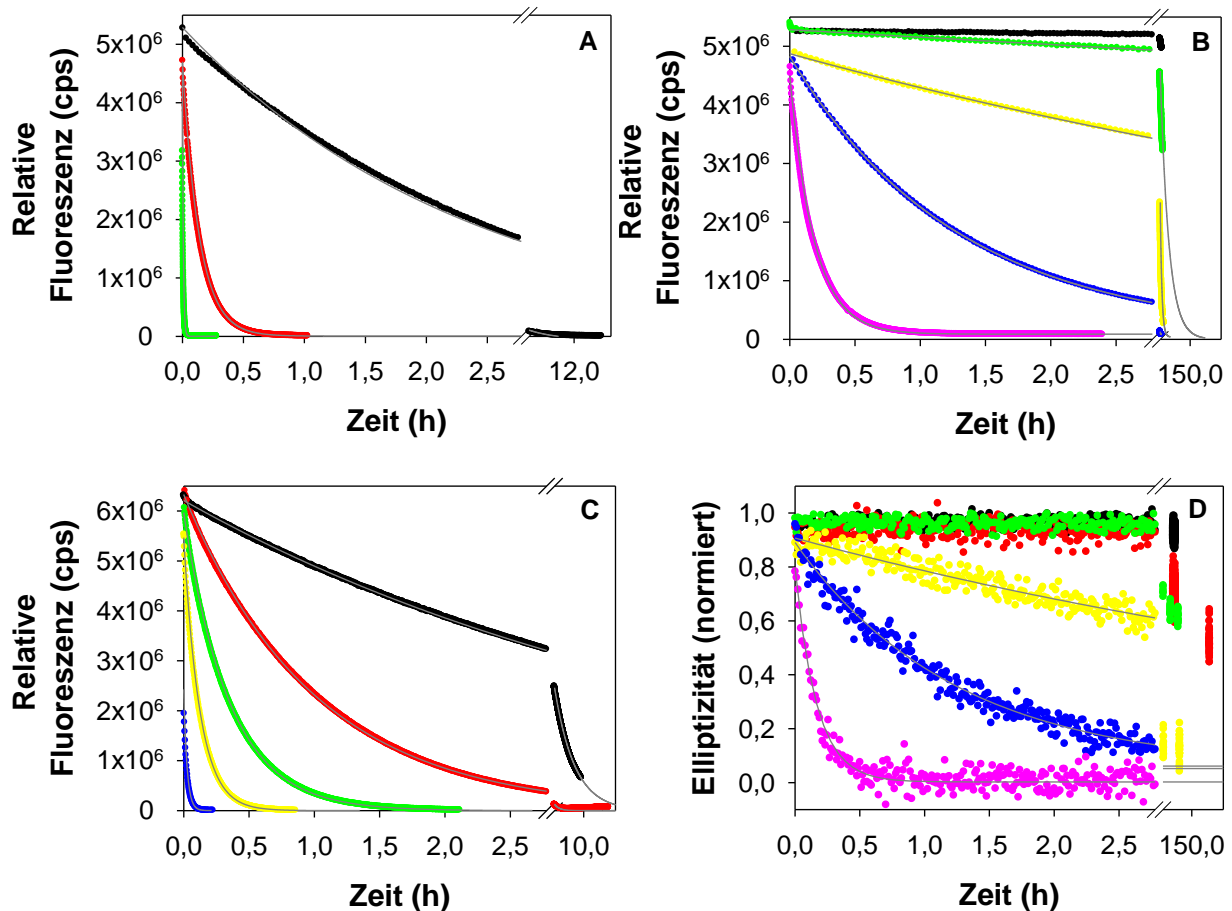
Das Modell geht davon aus, dass die Prozesse zur Denaturierung und Renaturierung allgemein reversibel sind. Jedoch werden keine Aussagen darüber getroffen, dass die Gleichgewichte zwischen den genannten Zuständen durch Aggregatbildung beeinflusst werden können. Bei den auf Fluoreszenz basierenden Langzeituntersuchungen, wie sie für die Denaturierung unter **3.5.1.** beschrieben wurden, zeigte sich für die Renaturierung keine vollständige Reversibilität im Faltungsprozess. Bei diesen bis zu 51 Tage andauernden Langzeituntersuchungen, in denen EGFP aus dem 6 M GuHCl-induziert denaturierten Zustand in steigende Denaturationskonzentrationen heraus verdünnt wurde, zeigte sich, dass nur maximal 50 % der zu erwartenden Intensität der Fluoreszenz zurückgewonnen werden konnte. Das legt nahe, dass EGFP durch zunehmende Inkubationsdauer im denaturierten Zustand einer zunehmenden Aggregation unterliegt. Der Grund für die Irreversibilität der Faltung von EGFP könnten die zwei Cysteine (Cys48 und Cys70) darstellen, welche unter nativen Bedingungen nicht Disulfidverbrückt sind. Trotz der Verwendung von Reduktionsmittel (DTT) in entgastem und mit  $N_2$  überschichteten Reaktionspuffern und Aufbewahrung im evakuierten Exsikkator könnten sich über die Zeit intra- und intermolekulare Disulfidbrücken gebildet haben, welche bei der Überführung aus dem denaturierten in den gefalteten Zustand zur Formierung von Aggregaten führten. Die Bildung irreversibler Aggregate mit zunehmender Inkubationsdauer aus dem

Denaturans- als auch dem Säure-induziert denaturierten Zustand wurde auch für *wtGFP* und *Cycle3* in der Literatur beschrieben (Fukuda et al., 2000, Battistutta et al., 2000, Enoki et al., 2004). Wenn es zu diesen Oxidationsprozessen im denaturierten Zustand kommt und Aggregation als Konkurrenz zur Rückfaltung auftritt, ist somit auch keine vollständige Renaturierung möglich. Darüber hinaus konnte auch in eigenen Arbeiten (Pultke, 2003) eine spontane Aggregation des EGFP nach Abreicherung des GuHCl aus dem denaturierten Zustand mit starker Abhängigkeit von der Temperatur und eingesetzter EGFP-Konzentration gezeigt werden. Der schnelle Reaktionsabschnitt, der initiale Schritt der Aggregation (Nukleation), ging in einen langsamen aber kontinuierlich steigenden Reaktionsabschnitt (unspezifische Assoziation) über. Die Nukleation repräsentiert eine definierte intermediäre Faltungsform, von der die Aggregation ausgeht. In der Literatur wird dieses Intermediat durch das Auftreten einer *lag*-Phase (Fukuda et al., 2000 für *Cycle3* und *wtGFP* gezeigt) in der Aggregationskinetik gekennzeichnet und diskutiert. Weitere Ergebnisse zur Aggregation werden unter **3.6.4.** beschrieben.

## **3.6. Denaturierung und Renaturierung des EGFP in Ionischen Flüssigkeiten**

### **3.6.1. Denaturierung des EGFP durch Ionische Flüssigkeiten**

In Gegenwart hoher Molaritäten Ionischer Flüssigkeiten konnte ein denaturierender Effekt auf das EGFP gezeigt werden. In der **Abbildung 3.24** ist dieser Effekt für die Ionischen Flüssigkeiten EMIM Cl, BMIM Cl und HMIM Cl dargestellt. Die Entfaltungskinetiken wurden über fluoreszenzspektroskopische Messungen (siehe **Abbildung 3.24 A-C**) beziehungsweise über Messungen im Nah-UV-CD-Bereich für das BMIM Cl (siehe **Abbildung 3.24 D**) durchgeführt. Die Kurvenanpassung erfolgte jeweils über eine exponentielle Funktion 1. Ordnung (siehe **Gleichung 2.8**). Die entsprechenden kinetischen Parameter der Entfaltung von EGFP sind in **Abbildung 3.25** dargestellt und in **Tabelle 7.3** gelistet. Die unterschiedlichen Methoden zur Messung der Denaturierung ergaben die gleichen kinetischen Parameter, diese waren für die Denaturierung in BMIM Cl und HMIM Cl unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration. Wie bereits für die Denaturierung in Gegenwart von GuHCl gezeigt, korreliert der Verlust der Tertiärstruktur der durch Ionische Flüssigkeiten induzierten Denaturierung direkt mit der Intensitätsabnahme der Fluoreszenz des Chromophors bei 510 nm.

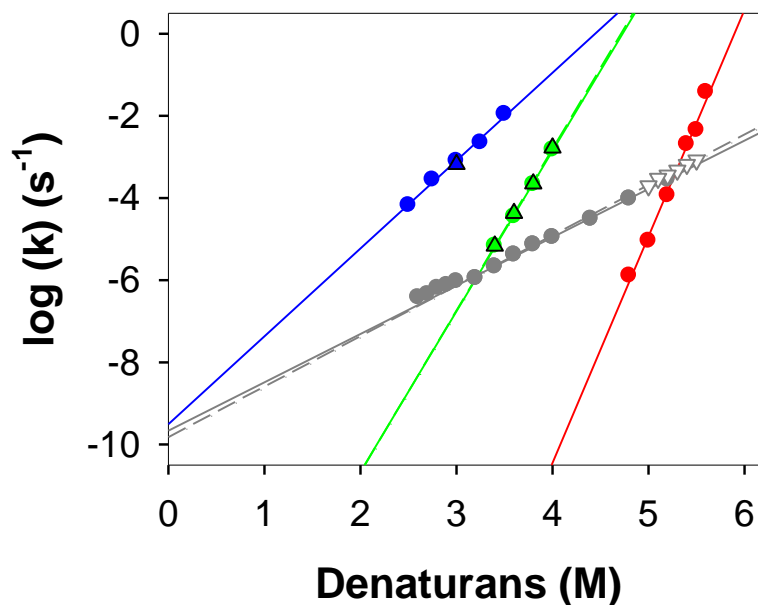


**Abbildung 3.24:** Chemisch induzierte Denaturierung von EGFP durch Ionische Flüssigkeiten.

(A) Denaturierungskinetik des EGFP in Gegenwart steigender EMIM Cl-Konzentrationen 5,2 M (●), 5,4 M (●), 5,6 M (●), (B) in Gegenwart steigender BMIM Cl-Konzentrationen 3,0 M (●), 3,4 M (●), 3,6 M (●), 3,8 M (●), 4,0 M (●) und (C) in Gegenwart steigender HMIM Cl-Konzentrationen 2,5 M (●), 2,75 M (●), 3,0 M (●), 3,25 M (●), 3,5 M (●). Der zeitliche Verlauf der Reaktion wurde anhand der Fluoreszenz (510 nm), bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm gegen die Inkubationszeit des EGFP in Gegenwart verschiedener Denaturanskonzentrationen aufgetragen. Der Kurvenverlauf wurde jeweils mit einer einfachen exponentiellen Funktion 1. Ordnung angepasst (durchgängige Linien). Gemessen wurde bei einer EGFP-Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 8,0 bei 30 °C mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungsspalt 5,0 nm; Emissionsspalt 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 104F QS,  $10 \times 4$  mm. (D) Abnahme der Elliptizität des EGFP im Nah-UV-CD-Bereich. Der zeitliche Verlauf der durch BMIM Cl-induzierten Denaturierung des EGFP wurde mittels Zirkulardichroismus bei einer Wellenlänge von 278 nm verfolgt. Gemessen wurde bei einer EGFP-Konzentration von 0,5 mg/ml in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an BMIM Cl 3,0 M (●), 3,2 M (●), 3,4 M (●), 3,6 M (●), 3,8 M (●), 4,0 M (●) bei 30 °C mit einem Jasco J-810 Spektropolarimeter. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,5 cm. In einem Abstand von 10 s wurde die Elliptizität detektiert, die Auflösung betrug 1 nm, die Bandenbreite 1 nm und die Zeitkonstante 8 s.

Für das EMIM Cl war dies in einem Konzentrationsbereich von 5,0 M - 5,6 M nicht zutreffend. Zu Beginn dieser Reaktion konnte anfänglich der denaturierende Einfluss der Ionischen Flüssigkeit durch eine Abnahme der Elliptizität bei 278 nm gezeigt werden. Jedoch wurde während der CD-Messungen mit Zunahme der Reaktionsdauer ein Aggregieren des Proteins ersichtlich. Dieser Effekt verstärkte sich mit Zunahme der EMIM Cl-Konzentration (siehe **Abbildung 3.27 B**). Eine Auswertung der Entfaltungskinetiken mittels Zirkulardichroismus im

Nah-UV-Bereich (278 nm) war somit in Gegenwart von EMIM Cl nicht möglich. Im Vergleich zu der durch GuHCl induzierten Denaturierung zeigte sich bei den Ionischen Flüssigkeiten der destabilisierende Effekt sehr viel kooperativer. Innerhalb eines Konzentrationsgefälles von 1 M Ionischer Flüssigkeit konnten Denaturierungskinetiken von wenigen Minuten bis mehrere Tage ermittelt werden. Für EMIM Cl lag dieser Konzentrationsbereich zwischen 4,8 und 5,6 M. Mit zunehmender Alkylkettenlänge der N-Substitution am 3-Methylimidazoliumchlorid verschob sich dieser Konzentrationsbereich zu geringeren molaren Konzentrationen der Ionischen Flüssigkeiten. Bei BMIM Cl lag dieser Bereich zwischen 3,2 M und 4,0 M und bei dem mit noch stärker ausgeprägtem hydrophoben Charakter des HMIM Cl zwischen 2,5 und 3,5 M. In **Abbildung 3.25** sind alle ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungskinetiken des EGFP ( $k_{n \rightarrow d}$ ) in Gegenwart von GuHCl und der Ionischen Flüssigkeiten veranschaulicht beziehungsweise in **Tabelle 7.3** gelistet. Für die hier getesteten N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloride konnte ein deutlich denaturierender Einfluss auf EGFP in Gegenwart hoher Konzentrationen Ionischer Flüssigkeiten nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.25:** Entfaltungskinetiken des EGFP in Gegenwart verschiedener Denaturanzien. Graphische Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung für GuHCl (●), EMIM Cl (●), BMIM Cl (●), HMIM Cl (●). Zu den auf Fluoreszenz basierenden Geschwindigkeitskonstanten (Kreise) wurden auch Entfaltungsparameter durch Zirkulardichroismus im Nah-UV-Bereich (278 nm) für GuHCl (Δ), BMIM Cl (▲) und HMIM Cl (▲) ermittelt. Durch die linearen Regressionsgeraden konnten die Anstiege ermittelt werden (durchgängigen Linien für Fluoreszenzmessungen und gestrichelte für CD-Messungen) und dienten auch der Extrapolation der Konzentrationsabhängigkeit. Die kinetischen Parameter der Entfaltung sind der **Tabelle 7.3** und die Anstiege der Regressionsgeraden der **Tabelle 7.4** zu entnehmen.

Mittels Fluoreszenz- und CD-spektroskopischer Methoden konnten jeweils übereinstimmende Geschwindigkeitskonstanten für die Entfaltung des EGFP ermittelt werden. Die Ionischen Flüssigkeiten zeigten eine deutlich größere Denaturierungsmittelabhängigkeit der Entfaltung

des EGFP als GuHCl. In einer halblogarithmischen Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung gegen die Denaturanskonzentration wurden für die Entfaltung des EGFP in Gegenwart von Ionischen Flüssigkeiten deutlich höhere Anstiege (m-Werte) ermittelt. Im Vergleich zum ermittelten m-Wert von etwa 1,25 für die Entfaltung in Gegenwart von GuHCl wurde in Gegenwart von HMIM Cl ein fast doppelt so hoher Anstieg und für BMIM Cl und EMIM Cl ein um Faktor 3 beziehungsweise 4,5 höherer m-Wert bestimmt. Durch den Vergleich der Anstiege untereinander lassen sich Aussagen über die Unterschiede des Übergangszustands treffen. Der m-Wert ist ein Maß für die Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface area*, SASA) und im Falle der Entfaltungskinetik direkt proportional zur Änderung zwischen dem nativen Zustand und dem Übergangszustand. Somit können über die Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustandes Aussagen zu dessen Kompaktheit getroffen werden. Im Falle der Ionischen Flüssigkeiten kann von einer größeren Änderung der SASA des Übergangszustandes als in Gegenwart von GuHCl ausgegangen werden und diese ist somit für die hier getesteten Denaturanzien wie folgt einzuordnen:

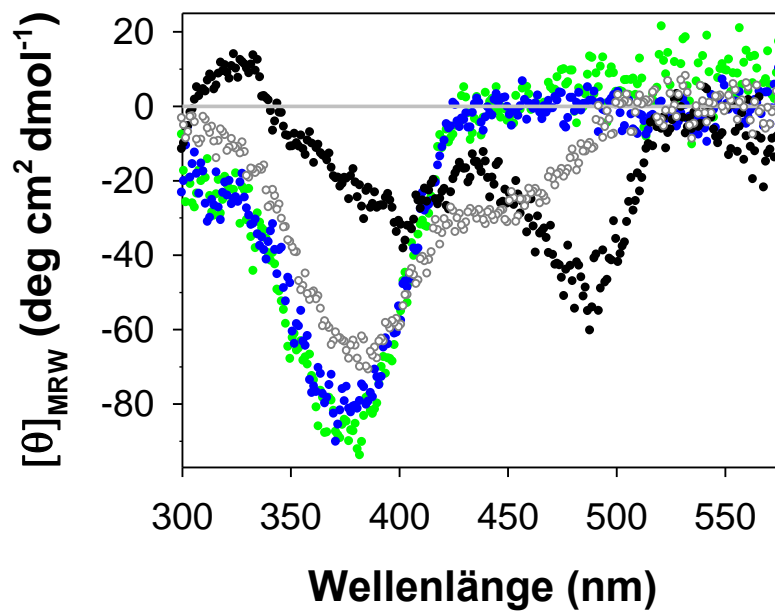


Somit unterscheidet sich der Übergangszustand im Vergleich zwischen Ionischen Flüssigkeiten und GuHCl durch eine größere Änderung der SASA und einer damit einhergehenden „aufgeweichteren“ Struktur (*fluffy*) in Gegenwart der Ionischen Flüssigkeiten.

### **3.6.2. Strukturelle Unterschiede im chemisch induzierten denaturierten Zustand von EGFP**

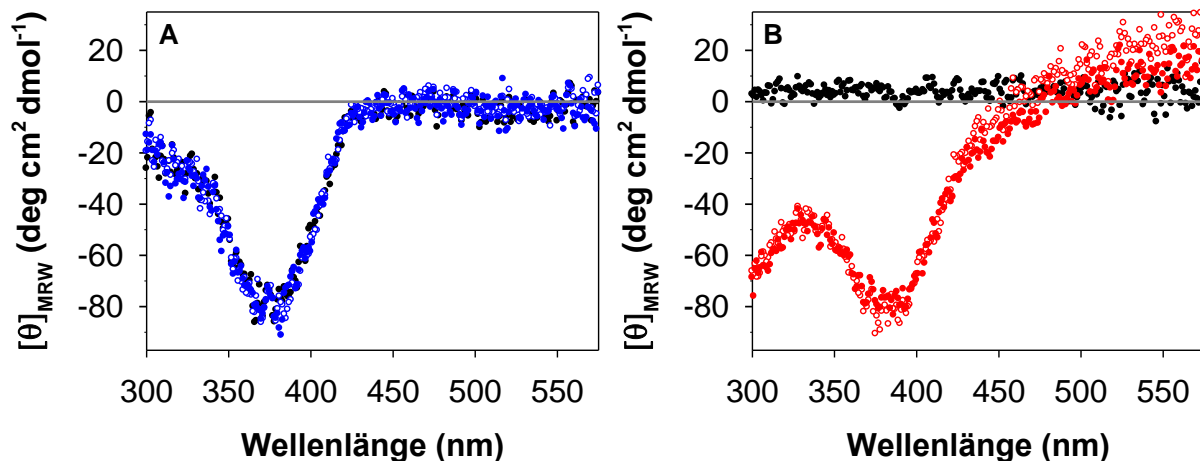
Anhand der Ergebnisse aus den Entfaltungsversuchen in Bezug auf Inkubationsdauer und Konzentration des Denaturans, wurden nach vollständig chemisch induzierter Denaturierung CD-Spektren im UV/VIS- Bereich aufgenommen. In **Abbildung 3.26** sind CD-Spektren von EGFP unter nativen und denaturierten Bedingungen dargestellt. Im spektralen VIS-Bereich wies EGFP deutliche CD-Signale sowohl im gefalteten als auch im entfalteten Zustand auf. Diese zeigen den charakteristischen Chromophor und dessen räumliche Umgebung. Die Unterschiede des durch GuHCl-induziert denaturierten und nativen EGFP sind unter **3.3.3.** beschrieben. Denaturiertes EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten ließ zudem noch weitere deutliche Unterschiede erkennen. Das Minimum bei etwa 385 nm mit der ausgeprägten Schulter bei ca. 442 nm, wie für den GuHCl-induziert denaturierten Zustand beschrieben, ließen

sich für den durch HMIM Cl und BMIM Cl induzierten denaturierten Zustand nicht erkennen. Wie in **Abbildung 3.26** für HMIM Cl und BMIM Cl ersichtlich, zeigte sich für das EGFP nach vollständiger Denaturierung ein Minimum bei etwa 378 nm. Diese VIS-CD-Spektren stimmten also nicht mit den CD-Spektren in Gegenwart von 6 M GuHCl und dem unter nativen Bedingungen überein.



**Abbildung 3.26:** CD-Spektren im VIS-Bereich von EGFP in Gegenwart verschiedener Denaturanzien. Die CD-Spektren im VIS-Bereich zeigen natives EGFP in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 (●) und denaturiertes EGFP in Gegenwart von 6 M GuHCl (○), 3,8 M BMIM Cl (●) und 3 M HMIM Cl (●), aufgenommen bei 30 °C. Gemessen wurde mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter und mit einer 0,5 cm Küvette. Die Auflösung betrug 1 nm, die Bandenbreite 1 nm und die Zeitkonstante 2 s, die Scangeschwindigkeit betrug 50 nm min<sup>-1</sup> beziehungsweise 100 nm min<sup>-1</sup>.

Die Unterschiede in den CD-Spektren legen nahe, dass der durch Ionische Flüssigkeiten induzierte denaturierte Zustand verschieden von dem des durch GuHCl induzierten ist. Für EGFP in EMIM Cl konnte ein ähnliches Spektrum mit einem Minimum bei etwa 378 nm gemessen werden. Mit fortschreitender Reaktionsdauer wurde die Signalintensität der Elliptizität im Bereich der Aromaten (250 nm - 350 nm) jedoch zunehmend geringer. Nach anschließender Zentrifugation des Reaktionsansatzes konnte im Überstand daraufhin kein CD-Signal im VIS-Bereich gemessen werden (siehe **Abbildung 3.27 B**). Dies spricht für ein Aggregieren des EGFP mit zunehmender Inkubationsdauer in Gegenwart hoher EMIM Cl-Konzentrationen. Für das entfaltete EGFP in HMIM Cl konnte vor und nach durchgeführter Ultrazentrifugation (232000g, 1 h, 4 °C) ein identisches CD-Spektrum erhalten werden, so dass eine Aggregation des EGFP unter diesen Reaktionsbedingungen auszuschließen ist (siehe **Abbildung 3.27 A**).

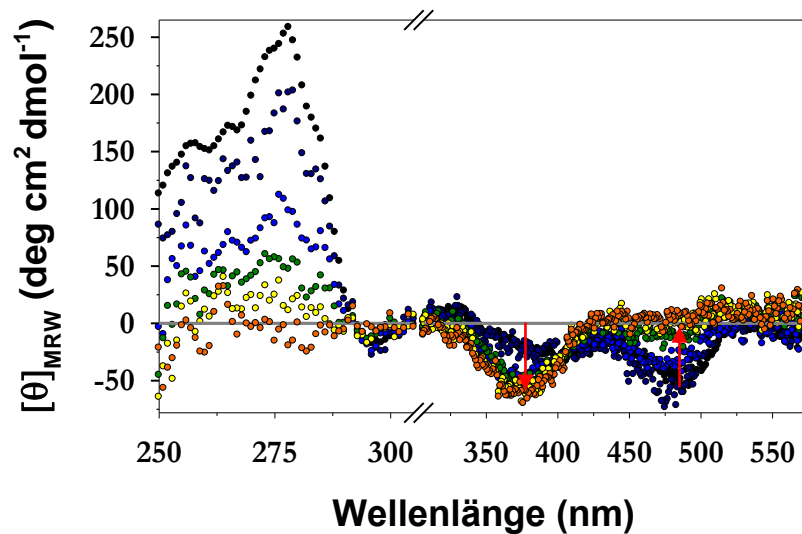


**Abbildung 3.27:** CD-Spektren im VIS-Bereich von EGFP in Gegenwart von Ionischen Flüssigkeiten bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und anschließender Ultrazentrifugation.

Die CD-Spektren im VIS-Bereich zeigen in (A) EGFP in Gegenwart 3 M HMIM Cl nach einer Inkubationszeit von 8 h (○), 92 h (●) und 96 h nach Ultrazentrifugation (●). In (B) sind CD-Spektren im VIS-Bereich von EGFP in Gegenwart 5,4 M EMIM Cl nach einer Inkubationszeit von 15 h (○), 2 Wochen (●) und 2 Wochen nach Ultrazentrifugation (●) gezeigt. Die Ultrazentrifugation wurde bei 232000g (1 h, 4 °C) durchgeführt. Gemessen wurde mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter und mit einer 0,5 cm Küvette bei 30 °C. Die Auflösung betrug 1 nm, die Bandenbreite 1 nm und die Zeitkonstante 2 s, die Scangeschwindigkeit betrug 100 nm min<sup>-1</sup>.

Ob die Unterschiede unter denaturierten Bedingungen auf Interaktionen zwischen den aromatischen Systemen des Chromophors und den Ionischen Flüssigkeiten oder auf der Ausbildung von Strukturelementen beruhen, welche durch die Ionischen Flüssigkeiten induziert werden, kann aus den Spektren im VIS-Bereich (300 nm - 575 nm) nicht abgeleitet werden. Die Elliptizität im Bereich der Aromaten war, wie auch für den GuHCl-induziert denaturierten Zustand (siehe **Abbildung 3.10 A**), sehr gering, was auf eine vollständige Entfaltung schließen lässt (siehe **Abbildung 3.28**). Aussagen zu Sekundärstrukturen durch CD-Spektroskopie konnten nicht erhoben werden, da die Ionischen Flüssigkeiten bei Wellenlängen unterhalb von 250 nm bei den gewählten IL-Konzentration zu stark absorbierten und somit eine Analyse im Fern-UV-Bereich nicht zuließen.



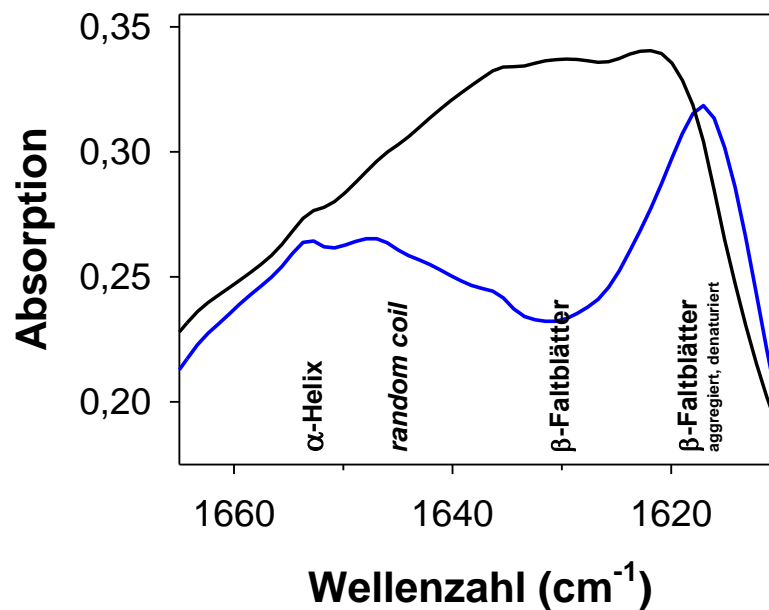


**Abbildung 3.28:** CD-Spektren im Nah-UV- und VIS-Bereich von EGFP in Gegenwart von BMIM Cl bei unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Die CD-Spektren im spektralen Bereich von 575 nm - 250 nm zeigen natives EGFP (●) und EGFP in Gegenwart von 3,4 M BMIM Cl nach einer Inkubationszeit von 8 h (●), 32 h (●), 59 h (●), 82 h (●) und 106 h (●). Gemessen wurde mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter und mit einer 0,5 cm Küvette bei 30 °C. Die Auflösung betrug 1 nm, die Bandenbreite 1 nm und die Zeitkonstante 2 s, die Scangeschwindigkeit betrug 100 nm min<sup>-1</sup>. Die roten Pfeile veranschaulichen die Bereiche, in denen mit zunehmender Inkubationszeit die deutlichsten Veränderungen der Intensität zu verzeichnen sind.

Aussagen über Veränderungen von Sekundärstrukturelementen konnten, zumindest in Gegenwart von HMIM Cl, mittels IR-Spektroskopie getroffen werden (siehe **Abbildung 3.29**). Die Bandenmuster im Bereich der Amid I-Bande verdeutlichten den Verlust von Sekundärstrukturelementen unter denaturierenden Bedingungen in HMIM Cl im Vergleich zum nativen EGFP. Der dominierende Anteil an  $\beta$ -Strängen um 1630 cm<sup>-1</sup> ging deutlich zurück, beziehungsweise verschob sich auf eine Wellenzahl um 1618 cm<sup>-1</sup>. Diesem Wellenzahlbereich können denaturierte und aggregierte  $\beta$ -Stränge zugeordnet werden ([Herberhold et al., 2003](#)). Die Bildung von Aggregaten in Gegenwart von 3 M HMIM Cl war so aus den vorhandenen Daten nicht zu erwarten (sie wurde bisher nur in Gegenwart von EMIM Cl gezeigt), könnte aber mit der für die IR-Messung erforderlichen, sehr hohen EGFP-Konzentration von 20 mg/ml begründet werden. Ein IR-Vergleichsspektrum von EGFP in Gegenwart von GuHCl beziehungsweise GuDCl konnte, wie unter **3.3.4.** beschrieben, mit der hier verwendeten FTIR-Spektroskopie nicht dargestellt werden. Somit stellte sich zwar ein Unterschied zwischen dem nativen und dem HMIM Cl-induziert denaturierten Zustand dar (ebenso für den thermisch-induzierten denaturierten Zustand; Daten nicht gezeigt), aber der direkte Vergleich zum denaturierten EGFP in Gegenwart von GuHCl war nicht möglich. Die ATR-FTIR-Spektroskopie (*attenuated total reflectance FTIR spectroscopy*) ist eine Methode, die IR-Messungen auch in Gegenwart hoher Konzentrationen von GuHCl bzw. GuDCl (> 6 M)

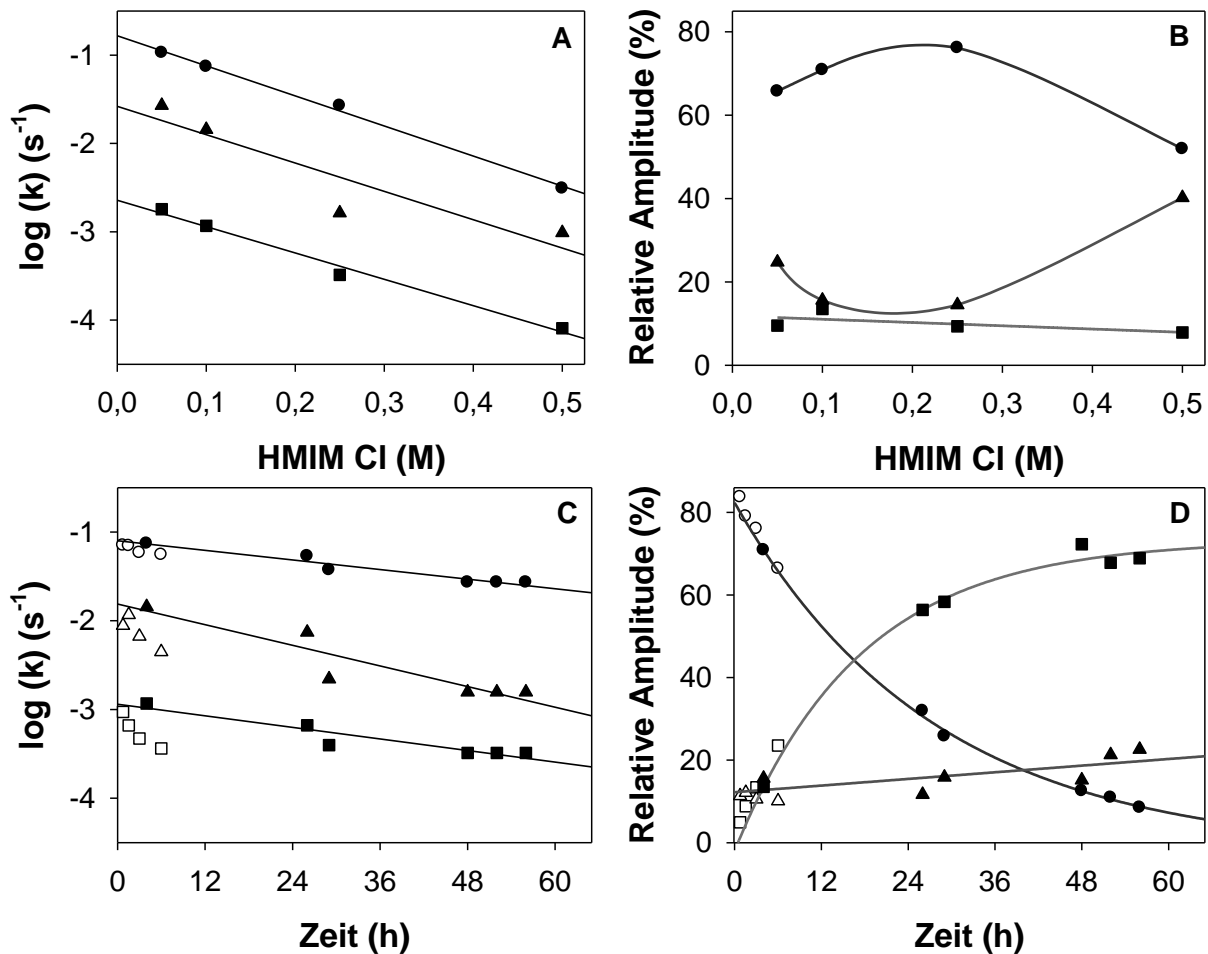
zulassen würde (Oberg & Fink, 1998; Speare & Rush III, 2002), jedoch stand diese Methode im Zeitraum der Erhebung dieser Daten nicht zur Verfügung.



**Abbildung 3.29:** Infrarotspektren von nativem EGFP und in Gegenwart von HMIM Cl. Im Bereich der Amid I-Bande sind die unterschiedlichen spektralen Eigenschaften von nativem EGFP (—) und für 5 Tage in 3 M HMIM Cl inkubiertes EGFP (—) dargestellt. Die IR-Spektren wurden bei 30 °C im Wellenzahlbereich von 4000  $\text{cm}^{-1}$  bis 400  $\text{cm}^{-1}$  mit 32 *scans* bei einer spektralen Auflösung von 2  $\text{cm}^{-1}$  und einer Blackman-Harris-3-Term-Apodisierung mit Zerofill-Faktor 2 aufgenommen. Gemessen wurde an einem IR-Spektrometer Vector 22 mit einem DTGS-Detektor (*Bruker*). Die Schichtdicke der BaF<sub>2</sub>-Fenster betrug 56  $\mu\text{m}$ . Die EGFP-Konzentration betrug 20 mg/ml in 50 mM Tris; 50 mM NaCl; 2 mM EDTA, pD 8,0.

### 3.6.3. Renaturierung des EGFP aus HMIM Cl in Abhängigkeit der Konzentration und Inkubationsdauer

Für die Renaturierungsversuche wurde EGFP bei einer Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml in Gegenwart von 3 M HMIM Cl denaturiert. Sowohl der Einfluss der Denaturierungsdauer auf die Renaturierung in Bezug auf die kinetischen Parameter und Amplituden als auch der Einfluss der Konzentration der Ionischen Flüssigkeit im Rückfaltungspuffer wurden untersucht. Unter **3.6.1.** (siehe **Abbildung 3.24 C**) wurde beschrieben, dass eine Inkubationsdauer von mindestens 2 Stunden erforderlich war, um bei dieser Konzentration an HMIM Cl das EGFP vollständig zu denaturieren. Für die in **Abbildung 3.30 (A und B)** beschriebenen Untersuchungen an EGFP wurde daher erst nach einer vierstündigen Inkubationsdauer des EGFP in 3 M HMIM Cl renaturiert.



**Abbildung 3.30:** Renaturierung von EGFP in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubationszeit in Gegenwart von HMIM Cl.

Aus einem Denaturierungsansatz mit 0,3 mg/ml EGFP in 3 M HMIM Cl wurde EGFP in einen Renaturierungspuffer mit steigenden Konzentrationen an HMIM Cl überführt. Die Renaturierungskinetik wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Der Reaktionsverlauf wurde mit einer dreifach exponentiellen Gleichung angepasst. Die resultierenden Geschwindigkeitskonstanten ( $k_1(\bullet)$ ;  $k_2(\blacktriangle)$ ;  $k_3(\blacksquare)$ ) nach 4 h Denaturierungsdauer sind in **A** und der jeweilige prozentuale Anteil der Amplitude ( $\text{amp}_1(\bullet)$ ;  $\text{amp}_2(\blacktriangle)$ ;  $\text{amp}_3(\blacksquare)$ ) in **B** dargestellt. Nach Überführung des EGFP in einen Renaturierungspuffer mit 0,1 M HMIM Cl zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Renaturierungskinetik in Abhängigkeit der Inkubationsdauer untersucht. Der Reaktionsverlauf wurde mit einer dreifach exponentiellen Gleichung angepasst. Die resultierenden Geschwindigkeitskonstanten ( $k_1(\bullet)$ ;  $k_2(\blacktriangle)$ ;  $k_3(\blacksquare)$ ) sind in **C** und der jeweilige prozentuale Anteil der Amplitude ( $\text{amp}_1(\bullet)$ ;  $\text{amp}_2(\blacktriangle)$ ;  $\text{amp}_3(\blacksquare)$ ) in **D** dargestellt. Gemessen wurde bei einer EGFP-Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0 mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungswellenlänge 490 nm, Fluoreszenzemission 510 nm, Anregungsspalt 5,0 nm; Emissionsspalt 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 101F QS, 10  $\times$  10 mm. Die kinetischen Parameter der Renaturierung sind der **Tabelle 7.5** zu entnehmen.

Die zusätzlich eingetragenen kinetischen Parameter ( $k_1(\circ)$ ;  $k_2(\Delta)$ ;  $k_3(\square)$ ) in **C** und ( $\text{amp}_1(\circ)$ ;  $\text{amp}_2(\Delta)$ ;  $\text{amp}_3(\square)$ ) in **D** sind aus **Tabelle 7.6**. Die Renaturierung wurde unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt und die Kinetik ebenfalls mit einer dreifach exponentiellen Gleichung angepasst.

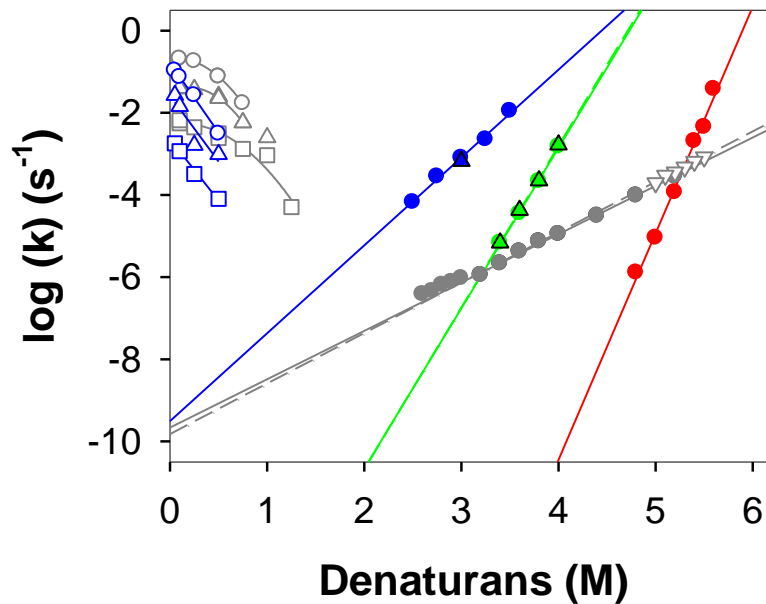
Nach Überführung des EGFP (5  $\mu\text{g/ml}$ ) in den Renaturierungspuffer mit steigenden Konzentrationen an HMIM Cl wurden die Kinetiken fluoreszenzspektroskopisch bei einer Wellenlänge von 510 nm verfolgt. Der Reaktionsverlauf wurde mit einer dreifach exponentiellen Gleichung angepasst (siehe **Gleichung 2.13**). Die resultierenden Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  bis  $k_3$  und Amplituden sind in **Abbildung 3.30** dargestellt und

in **Tabelle 7.5** gelistet. Mit zunehmender HMIM Cl Konzentration verlangsamte sich die Geschwindigkeit der Rückfaltung und zwar gleichmäßig bei allen drei Phasen der Reaktion. Die für die Renaturierung aus dem GuHCl-induziert denaturierten Zustand dargestellte Veränderung der Rückfaltung von einem dreiphasigen zu einem einphasigen Reaktionsverlauf mit steigender GuHCl-Konzentration (siehe **Abbildung 3.21**) konnte für das HMIM Cl, zumindest in diesem Konzentrationsbereich an HMIM Cl, nicht gezeigt werden. Jedoch waren die den einzelnen Phasen zugeordneten Amplituden in ihren relativen Anteilen ähnlich verschoben. Der Anteil der Amplitude der schnellen Phase ( $amp_1$ ) ist bei 50 mM HMIM Cl im Rückfaltungsansatz mit 65 % gegenüber 25 % der mittleren Phase ( $amp_2$ ) stark dominierend. Diese Verteilung wurde mit steigenden Konzentrationen noch erhöht. Bei 0,5 M HMIM Cl kam es jedoch zu einer Angleichung der prozentualen Verteilung von  $amp_1$  und  $amp_2$ . Die Amplitude der langsamen Phase ( $amp_3$ ) blieb hingegen bei steigenden Konzentrationen mit etwa 10 % relativen Anteils unverändert. Dieser Wert für  $amp_3$  entspricht in etwa dem der für  $amp_3$  in Gegenwart von GuHCl ermittelten. Ob die Amplitude der langsamen Phase im weiteren Verlauf bei HMIM Cl-Konzentrationen über 0,5 M hinaus an Dominanz gewinnt oder die Kinetik der Rückfaltung, wie für GuHCl gezeigt, zweiphasig beziehungsweise einphasig wird, konnte nicht geklärt werden. Eine Rückfaltung bei Konzentrationen oberhalb von 0,5 M HMIM Cl würde aufgrund der geringen Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich von Tagen liegen und wurde in dieser Versuchsanordnung nicht umgesetzt. Eine zunehmende Dominanz der langsamen Phase wäre aber aus den Daten zur Renaturierung aus dem GuHCl induzierten Zustand (siehe **3.5.2.**) zu erwarten, da hier die langsame Phase der Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung zugeordnet wurde, welche mit steigender Denaturationskonzentration zunehmend dominierte und der zeitbestimmende Faktor bei der Rückfaltung war. Wäre dies nicht der Fall, würde das bedeuten, dass die Ionischen Flüssigkeiten den Reaktionsmechanismus der Rückfaltung verändern würden. Um Näheres über die Bedeutung der einzelnen Phasen bei der Rückfaltung zu erfahren, wurde EGFP in Abhängigkeit der Inkubationszeit im HMIM Cl-induziert denaturierten Zustand untersucht. In **Abbildung 3.30 (C und D)** sind die kinetischen Parameter der Renaturierung, welche ebenso aus einer dreifach exponentiellen Kurvenanpassung erhalten wurden (siehe **Gleichung 2.13**), in Abhängigkeit der Denaturationsdauer des EGFP in 3 M HMIM Cl dargestellt und in **Tabelle 7.5** gelistet. Die Änderung der Intensität während der Renaturierungskinetik nach Überführung des EGFP (5 µg/ml) in einen Renaturierungspuffer mit 0,1 M HMIM Cl wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten über mehrere Stunden mittels Fluoreszenzspektroskopie bei einer Wellenlänge von 510 nm verfolgt. Mit zunehmender Inkubationsdauer kam es zu einer leichten Verlangsamung

der Rückfaltungskinetik. Diese Geschwindigkeitsabnahme war bei  $k_1$ ,  $k_2$  und  $k_3$  nahezu gleich ausgeprägt, mit einer leichten Tendenz einer Angleichung der beiden langsameren Reaktionen. Die prozentuale Verteilung der entsprechenden Amplituden unterlag indessen stärkeren Veränderungen. Der Anteil der Amplitude der schnellen Phase ( $amp_1$ ) machte bei kurzen Inkubationszeiten den Hauptanteil aus. Mit Zunahme der Denaturierungsdauer kam es zu einer stetigen Abnahme auf unter 10 % nach 56 Stunden. Die Amplitude der langsamen Phase ( $amp_3$ ) gewann hingegen mit steigender Inkubationszeit an Bedeutung und machte zum selben Zeitpunkt etwa 70 % aus. Für  $amp_2$  der mittleren Phase konnte hingegen eine leichte Erhöhung des relativen Anteils von etwa 15 % auf etwa 20 % mit fortlaufender Inkubationszeit verzeichnet werden. Eine ähnliche Verschiebung der relativen Amplitudenverhältnisse in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer unter denaturierenden Bedingungen ist auch von [Enoki et al., 2004](#) für die Cycle3 Mutante beschrieben. Ausgehend vom Säure-induziert denaturierten Zustand (pH 2,0) konnten für die Renaturierung mit andauernder Inkubation eine deutliche Abnahme der Amplitude der schnellen Phase von 70 % auf 10 % bei gleichzeitigem Zugewinn der relativen Anteile der beiden langsamen Phasen gezeigt werden. Hier dominierte jedoch die Amplitude der mittleren Phase und nicht, wie in **Abbildung 3.30 D** gezeigt, die der langsamen Phase. Dies verdeutlicht, wie von [Enoki et al., 2004](#) beschrieben, dass beide Phasen anteilig an der Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung beteiligt sind. In Gegenwart von HMIM Cl lag die Wichtung jedoch deutlich auf Seiten der langsamen Phase.

Aus den Daten zur Faltung von EGFP (siehe **Abbildung 3.31**) geht der unterschiedlich starke Einfluss der verwendeten Denaturanzien auf die Denaturierung hervor. In Gegenwart von Ionischen Flüssigkeiten zeigt sich eine deutlich höhere Kooperativität im Vergleich zu GuHCl. Bei HMIM Cl handelt es sich mit einem Gleichgewichtsübergang bei etwa 1,5 M um ein stärkeres Denaturierungsmittel als GuHCl mit einem Gleichgewichtsübergang bei etwa 1,8 M – 2,2 M. Für BMIM Cl und EMIM Cl wurden diese Werte nicht ermittelt, da die kinetischen Parameter der Renaturierung nicht bestimmt wurden und eine Aussage diesbezüglich nur anhand der Denaturierungskinetiken nicht möglich ist. Die konzentrationsabhängige Rückfaltung von EGFP in Gegenwart von HMIM Cl zeigte ebenso wie in Gegenwart von GuHCl drei Phasen. Mit steigender Denaturanzkonzentration verlangsamte sich die Rückfaltungskinetik, der Charakter der Kinetik blieb jedoch nahezu unverändert. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit führte die Rückfaltung aus HMIM Cl-induziert denaturierten Bedingungen zu einer deutlichen Abnahme der Amplitude der schnellen Phase welche mit einer entsprechenden Zunahme der Amplituden der beiden langsameren Phasen

einherging. Die Faltung von EGFP in Ionischen Flüssigkeiten kann somit auch nach der Modellvorstellung, wie in **Abbildung 3.23** dargestellt, beschrieben werden.

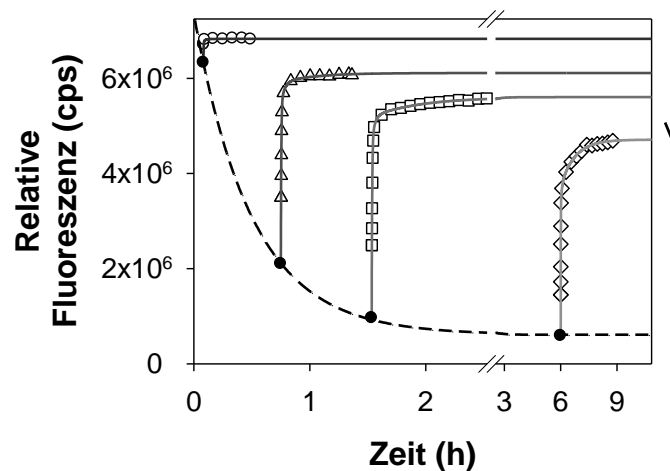


**Abbildung 3.31:** Chevron-Plot der Faltungskinetik von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl. Die Auftragung zeigt die Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung ( $k_{n \rightarrow d}$ ) und der Renaturierung ( $k_{d \rightarrow n}$ ) in einer halblogarithmischen Auftragung gegen die Denaturanskonzentration. Dargestellt sind die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung basierend auf Intensitätsänderung der Fluoreszenz bei 510 nm für GuHCl (●), EMIM Cl (●), BMIM Cl (●), HMIM Cl (●) und des Zirkulardichroismus im Nah-UV-Bereich bei 278 nm für GuHCl (▽), BMIM Cl (▲) und HMIM Cl (▲). Die Geschwindigkeitskonstanten der Renaturierung repräsentieren die aus den Kurvenanpassungen resultierenden  $k_{d \rightarrow n}$  der schnellen  $k_1$  (○), mittleren  $k_2$  (△) und langsamen Phase  $k_3$  (□) für GuHCl, sowie der schnellen  $k_1$  (○), mittleren  $k_2$  (△) und langsamen Phase  $k_3$  (□) für HMIM Cl und basieren auf Fluoreszenzmessungen bei 510 nm. Die Linien bei der Denaturierung stellen jeweils die lineare Regressionsgerade zur Extrapolation der Konzentrationsabhängigkeit dar. Die Linien bei der Renaturierung sind zur Veranschaulichung und verdeutlichen den Trend der Kurvenverläufe. Die kinetischen Parameter der Faltung sind aus **Tabelle 7.1** bis **Tabelle 7.3**, **Tabelle 7.5** und die Anstiege der Regressionsgeraden der **Tabelle 7.4** zu entnehmen.

Unter denaturierten Bedingungen wurde mittels Zirkulardichroismus im VIS-Bereich in Ionischen Flüssigkeiten ein zum GuHCl-induziert denaturierten verschiedener Zustand gezeigt. Durch die verwendeten spektroskopischen Methoden konnte dieser Zustand jedoch nicht weiter spezifiziert werden. In Gegenwart hoher Konzentrationen an EMIM Cl wurde überdies die Bildung von Aggregaten beobachtet, welche durch Zentrifugation vollständig abgetrennt werden konnten. Jedoch blieb EGFP unter denaturierten Bedingungen in 3 M HMIM Cl über mehrere Tage in Lösung. Dennoch war die Reversibilität der EGFP-Faltung in Gegenwart von HMIM Cl mit etwa 50 % nach zwei Tagen Denaturierungszeit nicht vollständig gegeben. Ausführungen hierzu werden im folgenden Kapitel näher beschrieben.

### 3.6.4. Aggregation im denaturierten Zustand

In **Abbildung 3.32** sind Renaturierungskinetiken von EGFP in Abhängigkeit der Inkubationsdauer (5 min bis 6 h) in HMIM Cl dargestellt. Der Reaktionsverlauf wurde mit einer dreifach exponentiellen Gleichung angepasst (siehe **Gleichung 2.13**). Die kinetischen Parameter sind in **Abbildung 3.30** (C und D) dargestellt und **Tabelle 7.6** gelistet. Die hier ermittelten Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden passten sehr gut zu den bisherigen Ergebnissen und ergänzen die kinetischen Parameter der Renaturierung in Gegenwart von HMIM Cl im Bereich geringer Inkubationsdauer.



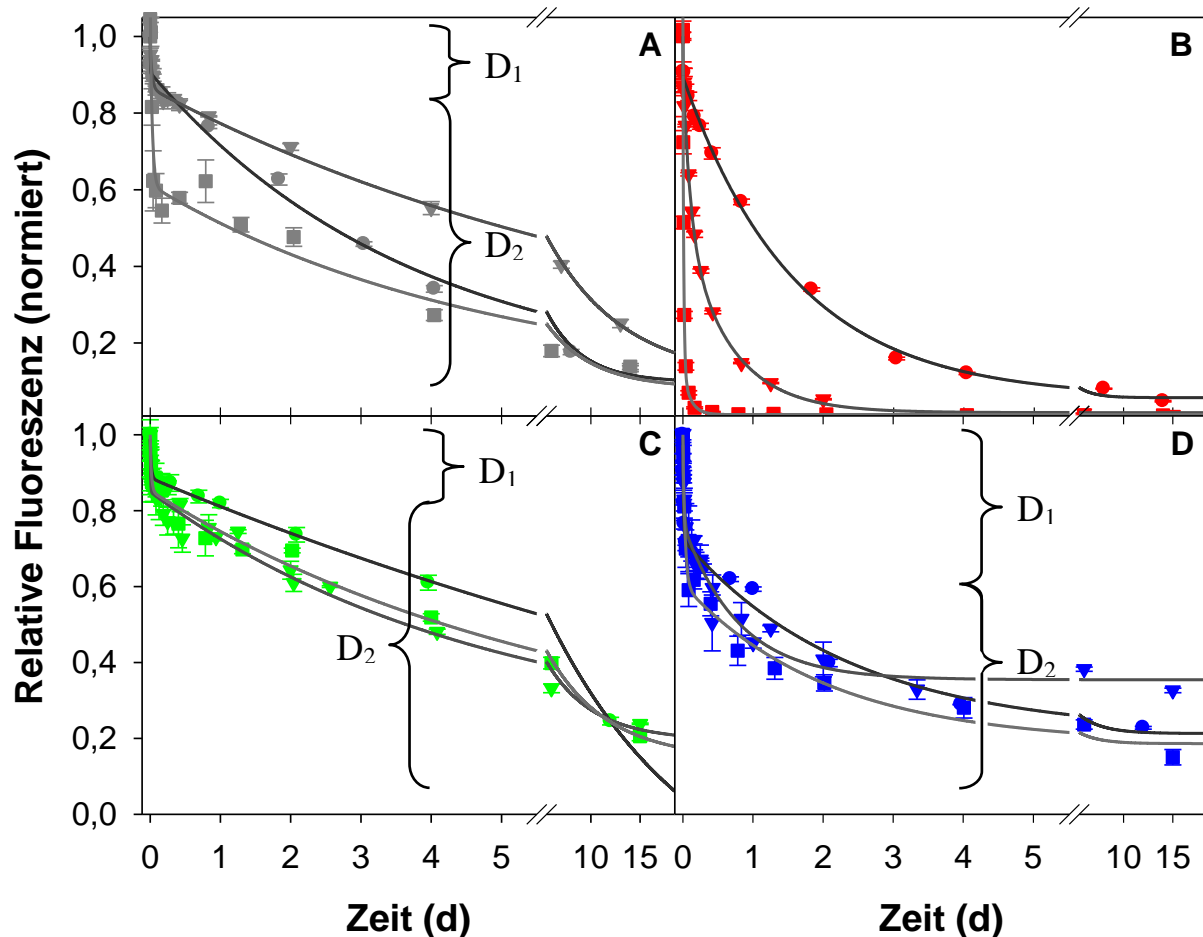
**Abbildung 3.32:** Verlust der Faltungsausbeute von EGFP in Abhängigkeit der Inkubationsdauer in HMIM Cl. Aus einem Denaturierungsansatz mit 0,3 mg/ml EGFP in 3 M HMIM Cl wurde EGFP in einen Renaturierungspuffer mit 0,1 M HMIM Cl überführt. Die Renaturierung wurde nach 5 min (○), 45 min (Δ), 92 min (□) und (◇) 6 h fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. Der kinetische Verlauf der Renaturierung wurde jeweils mit einer dreifach exponentiellen Gleichung angepasst. Die resultierenden Geschwindigkeitskonstanten ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ) und Amplituden ( $\text{amp}_1$ ,  $\text{amp}_2$ ,  $\text{amp}_3$ ) sind in **Tabelle 7.6** und in **Abbildung 3.30** dargestellt. Die aus den Kurvenanpassungen erhaltenen  $y_0$ -Werte (●) spiegeln, in deren zeitlichen Verlauf und einfach exponentieller Kurvenanpassung (gestrichelte Linie), die Entfaltung des EGFP im Denaturierungsansatz wider. Der Pfeil (↓) verdeutlicht die Abnahme der Faltungsausbeute mit zunehmender Inkubationsdauer. Gemessen wurde bei einer EGFP-Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0 mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungswellenlänge 490 nm, Fluoreszenzemission 510 nm, Anregungsspalt 5,0 nm; Emissionsspalt 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 101F QS,  $10 \times 10$  mm.

Darüber hinaus wurde auch für jeden Inkubationszeitpunkt aus der Renaturierungskinetik  $y_{(0)}$  bestimmt. Die aus den Kinetiken ermittelten Anfangsintensitäten sollten den Verlauf der Denaturierungskinetik des Proteins im Denaturierungsansatz entsprechen. Dies konnte durch einfach exponentielle Kurvenanpassung (siehe **Gleichung 2.8**) der  $y_{(0)}$ -Werte gezeigt und eine Geschwindigkeitskonstante von  $5,56 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden. Dieser Wert stimmte sehr gut mit dem in **Tabelle 7.3** gelisteten Wert für die ermittelte Geschwindigkeitskonstante der Denaturierung von EGFP in Gegenwart von 3 M HMIM Cl überein.

Aus den Renaturierungskinetiken in **Abbildung 3.32** wurde eine abnehmende maximale Fluoreszenzintensität mit Zunahme der Denaturierungsdauer ersichtlich. Nach Überführung des EGFP, nach 5-minütiger Inkubationsdauer im Denaturierungsansatz, in den Rückfaltungsansatz ergab die Fluoreszenzintensität nahezu 100 % des unter nativen Bedingungen erreichten Niveaus. Eine nach 6 Stunden Inkubation eingeleitete Renaturierung führte hingegen nur zu circa 70 % Faltungsausbeute. Die Abnahme der Faltungsausbeute in Abhängigkeit der Inkubationsdauer konnte auch in Gegenwart anderer Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl gezeigt und im Folgenden detaillierter beschrieben werden. Für weiterführende Untersuchungen wurde Guanidiniumhydrochlorid als typisches Denaturans und eine Reihe von N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden mit zunehmender Kettenlänge benutzt, um deren Einfluss zu untersuchen. Eine weitere Variation bestand in den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen im Denaturierungsansatz (0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 2,5 mg/ml EGFP). Die Konzentration der Denaturanzien (GuHCl und Ionische Flüssigkeit) wurde jeweils so gewählt, dass EGFP nach zwei- bis dreistündiger Inkubationszeit vollständig denaturiert vorlag. Die entsprechend einzusetzende Molarität der Denaturanzien wurde aus den Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierungskinetiken abgeleitet, welche in **Tabelle 7.3** und in **Abbildung 3.25** dargestellt sind. Zu verschiedenen Zeitpunkten, über einen Zeitraum von zwei Wochen, wurde EGFP (5 µg/ml) aus diesen Ansätzen heraus in einen Rückfaltungspuffer überführt und fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Nach 24 Stunden Renaturierungsdauer wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen und das Intensitätsmaximum gegen die Inkubationsdauer der Denaturierung aufgetragen. Wie in **Abbildung 3.33** ersichtlich, kam es bei allen vier getesteten Verbindungen zu einer Verringerung der Faltungsausbeute mit steigender Denaturierungszeit, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung. Der Kurvenverlauf der abnehmenden Faltungsausbeute mit zunehmender Inkubationsdauer unter denaturierenden Bedingungen wies zweiphasigen Charakter auf und wurde mit einer zweifach exponentiellen Gleichung angepasst (siehe **Gleichung 2.10**). Die kinetischen Parameter der Kurvenanpassungen sind in **Tabelle 7.7** aufgeführt. Die Geschwindigkeitskonstanten der nur wenige Stunden umfassenden ersten Phase ( $D_1$ ) entsprachen jeweils etwa den Geschwindigkeitskonstanten, die für die Denaturierung von EGFP in den vier getesteten Denaturanzien bei den entsprechenden Konzentrationen ermittelt wurden (siehe **Tabelle 7.3**). Die Geschwindigkeit, mit der die Ausbeute in der ersten Phase der Kinetik abnahm, korrelierte offenbar direkt mit der Denaturierung des EGFP. Wie aus den Faltungsdaten in Gegenwart von HMIM Cl ersichtlich (siehe **Abbildung 3.30 C und D**), werden auch mit zunehmender Inkubationsdauer für die Renaturierung drei kinetische Phasen beschrieben. Somit kann davon



ausgegangen werden, dass in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer, dem Modell zur Faltung von EGFP (siehe **Abbildung 3.23**) entsprechend, alle beschriebenen Intermediate bei der Rückfaltung aus  $D_1$ , mit zunehmender Dominanz der Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung, durchlaufen werden.



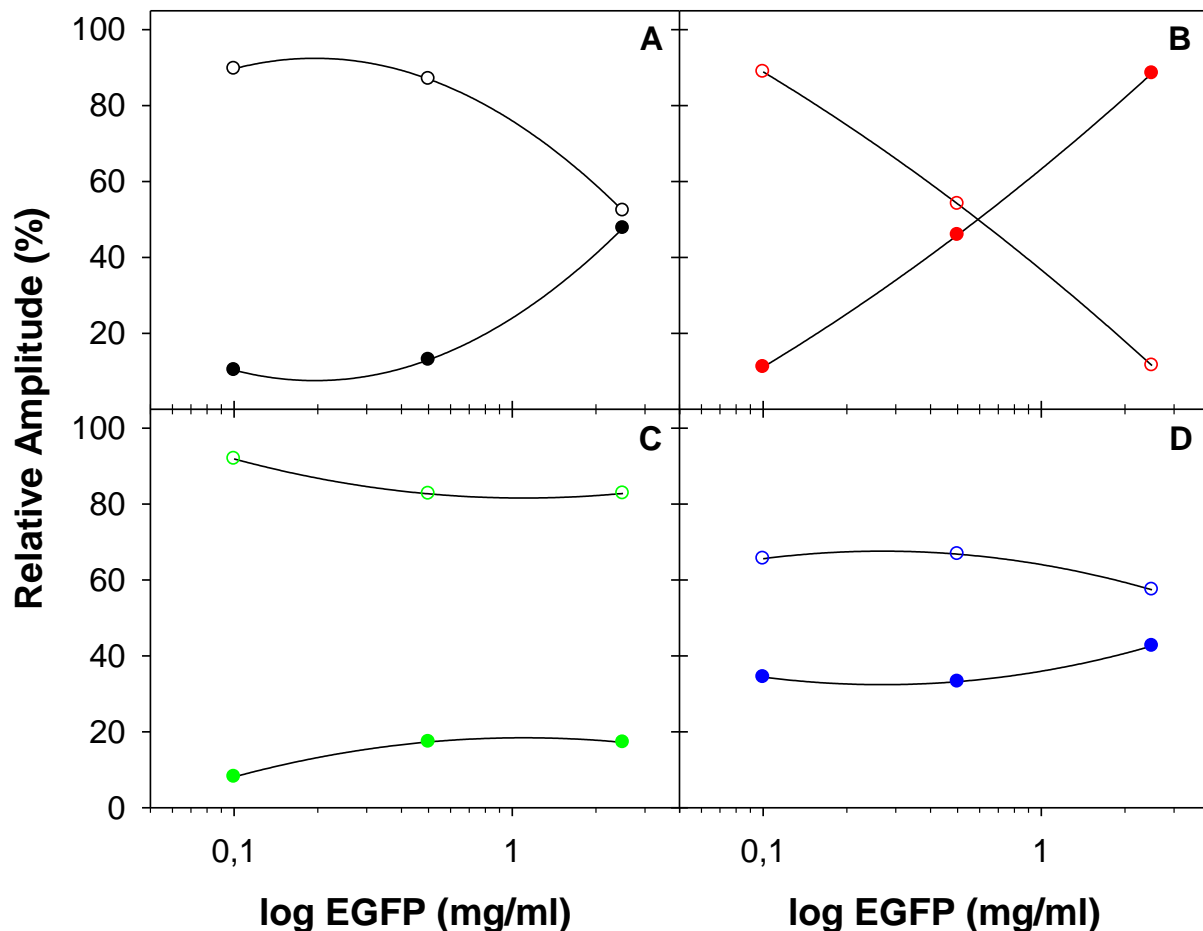
**Abbildung 3.33:** Verlust der Faltungsausbeute von EGFP in Gegenwart von GuHCl und verschiedener Ionischer Flüssigkeiten in Abhängigkeit von der Denaturierungszeit und Proteinkonzentration.

In einem Denaturierungsansatz mit 5,5 M GuHCl (A), 5,4 M EMIM Cl (B), 3,9 M BMIM Cl (C) und 3,0 M HMIM Cl (D) wurde EGFP in unterschiedlichen Konzentrationen 0,1 mg/ml (Kreise), 0,5 mg/ml (Dreiecke) und 2,5 mg/ml (Quadrate) inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeitpunkten wurde EGFP in einen Renaturierungspuffer überführt. Nach 24 h wurde der gemittelte Wert der Fluoreszenzintensität (510 nm) aus drei Messreihen normiert gegen die Inkubationsdauer der Denaturierung aufgetragen. Die Abnahme der Fluoreszenz mit zunehmender Inkubationszeit wurde mit einer zweifach exponentiellen Gleichung (Linien) angepasst. Die EGFP-Konzentration im Rückfaltungsansatz betrug 5  $\mu\text{g/ml}$  in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8,0. Die Endkonzentration der Ionischen Flüssigkeiten im Rückfaltungsansatz betrug 0,1 M (bei 0,5 mg/ml und 2,5 mg/ml EGFP) beziehungsweise 0,3 M (bei 0,1 mg/ml EGFP). Gemessen wurde mit einem Fluoromax 3 mit folgenden Einstellungen: Anregungswellenlänge 490 nm, Fluoreszenzemission 510 nm, Anregungsspalt 5,0 nm; Emissionsspalt 2,0 nm; S/R Modus, Hellma 104F QS, 10  $\times$  4 mm. Die kinetischen Parameter sind in **Tabelle 7.7** gelistet. Durch die Klammern wird die Amplitude der jeweiligen Phase dargestellt und die Zweiphasigkeit der Kinetik veranschaulicht. Die jeweilige Phase wird zudem den denaturierten Zuständen  $D_1$  und  $D_2$  zugeordnet (siehe **Abbildung 3.35**).

Letztlich spiegelt dies die bereits beschriebene nicht vollständige Reversibilität der EGFP-Faltung wider und zeigt den Rückgang der Faltungsausbeute während der Entfaltung in

Abhängigkeit der Denaturierungszeit bis zum Erreichen des denaturierten Zustands. Wie in **Abbildung 3.33** dargestellt repräsentiert die Amplitude der schnellen Phase ( $amp_1$ ) den prozentualen Rückgang der Faltungsausbeute bis zum Ende der ersten Phase ( $D_1$ ). Respektiv bedeutet dies zu diesem Zeitpunkt eine Ausbeute in Gegenwart von HMIM Cl von etwa 65 % und bei BMIM Cl von etwa 85 %. In Gegenwart von GuHCl waren es bis zu einer EGFP-Konzentration von 0,5 mg/ml etwa 90 % und bei 2,5 mg/ml wirkte sich die hohe Proteinkonzentration offenbar negativ aus, da hier nur etwa 50 % Ausbeute erreicht wurden. Bei EMIM Cl war der Effekt der Proteinkonzentration deutlich ausgeprägter erkennbar und es wurden bis zum Erreichen des denaturierten Zustands (Ende der ersten Phase) Ausbeuten von 90 %, 50 % und 10 % bei den entsprechenden Proteinkonzentrationen von 0,1 mg/ml – 2,5 mg/ml erzielt. Die Geschwindigkeitskonstanten des zweiten Teils der Kinetik ( $D_2$ ), die den Verlust der Faltungsausbeute mit zunehmender Inkubationsdauer unter denaturierten Bedingungen beschreibt, wurden mit Ausnahme der Werte in Gegenwart von EMIM Cl jeweils im Bereich von  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  s<sup>-1</sup> beschrieben. Damit war die Abnahme der Faltungsausbeute im zweiten Teil der Reaktion im Vergleich zur ersten Phase ( $D_1$ ) um zwei bis drei Größenordnungen verlangsamt. EGFP scheint hier also im denaturierten Zustand Veränderungen zu unterliegen, die eine Rückfaltung in den nativen Zustand verhindert. Die Veränderungen könnten auf unspezifische Modifikationen durch Oxidation zum Beispiel der beiden Cysteine (Cys48 und Cys70) zurückzuführen sein (Fukuda et al., 2000) und eine Bildung von Aggregaten zur Folge haben. Dies für EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten über SDS-PAGE anhand von Oligomer- oder Aggregatbildung nachzuweisen war jedoch nicht möglich, da eine Proteinfällung in Ionischen Flüssigkeiten (siehe **2.2.3.1.**) nur bedingt möglich und das Laufverhalten im SDS-Gel stark beeinträchtigt war. Eine Aggregatbildung mit andauernder Denaturierungszeit in Ionischen Flüssigkeiten war dennoch anzunehmen. Zwar konnte durch Ultrazentrifugation gezeigt werden, dass EGFP in Gegenwart von 3 M HMIM Cl auch nach dreitägiger Denaturierungszeit keine größeren abtrennbaren Aggregate bildete (siehe **Abbildung 3.27**), dennoch könnten sich in Ionischen Flüssigkeiten lösliche Mikroaggregate formiert haben, aus denen heraus eine Renaturierung des EGFP nicht mehr möglich ist. Gleiches könnte auch der Fall sein, wenn EGFP, wie unter **3.6.2.** beschrieben, strukturellen Veränderungen in Gegenwart hoher Konzentrationen Ionischer Flüssigkeiten unterlag aus welchen sich, nach deren Abreicherung im Rückfaltungsansatz Aggregate bildeten. Dass es sich in Gegenwart von 5,4 M EMIM Cl bei hohen EGFP-Konzentrationen um die Bildung größerer Aggregate handelte, war jedoch anzunehmen, da dies bereits in anderen Versuchsreihen gezeigt werden konnte und auch visuell deutlich erkennbar war. Aufgrund der

Aggregation sind die hier ermittelten Geschwindigkeitskonstanten, die den Verlust der Faltungsausbeute beschreiben, als apparente Werte zu verstehen. Ob die Bildung der Aggregate auf intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zurückzuführen war, konnte jedoch nicht geklärt werden. Deutlich war jedoch, dass die Proteinkonzentration in Gegenwart von HMIM Cl und BMIM Cl bei den hier vorliegenden Konzentrationen keinen großen Einfluss auf die Abnahme der Faltungsausbeute ausübte, wie an der prozentualen Verteilung der beiden Amplituden der zweiphasigen Kinetik zu erkennen ist (siehe **Abbildung 3.34**).

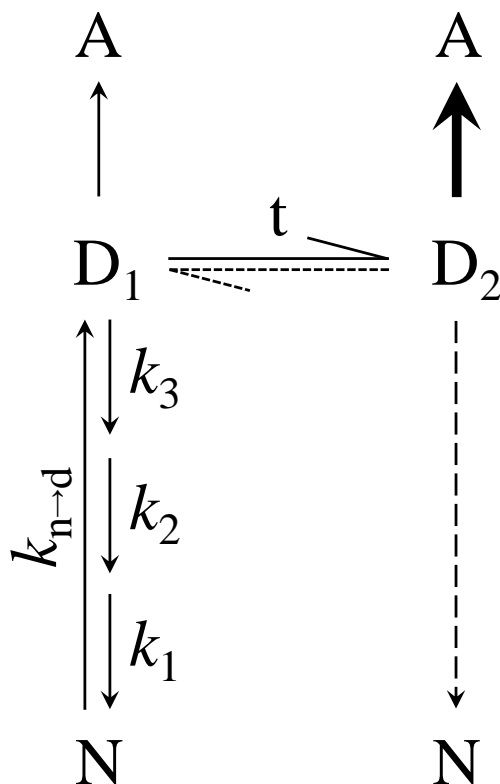


**Abbildung 3.34:** Prozentuale Verteilung der beiden Amplituden die den Verlust der Faltungsausbeute von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl in Abhängigkeit der Proteinkonzentration abbilden.

Die Abnahme der Faltungsausbeute mit zunehmender Denaturierungszeit (siehe **Abbildung 3.33**) wurde mit einer zweifach exponentiellen Gleichung angepasst. Dargestellt sind die beiden aus der Kurvenanpassung erhaltenen Amplituden **amp<sub>1</sub>** (gefüllte Kreise) und **amp<sub>2</sub>** (leere Kreise) mit ihrem jeweiligen prozentualen Anteil in einer halblogarithmischen Auftragung gegen die Proteinkonzentration (0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 2,5 mg/ml). **A** zeigt die Amplituden, welche aus den Reaktionen mit GuHCl, **B** mit EMIM Cl, **C** mit BMIM Cl und **D** mit HMIM Cl hervorgehen. Zudem sind diese Parameter in **Tabelle 7.7** gelistet.

Die in der Literatur für *wtGFP* und die Mutanten S65T und Cycle3 beschriebene nicht vollständige Reversibilität der Faltung (Battistutta et al., 2000; Fukuda et al., 2000; Enoki et al., 2004) mit zunehmender Verweildauer im entfaltenen Zustand, induziert durch Harnstoff,

GuHCl oder durch saure pH-Werte (pH 2,0), wurde hier für das EGFP ebenfalls in Gegenwart von GuHCl und Ionischen Flüssigkeiten nachgewiesen und charakterisiert. Mit zunehmender Inkubationszeit unter denaturierenden Bedingungen kam es verstärkt zum Verlust der Faltungsausbeute. Die Kinetik, mit der die Ausbeute mit zunehmender Denaturierungszeit abnahm, zeigte biphasischen Charakter. Darauf basierend lässt sich ein vereinfachtes Modell der Faltung von EGFP zur Beschreibung des Verlustes der Faltungsausbeute in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl aufstellen (siehe **Abbildung 3.35**).



**Abbildung 3.35:** Vereinfachte schematische Darstellung der Faltung von EGFP zur Beschreibung des Verlustes der Faltungsausbeute in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl.

Natives EGFP (**N**) geht unter denaturierenden Bedingungen in Ionischen Flüssigkeiten oder GuHCl in den denaturierten Zustand (**D<sub>1</sub>**) und mit zunehmender Inkubationszeit (**t**) in einen zweiten denaturierten Zustand (**D<sub>2</sub>**) über. Aus dem jeweiligen denaturierten Zustand (**D<sub>1</sub>** oder **D<sub>2</sub>**) kann EGFP nach **N** zurückgeführt werden oder geht unter Bildung von unspezifischen Aggregaten (**A**) der Faltungsausbeute verloren. Nach der Modellvorstellung (siehe **Abbildung 3.23**, Symbolik wurde übernommen) repräsentiert **D<sub>1</sub>** alle Intermediate **I<sub>1c</sub>**; **I<sub>2c</sub>**; **I<sub>b</sub>c**; **I<sub>1t</sub>**; **I<sub>2t</sub>**; **I<sub>b</sub>t** und die zwei denaturierten Zustandsformen **D<sub>c</sub>** (mit korrekter) und **D<sub>t</sub>** (mit inkorrekt Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung im Vergleich zum nativen Protein). **D<sub>2</sub>** repräsentiert die Spezies mit inkorrekt Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Konformation **und** hauptsächlich Zustände beziehungsweise Modifikationen, welche zur Irreversibilität der Renaturierung durch Aggregation führen. **k<sub>1</sub>**, **k<sub>2</sub>** und **k<sub>3</sub>** symbolisieren die Geschwindigkeitskonstanten der Faltung, **k<sub>n→d</sub>** der Entfaltung aus dem Chevron-Plot. Die durch gestrichelte Pfeile gekennzeichneten Reaktionswege sind theoretisch möglich, sie waren experimentell nicht verifizierbar.

Die Bildung des Zustands (**D<sub>1</sub>**) beschreibt den Verlust der Ausbeute bei der Rückfaltung, den EGFP bis zum Erreichen des denaturierten Zustands erfährt und führt größtenteils zum nativen EGFP (**N**). Der negative Einfluss der Kettenlänge der Ionischen Flüssigkeiten auf die Faltungsausbeute bei der Rückführung in den nativen Zustand ausgehend von **D<sub>1</sub>** steigt mit zunehmender Länge. Es konnten folgende Abhängigkeiten zwischen den Ionischen Flüssigkeiten bezogen auf die Ausbeuten (Angaben in %) beim Übergang von **D<sub>1</sub>** zu **N** dargestellt werden:

$$\text{EMIM Cl (90 \%)} > \text{BMIM Cl (85 \%)} > \text{HMIM Cl (65 \%)}.$$

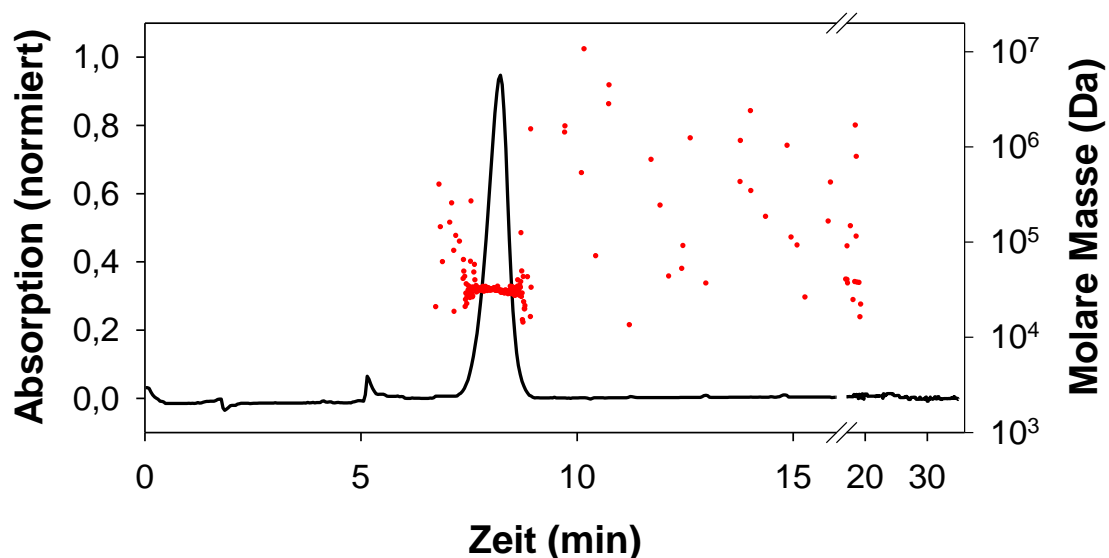
Mit zunehmender Inkubationsdauer unter denaturierenden Bedingungen ist EGFP sowohl in Gegenwart von GuHCl als auch Ionischer Flüssigkeiten nicht genau spezifizierbaren Veränderungen unterlegen, und eine Rückfaltung aus **D<sub>2</sub>** führt zu einer deutlich erniedrigten Ausbeute bei der Rückfaltung. Hierbei könnten unspezifische Modifikationen durch Oxidation der beiden Cysteine (Cys48 und Cys70), als auch mögliche Interaktionen der Ionischen Flüssigkeiten mit, oder oxidative Prozesse an dem Chromophor unter anhaltend denaturierenden Bedingungen ausschlaggebend sein. Weiterhin könnte es durch ungünstige Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Konformationen der zehn Proline unter länger andauernden denaturierten Bedingungen bei der Rückfaltung zur Population nicht fluoreszierender oder fehlerhafter, zur Aggregation neigender Spezies und somit vermehrt zur Aggregation (**A**) kommen. Der Verlust der Faltungsausbeute bei der Rückfaltung aus **D<sub>2</sub>** ist im Vergleich zu **D<sub>1</sub>** dominierend. Eine eingeleitete Rückfaltung nach zweiwöchiger Denaturierungszeit aus **D<sub>2</sub>** führte zu folgender Abhängigkeit:

$$\text{HMIM Cl} = \text{BMIM Cl} \gg \text{EMIM Cl}.$$

In Gegenwart von BMIM Cl und HMIM Cl konnte EGFP auch nach wochenlanger Inkubationszeit noch in den nativen Zustand überführt werden, da sich die Faltungsausbeute zwischen 20 % und 35 % stabilisiert hatte. Hingegen führte die starke Abhängigkeit der Proteinkonzentration in Gegenwart von EMIM Cl zum kompletten Verlust der Ausbeute. Die hier nach Zentrifugation erhaltenen Pellets zeigten nach Aufnahme in 8 M GuHCl und Rekonstitution in einem Rückfaltungspuffer eine teilweise Rückfaltung, die zu einer Ausbeute < 10 % führte. Bei der Bildung der Aggregate handelte es sich also größtenteils um einen irreversiblen Prozess.

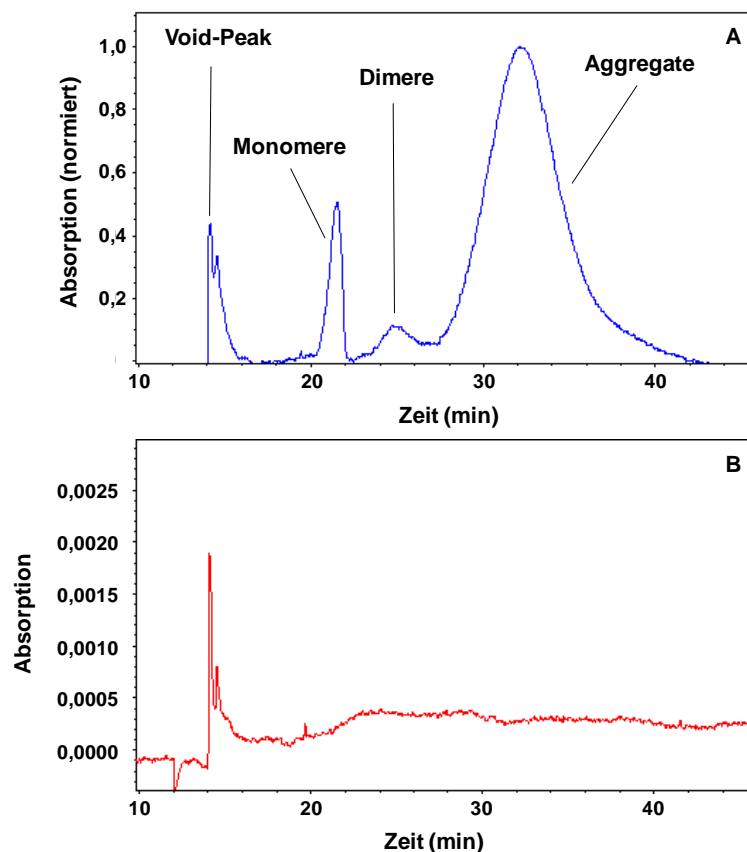
### 3.7. Oligomerisierung in Ionischen Flüssigkeiten

Aus den bisherigen Erkenntnissen aus Denaturierung und Renaturierung zeigte sich, gerade bei langen Inkubationszeiten im denaturierten Zustand, dass EGFP in Gegenwart hoher Konzentrationen Ionischer Flüssigkeiten die Tendenz zur Aggregation aufweist. Da in Gegenwart hochkonzentrierter EMIM Cl-Lösungen dies bereits visuell sichtbar war, aber für HMIM Cl nicht eindeutig gezeigt werden konnte (siehe **Abbildung 3.27**), sollte dies im Folgenden näher untersucht werden. Um eine Zustandsbeschreibung des EGFP in Bezug auf den Oligomerisierungsgrad beziehungsweise den Aggregationsstatus in Gegenwart hoher Konzentrationen HMIM Cl durchzuführen, wurde eine Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (AF4) durchgeführt. Mittels AF4 ist es möglich, Aggregationsstufen der Größe nach aufzutrennen. Mit einem sequenziell geschalteten Streulichtdetektor konnte das Molekulargewicht der einzelnen Fraktionen bestimmt werden. **Abbildung 3.36** stellt die Messung mittels AF4 von EGFP bei einer Konzentration von 50 µg/ml unter nativen Bedingungen dar. Das Elutionsprofil wies erwartungsgemäß ein Peak auf. Das mittlere Molekulargewicht ergab etwa 31 kDa und stimmte mit der theoretischen Masse von 27061 Da für EGFP im Rahmen der Messgenauigkeit überein.



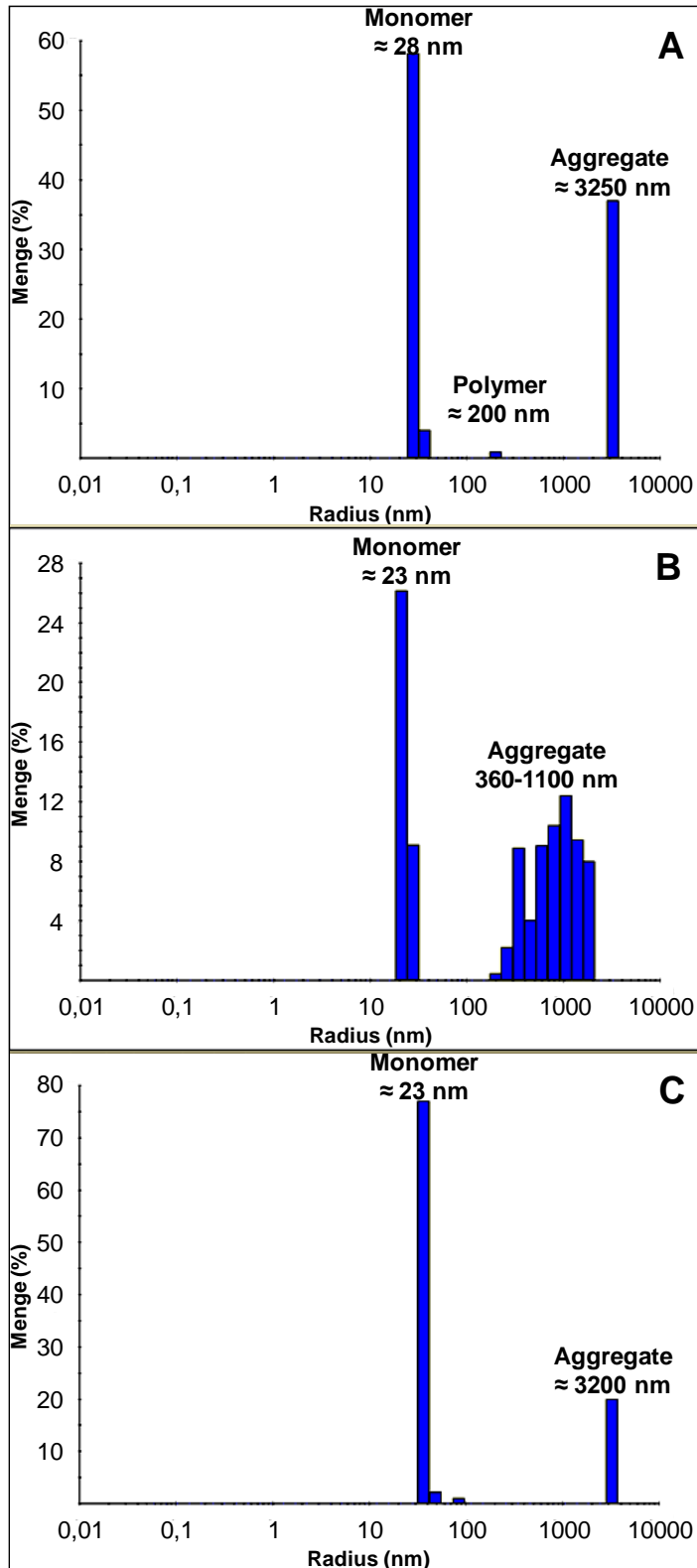
**Abbildung 3.36:** Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (AF4) mit EGFP. Die AF4-Messungen mit EGFP (—) wurden an einem Eclipse 2 Separation System (Wyatt Technology Europe, Dernbach) vermessen. Die mobile Phase (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) wurde filtriert (MWCO 0,1 µm). Bei einem Fluss der Trägerflüssigkeit von 1 ml min<sup>-1</sup> wurde die Probe über eine 100 µl Probeschleife in den Trennkanaal injiziert. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml gelöst unter Pufferbedingungen, welche der mobilen Phase entsprechen. Mit einem sequenziell geschalteten Streulichtdetektor (Mini Dawn Tristar; Wyatt Technology, USA) wurde die mittlere molare Masse (●) der Elutionsfraktion bestimmt.

Der Monomer-Status für natives EGFP konnte somit gezeigt werden. Nach einer 2-tägigen Inkubationszeit des EGFP (1 mg/ml) in Gegenwart von 3 M HMIM Cl zeigte das Elutionsprofil das Vorhandensein verschiedener oligomerer Spezies (siehe **Abbildung 3.37 A**). Der *Void-Peak* markiert den Start der Separation und im Folgenden eluierten Monomer, Dimer und ein großer Teil kleinerer Aggregate. Von den für diese Messung eingesetzten 16  $\mu\text{g}$  konnten 7,4  $\mu\text{g}$  EGFP den Eluatfraktionen zugeordnet werden. Die übrigen 54 % lagen in größeren Aggregaten vor und wurden durch einen Filter mit einer Ausschlussgröße von 0,1  $\mu\text{m}$  zurückgehalten. Bei der Messung einer zweiten Probe (1,95 mg/ml EGFP), welche über den Zeitraum von 1 Woche unter gleichen Bedingungen inkubiert wurde, konnten keine verschiedenen oligomeren Spezies des EGFP durch die AF4-Messung detektiert werden (siehe **Abbildung 3.37 B**). Die Wiederfindungsrate der Probe betrug 0 %, was auf ein komplettes Aggregieren zu Partikeln größer 0,1  $\mu\text{m}$  hindeutete.



**Abbildung 3.37:** Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (AF4) mit EGFP in Gegenwart von HMIM Cl. **A** zeigt das Elutionsprofil der AF4-Messung von EGFP (1 mg/ml) in Gegenwart von 3 M HMIM Cl (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) und einer Inkubationszeit von 2 Tagen. In **B** ist EGFP (1,95 mg/ml) in Gegenwart von 3 M HMIM Cl (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) und einer Inkubationszeit von 1 Woche dargestellt. Die Proben wurden jeweils auf eine finale EGFP-Konzentration von 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mit der mobilen Phase verdünnt. Es wurden 800  $\mu\text{l}$  in den Trennkanal injiziert. Die AF4-Messungen wurden an einem Eclipse 2 Separation System (Wyatt Technology Europe, Dernbach) gemessen. Die mobile Phase (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) wurde filtriert (MWCO 0,1  $\mu\text{m}$ ).

Ähnliche Aussagen zum Oligomer-Status ließen sich auch durch die Messung der Proben mittels dynamischer Lichtstreuung treffen. **Abbildung 3.38** stellt jeweils die hydrodynamischen Radien eines Monomer-Status mit 28 nm (**A**) beziehungsweise 23 nm (**B**) und Aggregaten mit 3250 nm (**A**) beziehungsweise mit 360 – 1100 nm (**B**) dar.



**Abbildung 3.38:** DLS-Messung von EGFP in 3 M HMIM Cl zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius.

Für die DLS-Messungen wurden jeweils 100 µl Probe mittels eines DynaPro-Streulichtdetektors (Wyatt Technology, USA) gemessen. EGFP lag bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml und einer Inkubationszeit von 2 Tagen (**A**) beziehungsweise bei 1,95 mg/ml und einer Inkubationszeit von 1 Woche (**B**) in Gegenwart von 3,0 M HMIM Cl (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0) vor. Die in **B** gezeigte Probe wurde im Anschluss 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und unter gleichen Bedingungen gemessen **C**. Für die Berechnung der hydrodynamischen Radien wurde die Viskosität einer 6% Ethylen-glykol-Lösung zugrunde gelegt.



Der hydrodynamische Radius des Monomers war für ein globuläres Protein einer Größe von 27 kDa überdimensioniert. Die Ursache dafür könnte sein, dass zum einen bei einer Konzentration von 3 M HMIM Cl bei den entsprechend langen Inkubationszeiten EGFP im denaturierten Zustand vorliegt und somit keine globuläre Struktur angenommen werden kann. Zum anderen hängt die Berechnung zur Bestimmung der hydrodynamischen Radien bei der dynamischen Lichtstreuung stark von der Viskosität des Lösungsmittels ab. Als Berechnungsgrundlage für die Bestimmung der hydrodynamischen Radien wurde hier der Wert für die Viskosität einer 6 %-igen Ethylenglykol-Lösung zugrunde gelegt, welcher in jedem Fall nicht der Viskosität der hier verwendeten 3 M HMIM Cl-Lösung entspricht. Auch wenn die Angaben der hydrodynamischen Radien nicht exakt waren, konnte dennoch eindeutig zwischen nieder- und höhermolekularen Strukturen unterschieden werden.

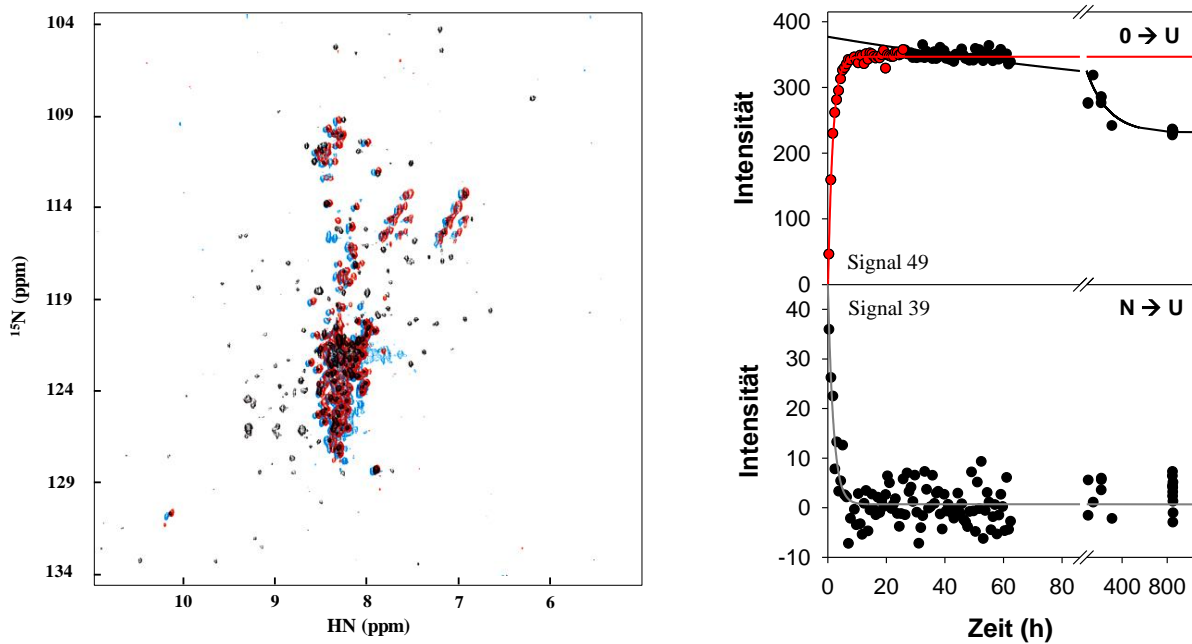
Der Einfluss der Inkubationsdauer auf das Aggregationsverhalten wurde anhand des Verhältnisses von Monomer zu Aggregaten der jeweiligen Probe und der Verteilung der Aggregate zwischen den beiden Proben deutlich. Der Anteil an höhermolekularen Strukturen nach einer Woche Inkubationsdauer war deutlich höher als nach zwei Tagen (siehe **Abbildung 3.38 B** und **A**) und somit auch das Verhältnis zum Monomer. In **Abbildung 3.38 C** ist gezeigt, dass durch Zentrifugation der Probe nach 1-wöchiger Inkubation in 3 M HMIM Cl die höhermolekularen Strukturen im Gegensatz zum Monomer sedimentierten und sich typisch für Proteinaggregate verhielten.

Aus den Ergebnissen der AF-4-Messungen und der Bestimmung der hydrodynamischen Radien mittels Dynamischer Lichtstreuung geht deutlich hervor, dass EGFP mit zunehmender Inkubationszeit unter denaturierten Bedingungen in Gegenwart hoher HMIM Cl-Konzentrationen zur Bildung von Aggregaten neigt.

### **3.8. Kinetische Analysen der chemisch induzierten Entfaltung mittels 2D-NMR-Spektroskopie**

Durch die Einführung des Isotops  $^{15}\text{N}$  konnten 2D-NMR-Spektren von EGFP aufgenommen werden. Ein hochaufgelöstes  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum von EGFP unter nativen Bedingungen und die Zuordnung der einzelnen Signale ist unter **3.3.5.** beschrieben. Mit Einführung der Markierung konnten auch in Gegenwart von  $\text{GuHCl}$  und Ionischen Flüssigkeiten 2D-Spektren aufgenommen werden. Eine eindeutige Zuordnung der Signale zu Aminosäuren, wie für das native EGFP gezeigt, war jedoch nur begrenzt möglich. In den jeweiligen Spektren konnten dennoch einzelne Signale separiert und deren Intensitätsänderung

mit fortschreitender Inkubationsdauer verfolgt werden. In Gegenwart der Ionischen Flüssigkeiten kam es zu Veränderungen der chemischen Verschiebung der Signale. Diese wurde mit zunehmender Denaturierungsdauer und Konzentration an Ionischen Flüssigkeiten noch verstärkt, sodass auch hier eine Zuordnung zu Aminosäuren aufgrund der Überlagerung vieler Signale nicht exakt gewährleistet werden konnte. Die Intensitätsänderung der Signale mit andauernder Inkubationszeit ließ bei näherer Betrachtung der Kinetiken zwei Arten erkennen. Zum einen konnten Signale identifiziert werden, welche zu Beginn der Messung respektive bei geringer Inkubationsdauer eine Intensität aufwiesen, die im zeitlichen Verlauf abnahm. Hierbei handelt es sich um Signale von nativem Protein, welche mit zunehmender Denaturierung des EGFP an Intensität verloren. Zum anderen zeigten sich Signale, welche mit zunehmender Reaktionsdauer an Intensität gewannen. Kinetiken mit Signalen abnehmender Intensität wurden im Folgenden mit  $N \rightarrow U$  bezeichnet und Kinetiken mit Signalen geringer Anfangs- und im Verlauf zunehmender Intensität mit  $0 \rightarrow U$ . Diese Art der Kinetik ließ zudem in den meisten Fällen eine Aufteilung in zwei Phasen zu. Die erste Phase zeigte eine stetige Intensitätszunahme und die zweite Phase, wenn vorhanden, eine unterschiedlich stark ausgeprägte Intensitätsabnahme auf. Eine Erklärung für die Intensitätszunahme im ersten Abschnitt der zweiphasigen der  $0 \rightarrow U$  Kinetik könnte die erhöhte Viskosität der Lösungen mit HMIM Cl sein. Durch die erhöhte Viskosität der HMIM Cl-Lösungen, welche experimentell für eine wässrige Lösung mit 2,5 M HMIM Cl ( $\approx 50\%$  (w/w)) mit einem Wert von 5,91 Pa s (30 °C) ermittelt wurde und somit etwa um Faktor 7 höher war als Wasser bei 30 °C, war gerade bei zunehmender IL-Konzentration das *tumbling* stark eingeschränkt. Dies führte aufgrund erhöhter transversaler Relaxation zu einer starken Linienverbreiterung (und damit Intensitätsabnahme) und sehr niedrigen Anfangsintensitäten. Erst mit zunehmender Entfaltung kam es zu einer Erhöhung der Freiheitsgrade und Dynamik, verminderter transversaler Relaxation und somit zu einer Intensitätszunahme. Die anschließende Intensitätsabnahme der  $N \rightarrow U$ -Kinetik kann, wie im Folgenden beschrieben, dem Aggregieren des Proteins zugeschrieben und mit dem dadurch hervorgerufenen Verlust an Dynamik erklärt werden. In **Abbildung 3.39** sind  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren von EGFP zu verschiedenen Inkubationszeiten und Kinetiken einzelner repräsentativer Signale in Gegenwart von 4,4 M GuHCl dargestellt.



**Abbildung 3.39:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von EGFP in Gegenwart von GuHCl.

Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren wurden an einem Bruker Avance II 600 NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Messung wurde in 4,4 M GuHCl (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM NaCl, pH 6,5) bei 303 K unter Zusatz von 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  und einer Proteinkonzentration von 12 mg/ml (0,45 mM) durchgeführt. Die linke Abbildung zeigt übereinandergelegte Spektren nach 40 min (schwarz), nach 11 h (rot) und nach 35 Tagen (blau). Die rechte Abbildung zeigt den Intensitätsverlauf einzelner Signale. Im zeitlichen Verlauf konnten 47 Signale mit abnehmender und 36 mit steigender Intensität verfolgt werden. Die untere Abbildung zeigt repräsentativ eine Kinetik mit abnehmender Intensität  $\text{N} \rightarrow \text{U}$  mit einfach exponentieller Kurvenanpassung (—). Die Kinetik der oberen Abbildung zeigt eine Aufteilung in zwei Phasen. Die erste Phase (bis ca. 24 h) mit steigender Intensität  $0 \rightarrow \text{U}$  (•) und einfach exponentiellen Kurvenanpassung (—) und die zweite Phase mit leicht abnehmender Intensität (•) und einfach exponentiellen Kurvenanpassung (—). Die kinetischen Parameter sind der **Tabelle 7.8** zu entnehmen.

In diesem Fall konnte die NMR-Messung nicht bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt werden. Bei diesem hohen pH-Wert tauschen die Amidprotonen zu schnell mit den Protonen des GuHCl aus. Dies führt zu einer massiven Verbreiterung und Intensitätsabnahme der Signale und eine gerätetechnische Abstimmung (*shimming*) ist sehr stark eingeschränkt. Eine erfolgreiche Durchführung der Messungen konnte jedoch bei einem pH-Wert von 6,5 gewährleistet werden. Der Reaktionsverlauf in Gegenwart von 4,4 GuHCl wurde in einem Zeitraum von 35 Tagen verfolgt. Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren nach 40 min, 11 h und 35 Tagen sind in **Abbildung 3.39** übereinandergelegt. Im ersten Spektrum (nach 40 min) sind gut separierbare Signale zu erkennen, jedoch im Gegensatz zu dem unter nativen Bedingungen aufgenommen Spektrum in ihrer Anzahl vermindert. Mit zunehmender Denaturierungsdauer kam es sukzessive zur Überlagerung und Verlust von Signalen. Eine Vielzahl von Signalen konnte dennoch über den gesamten Zeitraum in ihrer Intensitätsänderung kinetisch verfolgt und ausgewertet werden. So wurden 47 Signale mit abnehmender Intensität ( $\text{N} \rightarrow \text{U}$ ) identifiziert.

Die Analyse der einzelnen Kinetiken zeigte Unterschiede hinsichtlich der Anfangsintensitäten jedoch nicht in den jeweiligen Kurvenverläufen. Die  $N \rightarrow U$ -Kinetiken wurde durch einfach exponentielle Kurvenanpassung (siehe **Gleichung 2.8**) bestimmt und die gemittelten Geschwindigkeitskonstanten aus den einzelnen Kinetiken (siehe **Tabelle 7.8**) sind in **Tabelle 3.2** dargestellt. Eine repräsentative ausgewählte  $N \rightarrow U$ -Kinetik zeigt **Abbildung 3.39** (rechts unten). Für weitere 36 Signale konnte eine Kinetik mit steigendem Intensitätsverlauf ( $0 \rightarrow U$ ) aufgenommen werden (siehe **Abbildung 3.39** rechts oben). Der Kurvenverlauf wurde in zwei Phasen unterteilt. In der ersten, schnelleren Phase über einen Zeitraum von etwa 24 Stunden war die Intensität stetig zunehmend. In der darauffolgenden langsameren zweiten Phase nahm die Signalintensität im Verlauf leicht ab. Für beide Phasen wurde durch einfach exponentielle Kurvenanpassung (siehe **Gleichung 2.8** und **Gleichung 2.9**) die Geschwindigkeitskonstanten bestimmt, der Mittelwert ist in **Tabelle 3.2** dargestellt.

**Tabelle 3.2:** Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von HMIM Cl und GuHCl.

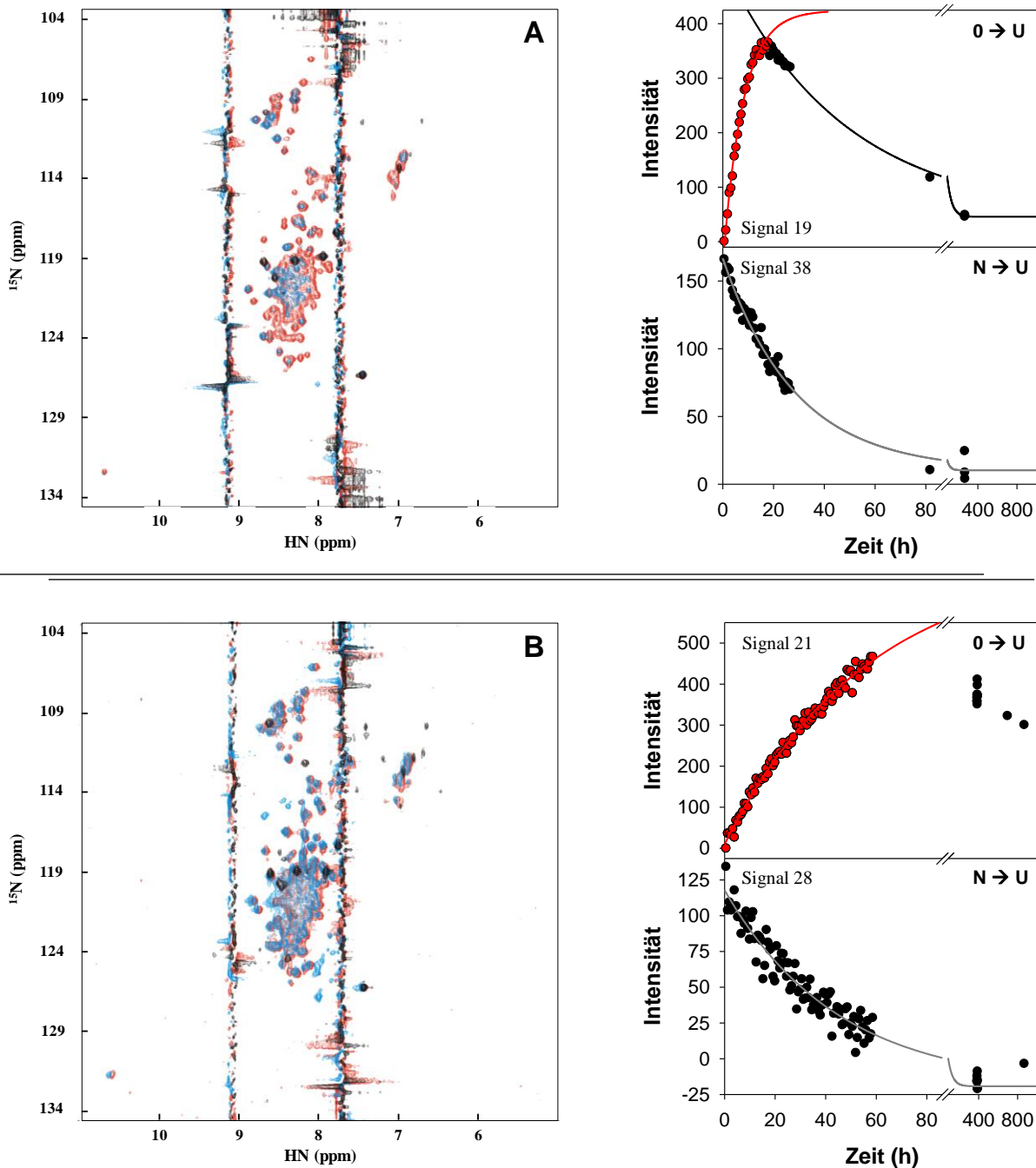
Die kinetischen Parameter wurden durch einfach exponentielle Kurvenanpassung ermittelt. Die Tabelle enthält jeweils die Mittelwerte aller auswertbaren Kinetiken in Gegenwart entsprechender Konzentration von HMIM Cl beziehungsweise GuHCl. Die Parameter der einzelnen Kinetiken sind in **Tabelle 7.8** bis **Tabelle 7.11** zusammengefasst. Die graphische Darstellung einzelner repräsentativer Kinetiken erfolgt in **Abbildung 3.39** und **Abbildung 3.40**, die der Geschwindigkeitskonstanten in **Abbildung 3.41**. \* nicht auswertbar

		$k_{1\ 0 \rightarrow U} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{2\ 0 \rightarrow U} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{N \rightarrow U} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
GuHCl	4,4 M	$1,69 \pm 0,37 \times 10^{-4}$	$1,66 \pm 1,10 \times 10^{-6}$	$2,39 \pm 1,21 \times 10^{-4}$
HMIM Cl	2,5 M	$3,19 \pm 0,57 \times 10^{-5}$	$5,51 \pm 1,40 \times 10^{-6}$	$1,13 \pm 0,22 \times 10^{-5}$
HMIM Cl	2,0 M	$4,93 \pm 1,14 \times 10^{-6}$	n.a.*	$6,24 \pm 0,31 \times 10^{-6}$
HMIM Cl	1,5 M	n.a.*	n.a.*	$1,59 \pm 0,90 \times 10^{-6}$
HMIM Cl	1,0 M	n.a.*	n.a.*	n.a.*

Eine Einordnung der mittels 2D-NMR-Kinetiken erhobenen kinetischen Parameter (siehe **Abbildung 3.41**) im Zusammenhang mit den bisherigen Daten der GuHCl induzierten Entfaltung an EGFP wird im Anschluss zusammen mit den NMR-Daten der Entfaltung in Gegenwart von HMIM Cl gegeben.

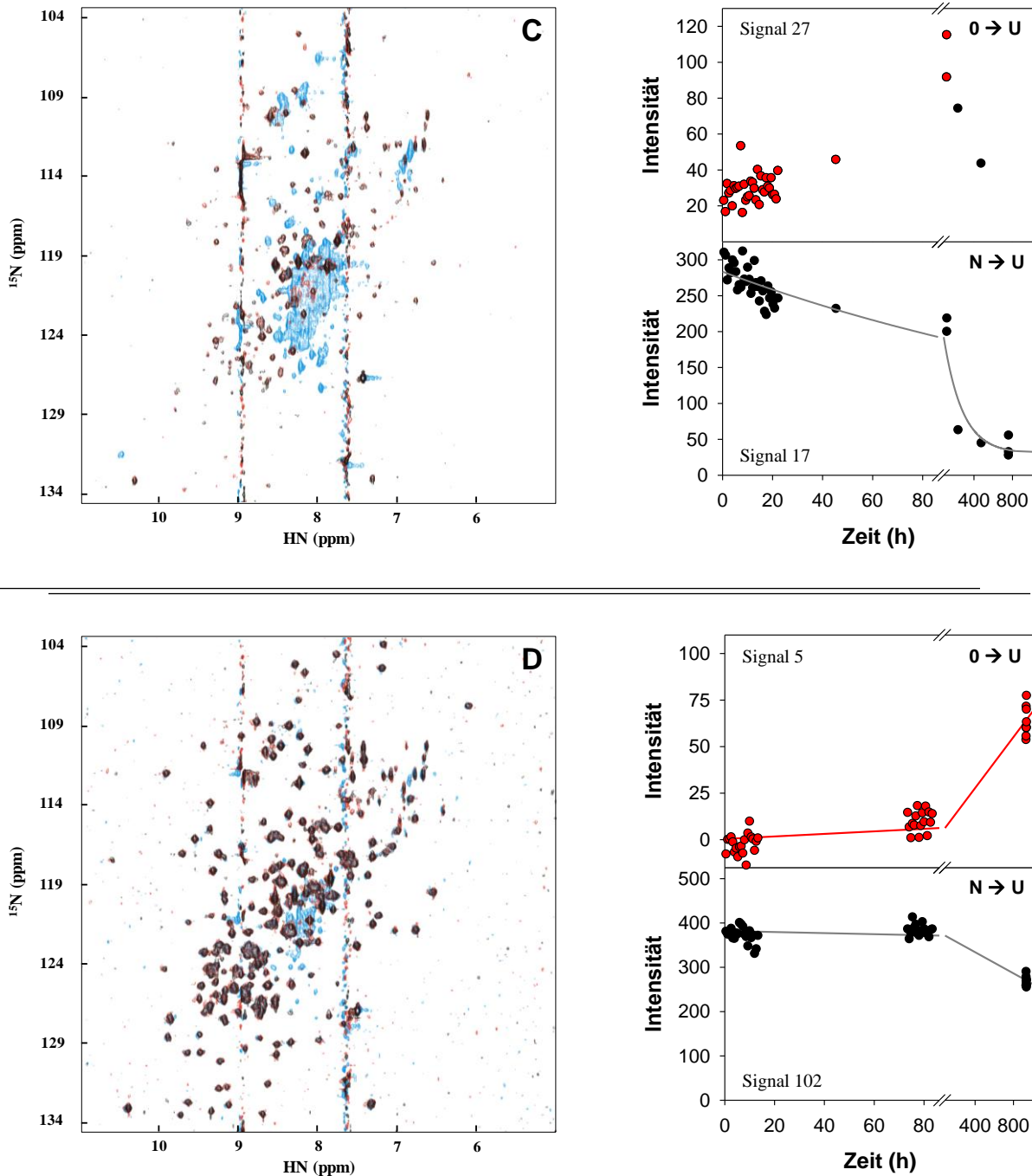
Wie in Gegenwart von GuHCl gezeigt, konnten auch entsprechende 2D-NMR-Spektren und Kinetiken in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten gewonnen werden. In **Abbildung 3.40** sind  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren für EGFP in Gegenwart steigender Konzentrationen von HMIM Cl dargestellt. Das bei höheren Konzentrationen immer stärker werdende Protonenrauschen bei einer chemischen Verschiebung von 7,5 – 7,7 ppm ( $^1\text{H}$ ) und 8,9 – 9,1 ppm ( $^1\text{H}$ ) wurde durch die Ionischen Flüssigkeiten hervorgerufen, deren  $^1\text{H}$ -Signale durch die Pulsfolge nicht vollständig unterdrückt werden konnte. Bei einer Konzentration von 1,0 M HMIM Cl ergab sich nach kurzer Inkubationsdauer ein gut aufgelöstes Spektrum. Es konnten

über 100 Signale, wie auch für das native EGFP (siehe **Abbildung 3.12**) gezeigt, separiert werden. Der Vergleich beider Spektren, unter nativen Bedingungen und in Gegenwart von 1,0 M HMIM Cl, ergab eine leichte chemische Verschiebung um etwa 0,1 bis 0,2 ppm ( $^1\text{H}$ ). Dies war auf die unterschiedlichen Pufferbedingungen zurückzuführen und verstärkte sich mit steigender HMIM Cl-Konzentration, was die Zuordnung der separierbaren Signale in den Spektren zu den entsprechenden Aminosäuren erschwerte. In Gegenwart von 1 M HMIM Cl kam es mit zunehmender Inkubationszeit zu Überlagerungen von Signalen im entfalteten Zustand, welche nach 36 Tagen sehr stark ausgeprägt waren (siehe **Abbildung 3.40 D**). Über den gesamten Messzeitraum konnten 99 Signale mit  $\text{N} \rightarrow \text{U}$ - und 8 Signale mit  $0 \rightarrow \text{U}$ -Charakteristik identifiziert und deren Intensitätsänderung kinetisch verfolgt werden. Die Verläufe der einzelnen Kinetiken ähnelten sich innerhalb der jeweiligen Signalgruppe ( $\text{N} \rightarrow \text{U}$  beziehungsweise  $0 \rightarrow \text{U}$ ), jedoch mit unterschiedlich ausgeprägten Intensitäten. Eine kinetische Auswertung durch einfach exponentielle Kurvenanpassung konnte nicht vorgenommen werden, da die Intensitätsänderungen der Signale und die Anzahl der Messpunkte zu gering waren. Mit zunehmender Konzentration an HMIM Cl erhöhte sich die Geschwindigkeit der Reaktion und veränderte sich die Anzahl der Signale, die den Gruppen mit  $\text{N} \rightarrow \text{U}$ - beziehungsweise  $0 \rightarrow \text{U}$ -Charakteristik zuzuordnen waren. Konnten bei 1,0 M HMIM Cl noch vorrangig native Signale mit  $\text{N} \rightarrow \text{U}$ -Charakteristik detektiert werden, ließen sich bei 1,5 M nur noch 20, bei 2,0 M nur noch ein Signal und 2,5 M zwei Signale mit  $\text{N} \rightarrow \text{U}$ -Charakteristik darstellen. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der Signale mit niedriger Anfangsintensität von 8 bei 1,0 M, über 9 und 27 bei 1,5 M und 2,0 M, hin zu 89 Signalen bei 2,5 M HMIM Cl. Dies ist auch aus den übereinandergelegten Spektren in **Abbildung 3.40** ersichtlich. In **A** und **B** sind zum ersten Messpunkt nach 40 Minuten nur wenige separierbare Signale detektierbar. Mit zunehmender Inkubationsdauer kam es zu einer sehr starken Überlagerung von Signalen und deren Akkumulation vor allem in Zentrum der Abbildung. Die kinetische Analyse der Entfaltung von EGFP in Gegenwart steigender HMIM Cl-Konzentration erfolgte über einfach exponentielle Kurvenanpassung (siehe **Gleichung 2.8** und **Gleichung 2.9**). Die resultierenden einzelnen Geschwindigkeitskonstanten sind in **Tabelle 7.9** bis **Tabelle 7.11** und die gemittelten Geschwindigkeitskonstanten in **Tabelle 3.2** gelistet.



**Abbildung 3.40:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren von EGFP in Gegenwart von HMIM Cl.

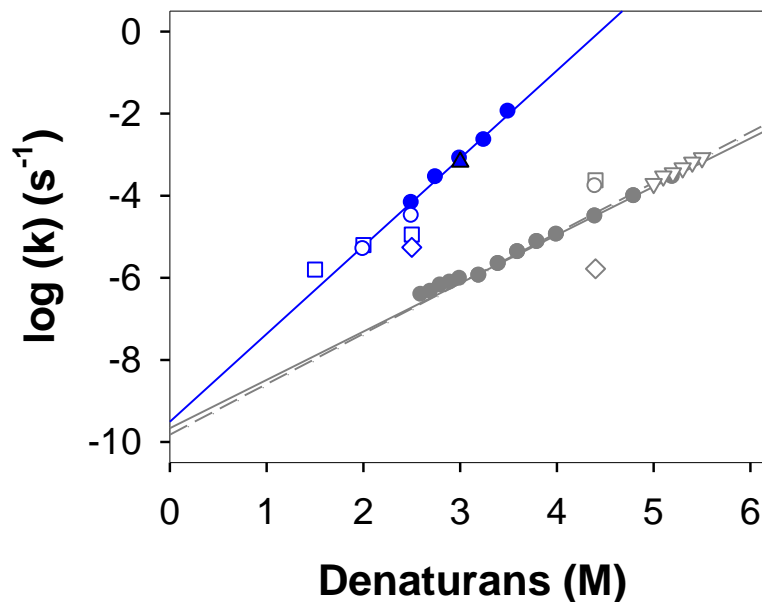
Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren wurden an einem Bruker Avance II 600 NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Messungen wurden in Gegenwart von HMIM Cl bei 2,5 M (A), 2,0 M (B), 1,5 M (C) und 1,0 M (D) (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM NaCl, pH 8,0) bei 303 K unter Zusatz von 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  und einer Proteinkonzentration von 12 mg/ml (0,45 mM) durchgeführt. Die linke Abbildung zeigt übereinandergelegte Spektren nach verschiedenen Inkubationszeiten, in A nach 40 min (schwarz), nach 17 h (rot) und 11 d (blau), in B nach 40 min (schwarz), nach 60 h (rot) und 36 d (blau), in C nach 40 min (schwarz), nach 21 h (rot) und 32 d (blau) und in D nach 40 min (schwarz), nach 3 d (rot) und 40 d (blau). Die rechten Abbildungen stellen jeweils den Intensitätsverlauf eines repräsentativ ausgewählten Signals dar. Die untere Abbildung zeigt eine Kinetik mit abnehmender Signalintensität (N $\rightarrow$ U) mit einfach exponentieller Kurvenanpassung (—) für A bis C. Die Kinetik der oberen Abbildung (in A bis C) zeigt eine Aufteilung in zwei Phasen. Die erste Phase (●) mit steigender Signalintensität (0 $\rightarrow$ U) und einfach exponentiellen Kurvenanpassung (—) und die zweite Phase mit abnehmender Signalintensität (●). In C ist nur die Tendenz der Zu- und Abnahme der Signalintensität dargestellt (es wurde keine Kurvenanpassung vorgenommen). Die kinetischen Parameter sind den **Tabelle 7.9 – 7.11** zu entnehmen.



**Abbildung 3.40:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren von EGFP in Gegenwart von HMIM Cl. Nähere Erläuterungen dazu auf der vorherigen Seite.

Mit steigender HMIM Cl Konzentration war auch der zweiphasige Charakter der  $0 \rightarrow \text{U}$ -Kinetik zunehmend ausgeprägt. Der Übergang von steigender zu abnehmender Intensität war in Gegenwart von 2,5 M bereits nach 20 Stunden durch ein Maximum definiert. Bei geringeren Konzentrationen konnte dieses Maximum innerhalb der Messung nicht aufgezeichnet werden. Die Intensitätsabnahme in der zweiten Phase war jedoch deutlich ersichtlich, aber in ihrer Amplitude nicht so markant und deutlich verlangsamt.

Die kinetische Auswertung der hochaufgelösten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren zeigte sowohl in Gegenwart von 4,4 M GuHCl als auch in Gegenwart von HMIM Cl mit zunehmender Inkubationsdauer Veränderungen der Intensität der separierten Signale. Eine Zuordnung der Signale zu Aminosäuren war aufgrund der chemischen Verschiebung der Signale in Gegenwart von HMIM Cl nur bedingt möglich. Es gelang lediglich für vier Aminosäuren (G51, D82, T108, N135) eine Zuordnung der Signale in GuHCl und HMIM Cl vorzunehmen. Somit konnte der Einfluss der beiden Denaturanzien auf der Ebene direkt zugeordneter Aminosäuren nicht verglichen werden. Durch den Vergleich der kinetischen Parameter, mit denen der Entfaltung von EGFP, welche mittels intrinsischer Fluoreszenz (510 nm) und Zirkulardichroismus im Nah-UV-Bereich (278 nm) erhoben wurden, konnten die Kinetiken der Signalgruppen eingeordnet werden. So zeigten die Geschwindigkeitskonstanten der ersten Phase mit  $0 \rightarrow \text{U}$ -Charakteristik aus den Messreihen mit 2,0 M und 2,5 M HMIM Cl eine gute Übereinstimmung mit der Entfaltungskinetik des EGFP (siehe **Abbildung 3.41**). Die Geschwindigkeitskonstanten der zweiten Phase waren deutlich langsamer und sind dem Prozess der Aggregatbildung des EGFP aus dem denaturierten Zustand zuzuschreiben.



**Abbildung 3.41:** Entfaltungskinetiken der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Messungen an EGFP in Gegenwart von GuHCl und HMIM Cl.

Die graphische Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung erfolgt für GuHCl in grauen und für HMIM Cl in blauen Symbolen. Auf Fluoreszenz basierende Geschwindigkeitskonstanten sind durch ausgefüllte Kreise und die Entfaltungsparameter durch Zirkulardichroismus im Nah-UV-Bereich (278 nm) sind für GuHCl mit ( $\nabla$ ) und für HMIM Cl mit ( $\blacktriangle$ ) dargestellt. Die kinetischen Parameter, basierend auf der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Messungen der  $\text{N} \rightarrow \text{U}$ -Kinetiken, sind mit (Quadraten), die der ersten Phase der  $0 \rightarrow \text{U}$ -Kinetiken mit (Kreisen) und die der zweiten Phase der  $0 \rightarrow \text{U}$ -Kinetik mit abnehmender Intensität mit (Rauten) dargestellt. Die Geschwindigkeitskonstanten aus den 2D-NMR Kinetiken sind in **Tabelle 3.2** gelistet.



Die Kinetiken mit  $N \rightarrow U$ -Charakteristik können ebenso der Denaturierung zugeordnet werden und ergänzen die Denaturierungskinetik des EGFP bis zu einer Konzentration von 1,5 M HMIM Cl. Die in Gegenwart von 2,5 M HMIM Cl ermittelte Geschwindigkeitskonstante lag jedoch unterhalb des zu erwartenden Werts. Die Intensitätsabnahme der  $N \rightarrow U$ -Kinetik könnte hier von einer Intensitätsabnahme, welche durch die Aggregation hervorgerufen wurde (entsprechend der zweiten Phase der  $0 \rightarrow U$ -Kinetik), überlagert worden sein. Die mittels 2D-NMR-Spektroskopie erhobenen kinetischen Parameter in Gegenwart von 4,4 M GuHCl zeigten für die  $N \rightarrow U$ - und die erste Phase der  $0 \rightarrow U$ -Kinetik nahezu gleiche Geschwindigkeitskonstanten. Dies verdeutlicht, dass diese beiden Kinetiken die Denaturierung des EGFP repräsentieren. Der schneller als zu erwartende Reaktionsverlauf der Denaturierung im Vergleich zu der mittels Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie ermittelten Entfaltungskinetik ist jedoch nicht eindeutig zu erklären. Diese Abweichung könnte auf den erniedrigten pH-Wert von 6,5 zurückzuführen sein. Die deutlich langsamere zweite Phase der  $0 \rightarrow U$ -Kinetik kann hier ebenso der Aggregation des EGFP zugeordnet werden.

## 4. Diskussion

Durch die große Variabilität und Möglichkeit, spezifisch die Eigenschaften auf die jeweiligen Bedürfnisse anzupassen, finden Ionische Flüssigkeiten eine breite Anwendung in der organischen Synthese und der homogenen Katalyse mit Übergangsmetallen. Zudem gibt es ein zunehmendes Interesse bei biokatalytischen Prozessen, bei denen Ionische Flüssigkeiten entweder als reines Lösungsmittel oder als Co-Solvens in Pufferlösungen zum Einsatz kommen (siehe 1.2.3.). Der Einsatz Ionischer Flüssigkeiten in der Proteinchemie ist relativ neu und bietet potenziell interessante Perspektiven und Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Proteinfaltung, zum Beispiel als Additiv um Rückfaltungsausbeuten zu erhöhen. Die Effizienz bei der *in vitro*-Proteinfaltung ist von zentraler Bedeutung und von wirtschaftlichem Interesse für die industrielle Produktion von Proteinen, insbesondere von pharmazeutisch relevanten Wirkstoffen. Neben physikalischen Parametern wie Temperatur, pH-Wert und Proteinkonzentration, kommt auch einer Reihe von Faltungszusätzen eine entscheidende Rolle zu (siehe 1.1.1.), um erhöhte Ausbeuten bei der Rückfaltung zu generieren. Ein hierbei häufig auch im industriellen Maßstab genutztes Additiv stellt L-Arginin dar (Rudolph et al., 1996; Lilie et al., 1998). Aber auch für Ionische Flüssigkeiten konnte in diesem Kontext für verschiedene Proteine eine gesteigerte Faltungsausbeute beschrieben werden (Summers & Flowers II, 2000; Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010).

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, systematische Abhängigkeiten und Zusammenhänge bei der Variation der kationischen beziehungsweise anionischen Komponente der Ionischen Flüssigkeiten und deren Einfluss auf die Faltungsausbeute zu identifizieren.

Zum Verständnis der Wirkmechanismen gibt es bereits Ansätze zu Interaktionen der Ionischen Flüssigkeiten mit Aminosäuren. So konnte anhand quantitativer Messungen der Transferenergien von Aminosäuren und DKP (Diketopiperazin), einem Modell für das Peptidrückgrat, in ausgewählten Ionischen Flüssigkeiten der molekulare Mechanismus hinter den Effekten beschrieben werden (Tischer, 2011). Diese Beiträge zum Verständnis sollten um spektroskopische Methoden an Proteinen erweitert werden.

Der Fokus dieser Arbeit lag darin, Aussagen über die Wirkungsweise und mögliche Interaktionen beziehungsweise den Einfluss der Ionischen Flüssigkeiten auf Proteine auf struktureller Ebene mittels spektroskopischer Messmethoden zu erheben.

Um dies trotz starker Interferenzen zwischen Ionischen Flüssigkeiten und Proteinen in üblicherweise für Strukturuntersuchungen genutzten spektralen Bereichen zu realisieren, wurde

EGFP als Modellprotein gewählt. Dieses Protein besitzt auf Grund seiner zusätzlichen charakteristischen Fluoreszenzeigenschaft erweiterte Möglichkeiten für spektroskopische Analysen, die den experimentellen Fragestellungen gerecht werden sollten. Über den Einfluss der Ionischen Flüssigkeiten auf die Faltung und Aggregation des EGFP hinaus sollten anhand von CD- und IR-spektroskopischen Methoden in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten mögliche Veränderungen an Sekundärstrukturelementen dargestellt werden. Mit der Einführung von  $^{15}\text{N}$ -markiertem EGFP konnten 2D-NMR-Strukturdaten aufgenommen werden. Die hochaufgelösten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren sollten Wechselwirkungen des Proteins mit Ionischen Flüssigkeiten in hochmolaren Lösungen aufzeigen und mit entsprechender Zuordnung zu einzelnen Aminosäuren allgemeingültige Aussagen zulassen.

## 4.1. Einfluss Ionischer Flüssigkeiten bei der *in vitro*-Faltung

Es gibt verschiedene Aspekte, welche die Faltungsausbeute bei der *in vitro*-Faltung bestimmen. Für eine optimale Faltungsausbeute sollten Nebenreaktionen wie etwa Aggregation minimiert werden und die Löslichkeit von intermediären Spezies während der Rückfaltung erhöht, sowie der native Zustand stabilisiert werden. Unter diesen Gesichtspunkten wurden die Einflüsse Ionischer Flüssigkeiten untersucht. Das dieser Arbeit zugrunde liegende *screening* wurde schwerpunktmäßig über systematische Variation der Kettenlänge von N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden und deren endständig hydroxylierten Analoga durchgeführt. Um den Einfluss anderer kationischer Komponenten zu untersuchen, wurden auch Verbindungen verwendet, welche auf Pyridin (HO-EPy Cl) und quartäre Amine mit verschiedenen Oligoethylenglykol-Ketten (Ammonoeng-Reihe) basieren. Zudem besaßen die Verbindungen der Ammonoeng-Reihe unterschiedliche Anionen (Methylsulfat, Acetat, Dihydrogenphosphat). Des Weiteren wurde auch eine auf Imidazolium basierende Verbindung mit Dimethylphosphat als Anion (MMIM DMP) auf deren Einfluss als Additiv während der Rückfaltung untersucht.

Für einige Proteine ist die positive Wirkung Ionischer Flüssigkeiten auf die Faltungsausbeute bei der oxidativen Rückfaltung in der Literatur beschrieben (Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010). Über systematische Variation der Alkylkettenlänge der kationischen Komponente von N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden und deren endständig hydroxylierten Analoga und unter Verwendung verschiedener Anionen bei konstantem Kation wurden hier klare Abhängigkeiten aufgezeigt (Buchfink et al., 2010). Zum einen wurde eine zunehmende

Destabilisierung und Abnahme der Faltungsausbeute mit zunehmender Alkylkettenlänge respektive steigender Hydrophobizität der kationischen Komponente nachgewiesen. Die Einführung endständiger Hydroxylgruppen zeigte eine leicht erhöhte Ausbeute im Vergleich zu den nicht hydroxylierten Derivaten. Zum anderen wurde bei Variation der anionischen Komponente und konstantem Kation folgende Abhängigkeit (mit **zunehmender Destabilisierung** von links nach rechts) aufgezeigt:  $\text{Cl}^- \rightarrow \text{EtSO}_4^- \approx \text{MDEGSO}_4^- \rightarrow \text{Et}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{Acetat} \approx \text{Tosylat} \rightarrow \text{HexSO}_4^-$ . Ähnliche Tendenzen über die destabilisierende Wirkung Ionischer Flüssigkeiten auf Proteine wurden mittels thermischer Stabilitätsmessungen an Ribonuklease A präsentiert (Constantinescu et al., 2007 & 2010). Hier wurde eine Einordnung der Kat- und Anionen in die Hofmeister-Reihe nach chaotropen und kosmotropen Eigenschaften vorgenommen. Die in diesen Arbeiten ebenso beschriebene Unterdrückung der Aggregation wurde auch in eigenen früheren Arbeiten intensiv an zwei Ionischen Flüssigkeiten, dem 4-Methyl-N-butylpyridiniumtetrafluoroborat (MBPY  $\text{BF}_4$ ) und 1-Ethyl-3-methylimidazoliumchlorid (EMIM Cl) untersucht und dargestellt (Pultke, 2003). Die über Streulichtmessungen gezeigte fast vollständige Unterdrückung der Aggregation von EGFP bei etwa 200 mM Ionischer Flüssigkeit (MBPY  $\text{BF}_4$ , EMIM Cl) hatte sowohl Auswirkungen auf die initiale Nukleationsreaktion der Aggregation, als auch auf die nachfolgende Polymerisationsreaktion. Hierbei wurde der Mechanismus der Aggregation *per se* nicht verändert aber die Kinetik verlangsamt. Prinzipiell sollte durch Suppression der Aggregation als Konkurrenzreaktion zur Rückfaltung eine Erhöhung der Faltungsausbeuten resultieren.

#### 4.1.1. Variation der Kationen bei der *in vitro*-Faltung von EGFP

Bei der Rückfaltung von EGFP aus dem chemisch denaturierten Zustand induziert durch Guanidinhydrochlorid wurde bei einer EGFP-Konzentration von 0,5 mg/ml in Gegenwart von 1 M L-Arginin eine Verdopplung der Faltungsausbeute (66 %) im Vergleich zur spontanen Rückfaltung (etwa 30 %) erreicht. Dieses hohe Niveau konnte bis zu einer Konzentration von 2 M L-Arginin (nahe der Löslichkeitsgrenze für L-Arginin in Wasser bei RT) gehalten werden. Dahingegen wurde bei Zugabe von NaCl nur eine Abnahme der Ausbeute detektiert, welches somit als Negativkontrolle diente. In einer systematischen Untersuchung zu den Einflüssen der Kationen von Ionischen Flüssigkeiten auf die Faltungsausbeute wurde die Kettenlänge von N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden und deren endständig hydroxylierter Analoga variiert. In Analogie zu den von LANGE (Lange et al., 2005) für Lysozym und einem *single-chain*-Antikörperfragment publizierten Abhängigkeiten der Rückfaltungsausbeute von der

Kettenlänge der substituierten Alkylgruppen respektive Hydrophobizität konnten in dieser Arbeit nahezu gleiche Abhängigkeiten für EGFP belegt werden.

**Tabelle 4.1:** Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vitro*-Faltung von EGFP in Gegenwart von L-Arginin sowie N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden und deren endständig hydroxylierter Analoga.

Skalierung: – – – deutliche Verschlechterung, + + + deutliche Verbesserung der Faltungsausbeute, ± entspricht der Ausbeute bei der Rückfaltung ohne Zusatz eines Additivs bei 0,5 mg/ml EGFP.

Additiv	Hydrophobizität	Ausbeute	Konzentration des Additivs bei max. Ausbeute
L-Arginin		+ +	1,0 – 2,0 M
HO-EMIM Cl	↓ zunehmend ↓	+ + +	2,0 M
HO-PMIM Cl		+ +	1,0 M
HO-HMIM Cl		+ +	0,5 M
EMIM Cl		+ +	0,5 – 1,0 M
BMIM Cl	↓ zunehmend ↓	+ + +	0,5 M
HMIM Cl		–	< 0,5 M

Wie aus **Tabelle 4.1** für die endständig hydroxylierten Varianten zu entnehmen, wurde für die am kürzesten substituierte Verbindung (HO-EMIM Cl) die höchste, das L-Arginin sogar übertreffende Renaturierungsausbeute von EGFP erzielt. Mit Zunahme der Hydrophobizität zeigte sich eine auf die Maxima bezogen leichte Abnahme der Ausbeute auf Werte, welche nur gering unterhalb der mit L-Arginin erzielten Faltungsausbeuten lagen. In der gleichen Beziehung standen die erforderlichen Molaritäten, um das Maximum bei der Rückfaltung zu erreichen.

Mit zunehmender Länge der endständig hydroxylierten Alkylkette wurde die maximale Faltungsausbeute bei geringeren Konzentrationen erreicht und es setzte ein zunehmend nachteiliger Effekt auf die Rückfaltungsausbeute bei zunehmender Molarität und Hydrophobizität der Ionischen Flüssigkeiten ein.

Die in der Literatur von BUCHFINK (Buchfink et al., 2010) ebenso für rPA dargestellte gleichartige Abhängigkeit für die nicht endständig hydroxylierten Varianten konnte hier nicht direkt bestätigt werden. Vielmehr wurde für EGFP in Gegenwart von BMIM Cl ein Optimum durchlaufen und folgende Abhängigkeit in Bezug auf die maximal erzielten Faltungsausbeuten gezeigt (siehe **Tabelle 4.1**):



Die zunehmende Faltungsausbeute von EMIM Cl zu BMIM Cl könnte theoretisch durch das noch kürzer substituierte MMIM DMP ergänzt werden, da hier eine geringere Faltungsausbeute als in Gegenwart von EMIM Cl erreicht wurde (siehe **Tabelle 4.2**). Somit könnte, bezogen auf die Kationen von MMIM<sup>+</sup> bis BMIM<sup>+</sup>, mit zunehmender Hydrophobizität, eine steigende und für HMIM<sup>+</sup>, bei hoher Hydrophobizität und möglicher Überschreitung eines Optimums, eine sinkende Faltungsausbeute angenommen werden. Da jedoch das MMIM DMP nicht als Chlorid vorlag, ist dies nur eine Annahme, zumal für rPA gezeigt werden konnte, dass Gegenionen, welche in Kombination mit den N-alkylierten 3-Methylimidazoliumkation nicht als Chlorid vorlagen, eher ungeeignet als Additiv für die Rückfaltung sind (Buchfink et al., 2010). Somit kann nicht eindeutig zugeordnet werden, ob der Einfluss des MMIM<sup>+</sup> selbst oder der überlagerte negative Effekt des Anions DMP (Dimethylphosphat) für die schlechte Faltungsausbeute verantwortlich ist.

Bei Betrachtung der benötigten Molaritäten, um die maximale Faltungsausbeute von EGFP für die jeweilige Ionische Flüssigkeit zu erreichen, stellte sich die bereits oben erwähnte Abhängigkeit einer sukzessiven Verschlechterung der Rückfaltungsausbeute bei zunehmender Molarität und Hydrophobizität erneut dar. Gerade dieser Zusammenhang könnte auch darauf hindeuten, dass nicht das BMIM Cl eine systematische Reihe unterbricht, sondern das EMIM Cl sich atypisch verhält und hinter dem eigentlich theoretisch erreichbaren Maximum bleibt. Dafür spräche die in Kapitel 3.6.4. dargestellte starke Abhängigkeit der Proteinkonzentration bei der Renaturierung, die zum Verlust der Faltungsausbeute und der Bildung irreversibler Aggregate in Gegenwart von EMIM Cl führt. Dies würde bedeuten, dass bei geringeren EGFP-Konzentrationen die Faltungsausbeute in Gegenwart von EMIM Cl höher ausfallen könnte und sich somit auch oberhalb der Ausbeuten einordnet, die in Gegenwart der länger-kettigen Varianten erzielt werden.

Diese Tendenz (Abnahme der Faltungsausbeute mit steigender Hydrophobizität) ist zumindest für Lysozym, ScFvOx und rPA in der Literatur beschrieben (Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010). Offensichtlich ist diese Abhängigkeit jedoch nicht universell auf Proteine zu übertragen und muss differenzierter betrachtet werden. Zum einen weist EGFP im Vergleich zu diesen drei genannten Proteinen die größte thermodynamische Stabilität auf. Dies könnte die abnehmende maximale Faltungsausbeute in Gegenwart von BMIM Cl dieser Proteine im Gegensatz zum hier gezeigten Optimum für EGFP erklären. Des Weiteren handelt es sich beim EGFP um ein fast ausschließlich aus  $\beta$ -Faltblättern bestehendes Protein mit einer sehr rigiden Struktur. Darüber hinaus könnte auch der unterschiedliche Anteil hydrophober Areale an der Proteinoberfläche, die in Wechselwirkung mit den Ionischen Flüssigkeiten treten,

ausschlaggebend sein, was ebenso auf die oberflächenexponierten Areale aller Faltungsintermediate während der Rückfaltung zutrifft.

Generell sollten die Effekte der Ionischen Flüssigkeiten bei der *in vitro*-Faltung als ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren – wie Hydrophobizität, löslichkeitvermittelnde Wirkung, Größe und Art der Kat- und Gegenionen, Protein- und IL-Konzentration – verstanden werden. Anhand von Löslichkeitsmessungen in 1 M IL-Lösungen konnte mit zunehmender Hydrophobizität von EMIM<sup>+</sup> bis OMIM<sup>+</sup> eine erhöhte Löslichkeit von L-Tryptophan, einer in Wasser relativ schlecht löslichen Aminosäure, nachgewiesen werden (Buchfink et al., 2010). Hierbei spielt der amphiphile Charakter dieser Ionischen Flüssigkeiten eine entscheidende Rolle. Zum einen wird mit zunehmender Länge der Alkylkette die hydrophobe Wechselwirkung zum L-Tryptophan verstärkt und zum anderen ist die positive Partialladung des Imidazoliums Lösungsvermittler. Es wurde aber auch gezeigt, dass bei Variation der Anionen bei konstantem Kation (und somit gleicher Hydrophobizität) eine erhöhte L-Tryptophan-Löslichkeit nicht unbedingt mit einer Verbesserung der Faltungsausbeute für rPA einhergeht. Diese Diskrepanz legt nahe, dass die Hydrophobizität nicht allein als Erklärung für diese Effekte dienen kann.

Unter dem Gesichtspunkt von Chaotropizität und Kosmotropizität ist für einige Kat- und Anionen die Einordnung der Ionischen Flüssigkeiten in der Literatur vorgenommen worden. Über die Bestimmung des Viskositäts-B-Koeffizient (Jones & Dole, 1929) als ein Maß für diese Einstufung wurde in einer Zusammenfassung durch die Kombination verschiedener Kat- und Anionen EMIM<sup>+</sup> als Chaotrop und BMIM<sup>+</sup> als eher Kosmotrop dargestellt (Zhao et al., 2006; Zhao, 2006). Die von CONSTANTINESCU und LANGE vorgenommene Eingliederung der IL unter diesen Gesichtspunkten in Anlehnung an die Hofmeister-Reihe zeigte durch DSC-Messungen an RNase A und Lysozym in Übereinstimmung ebenso eine zunehmende Kosmotropizität respektive Destabilisierung mit zunehmender Länge der Alkylkette der Kationen (Constantinescu et al., 2007; Lange et al., 2005). Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen, außer in Gegenwart von EMIM Cl. Die zunehmende Kosmotropizität in der Reihe HO-EMIM<sup>+</sup> – HO-HMIM<sup>+</sup> beziehungsweise EMIM<sup>+</sup> – HMIM<sup>+</sup> spiegelt sich in einer abnehmenden Faltungsausbeute mit steigender IL-Konzentration wider.

Ein weiterer Aspekt der Interaktion der IL mit Proteinen wurde von TISCHER (2011) dargestellt. Hier wurden zunehmend vorteilhafte Interaktionen der Kationen in der Reihe EMIM<sup>+</sup> – HMIM<sup>+</sup> mit DKP (Diketopiperazin), einem Modell für das Peptidrückgrat, beschrieben, sodass zu den vorteilhaften Interaktionen mit Tryptophan auch zunehmend vorteilhafte Interaktionen mit dem

Peptidrückgrat aufgezeigt wurden. Das heißt, dass die durch starke Interaktion mit den Aminosäureseitenketten verursachte destabilisierende Wirkung bei hohen Konzentrationen noch durch die vorteilhafte Interaktion mit dem Peptidrückgrat verstärkt wird und eine Solubilisierung des Rückgrats begünstigt wird. Speziell für EMIM Cl konnten zwar vorteilhafte Interaktionen mit hydrophoben Aminosäuren gezeigt werden (besonders vorteilhaft mit Tryptophan und Tyrosin), aber die Interaktion mit DKP war unvorteilhaft, sodass EMIM Cl zwar denaturierend wirkt aber nicht solubilisierend. Eine Konsequenz ist die oben beschriebene Bildung von Aggregaten, welche für die etwas geringere Faltungsausbeute in Gegenwart von EMIM Cl im Vergleich zu BMIM Cl ursächlich ist. Möglicherweise weist BMIM Cl die nötige Balance zwischen Erhöhung der Löslichkeit durch vorteilhafte Interaktion mit den Aminosäureseitenketten und leicht unvorteilhafte oder leicht vorteilhafte Interaktionen mit dem Peptidrückgrat auf, um ein ideales Additiv für die *in vitro*-Faltung von EGFP zu sein.

Die beschriebene zunehmend vorteilhafte Interaktion mit DKP bei den Derivaten mit längeren Alkylketten (Tischer, 2011) könnte ausschlaggebend dafür sein, dass die bei den Verbindungen HO-HMIM Cl, BMIM Cl und HMIM Cl deutliche Abnahme der Faltungsausbeute in Gegenwart hoher IL-Konzentrationen ( $> 1$  M) nicht generell zu irreversiblen Prozessen wie etwa Aggregation führt. Die nach Abreicherung dieser Ionischen Flüssigkeiten durch Verdünnung detektierte Renaturierung von EGFP zeigt dies deutlich.

#### 4.1.2. Einfluss weiterer Ionischer Flüssigkeiten als Faltungshelfer

Zusätzlich zur systematischen Variation der Kettenlänge der substituierten Alkylgruppen von N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden und deren endständig hydroxylierter Analoga wurden auch weitere Verbindungen getestet. Hierbei sollte vor allem der Einfluss unterschiedlicher Kopfgruppen und Anionen auf die Rückfaltungsausbeute analysiert werden. Wie der **Tabelle 4.2** zu entnehmen ist, ergab sich bei der *in vitro*-Faltung von EGFP ein sehr heterogenes Ergebnis in Gegenwart der hier getesteten Derivate. Für HO-EPy Cl konnte eine bedeutsame Steigerung der Faltungsausbeute gezeigt werden, welche die durch L-Arginin vermittelte übertraf. Hingegen resultierten in Anwesenheit der Verbindungen der Ammoeng-Reihe durchweg schlechte Faltungsausbeuten, die weit unterhalb der bei Rückfaltung in Additiv-freiem Puffer erzielten lagen.

Bei den Rückfaltungsversuchen mit HO-EPy Cl wurde das Chlorid als Anion beibehalten, welches sich als sehr geeignet in Kombination mit den N-alkylierten 3-Methylimidazoliumkationen dargestellt hatte.



**Tabelle 4.2:** Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vitro*-Faltung von EGFP in Gegenwart von L-Arginin und weiterer Ionischer Flüssigkeiten.

Skalierung: – – – für deutliche Verschlechterung bis + + + für deutliche Verbesserung der Faltungsausbeute, ± entspricht der Ausbeute bei der Rückfaltung ohne Zusatz eines Additivs bei 0,5 mg/ml EGFP.

Additiv	Ausbeute	Konzentration des Additivs bei max. Ausbeute
L-Arginin	+ +	1,0 – 2,0 M
HO-EPy Cl	+ + +	1,0 M
MMIM DMP	±	0,5 M
Ammoeng 100	– – –	1 – 10 % w/w
Ammoeng 111	– –	1 – 10 % w/w
Ammoeng 112	– –	1 – 10 % w/w

Bei diesem endständig hydroxylierten und kurzkettig substituierten Pyridinium-Derivat konnte eine unvorteilhafte Interaktion mit DKP ermittelt werden, deren Wert basierend auf Transfermessungen, zwischen EMIM<sup>+</sup> und BMIM<sup>+</sup> lag (Tischer, 2011). Die durch die Hydroxylierung reduzierte Hydrophobizität führte letztlich zu Faltungsausbeuten, die im Bereich zwischen HO-EMIM Cl und BMIM Cl lagen und vermutlich auf eine höhere löslichkeitvermittelnde Wirkung des HO-EPy<sup>+</sup> durch das Einbringen der HO-Gruppe im Vergleich zu EMIM<sup>+</sup> zurückzuführen ist. Die Abnahme der Faltungsausbeute mit zunehmenden Konzentrationen war bei diesem Derivat gleich der auf Imidazolium basierenden Verbindungen.

Bei MMIM DMP, einem mit zwei Methylgruppen substituierten Imidazoliumkation in Kombination mit DMP (Dimethylphosphat), ist die moderate Faltungsausbeute, die der Rückfaltung ohne Additiv entspricht, mit zwei negativ wirkenden Effekten zu erklären. Zum einen konnte ein klarer Trend in der Reihe HMIM<sup>+</sup> – EMIM<sup>+</sup> mit einer abnehmenden Löslichkeit von Tryptophan gezeigt werden (Buchfink et al., 2010) und es ist anzunehmen, dass bei dem noch kürzer alkylierten – weniger hydrophoben – MMIM<sup>+</sup> dieser Trend fortgesetzt wird. Im Umkehrschluss kommt dem MMIM<sup>+</sup> eine niedrigere löslichkeitvermittelnde Wirkung zu als dem EMIM<sup>+</sup>. Zum andern hat sich gezeigt, dass Imidazolium-Derivate, die nicht als Chlorid vorlagen, eher ungeeignet als Additiv für die Rückfaltung sind (Buchfink et al., 2010). Die Kombination dieser beiden nachteiligen Effekte spiegelt sich letztlich in einer schlechten Faltungsausbeute wider.

Bei den in dieser Arbeit ebenso getesteten Ionischen Flüssigkeiten der Ammoeng-Reihe handelte es sich um sehr viskose, langkettig substituierte quartäre Amine mit Oligoethylglykol-Ketten. Bei allen drei getesteten Verbindungen wurden bei allen

Konzentrationen schlechtere Ausbeuten erzielt als bei der Rückfaltung ohne Zusatz der Ammoeng-Salze (siehe **Tabelle 4.2**). Somit konnte auch kein Vergleich der Salze untereinander in Bezug auf die Variation der Kat- beziehungsweise Anionen vorgenommen werden.

Die dargestellten Erkenntnisse verdeutlichen, dass der Einfluss Ionischer Flüssigkeiten auf Proteine, im Speziellen hier für EGFP, bei der *in vitro*-Faltung multifaktoriell ist und stark von den physikalischen Eigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten abhängt. Für die Eignung als Faltungsadditiv entscheidend sind das Zusammenspiel (bedingt durch den amphiphilen Charakter der Verbindungen) von Hydrophobizität und löslichkeitvermittelnder Wirkung, deren chaotrope und kosmotrope Eigenschaften sowie die Interaktion mit den Aminosäureseitenketten und dem Peptidrückgrat. Auch die Kombination und Eigenschaften der jeweiligen Kat- und Anionen und die Konzentration der Ionischen Flüssigkeiten sind hier mitbestimmend. Bei den hier getesteten Ionischen Flüssigkeiten zeigte sich, dass nur in einem bestimmten Hydrophobizitätsbereich eine effektive Rückfaltung gewährleistet werden kann. Die löslichkeitvermittelnde Wirkung wird offensichtlich durch moderate hydrophobe Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten (vornehmlich mit aromatischen Aminosäuren, [Tischer, 2011](#)) und leicht unvorteilhaften bzw. leicht vorteilhaften Interaktionen mit dem Peptidrückgrat gewährleistet. Eine zu hohe oder zu niedrige Hydrophobizität wirkt sich hingegen negativ auf die *in vitro*-Faltung aus. Der Einfluss der Konzentration zeigt sich dahingehend, dass in Gegenwart geringer Konzentration der Ionischen Flüssigkeiten die Aggregationsprozesse während der Rückfaltung fast vollständig unterdrückt werden ([Pultke, 2003](#); [Lange et al., 2005](#)), was letztlich zu einer Erhöhung der Ausbeute bei der Faltung führt. Dagegen wirken Ionische Flüssigkeiten in hohen Konzentrationen destabilisierend und zwar verstärkt mit steigender Hydrophobizität, was eine Abnahme der Faltungsausbeute zur Folge hat. Ursächlich ist hier die zunehmende Interaktion mit dem Peptidrückgrat und dessen Solubilisierung. Hingegen wird bei Verbindungen mit geringerer Hydrophobizität und entsprechenden unvorteilhaften Interaktionen in Gegenwart hoher Konzentrationen das Peptidrückgrat nicht solubilisiert, was letztlich zur Bildung von Aggregaten führt.

Unter diesen Gesichtspunkten konnten für die *in vitro*-Faltung von EGFP die Ionischen Flüssigkeiten HO-EMIM Cl, BMIM Cl und HO-EPy Cl als die geeignetsten identifiziert werden. Als eher ungeeignet erwiesen sich die extrem hydrophoben Verbindungen der hier getesteten Ammoeng-Reihe (Ammoeng 100, 111 und 112) sowie Ionische Flüssigkeiten, deren Anion verschieden von Chlorid war.

## 4.2. Denaturierung und Renaturierung von EGFP

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Denaturierung und Renaturierung von EGFP spiegeln die in der Literatur beschriebene hohe Stabilität von GFP-Varianten gegenüber Chaotropen (Ward & Bokman, 1982; Fukuda et al., 2000; Battistutta et al., 2000) und die hohe pH- und Thermostabilität (Bokman & Ward, 1981; Fukuda et al., 2000; Enoki et al., 2004) wider und zeigen, dass EGFP ein sehr langsam faltendes Protein ist. Verdeutlicht wird dies durch eine Geschwindigkeitskonstante im Bereich von  $10^{-8} \text{ s}^{-1}$ , was einer Dauer von Monaten entspricht, um das Faltungsgleichgewicht in Gegenwart von etwa 2 M GuHCl zu erreichen. Die hohe Stabilität ist letztlich auf die kompakte Struktur des  $\beta$ -can fold, einer zylindrischen Anordnung aus 11 antiparallel ausgerichteten  $\beta$ -Strängen, zurückzuführen.

Die derzeit beste Darstellung eines Faltungsmodells von GFP wird von ENOKI präsentiert. Es beinhaltet eine Rückfaltungskinetik mit fünf Phasen und basiert auf einem Säure-induziert denaturierten Zustand (Enoki et al., 2004). Die beiden schnellsten Phasen wurden mittels *stopped-flow*-Methoden bestimmt und einem *burst-phase*-Intermediat und einem *on-pathway molten globule*-Intermediat zugeordnet und beschreiben den Faltungmechanismus zu sehr frühen Zeitpunkten. Die in dieser Arbeit bestimmten kinetischen Parameter zur Faltung von EGFP zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den drei langsameren Phasen von ENOKI und lassen eine Einordnung in das bestehende Faltungsmodell zu (siehe **Abbildung 3.23**). In Gegenwart von HMIM Cl konnte eine nahezu gleiche Charakteristik der dreiphasigen Rückfaltungskinetik beschrieben werden. Somit zeigt sich, dass der Mechanismus der Rückfaltung von GFP, zumindest für die hier dargestellten drei kinetischen Phasen, unabhängig von der verwendeten Denaturierungsmethode ist und bestätigt die Gültigkeit des Modells ebenso für die Rückfaltung aus dem GuHCl- beziehungsweise HMIM Cl-induziert denaturierten Zustand.

Wie aus den experimentellen Daten ersichtlich, ist die Renaturierung jedoch nicht vollständig reversibel und mit der Bildung von Aggregaten verbunden, welche zeitabhängig aus den ungefalteten Zuständen hervorgehen. Dass GFP bei der Faltung einer Aggregatbildung unterliegt, wird in der Literatur beschrieben (Fukuda et al., 2000; Battistutta et al., 2000; Enoki et al., 2004; Huang et al., 2007). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Bildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken, bedingt durch oxidative Prozesse der beiden Cysteine (Cys48 und Cys70). Weitere Gründe für eine unvollständige Rückfaltung könnten auch eine Zerstörung des Chromophors während langer Denaturierungszeiten und die Bildung fehlgefalteter, nicht fluoreszenter Spezies sein (Fukuda et al., 2000), wofür es jedoch in dieser

Arbeit keine konkreten Hinweise gibt. Detailliertere Aussagen zur unvollständigen Rückfaltung des EGFP aus dem denaturierten Zustand und Aggregatbildung während der Faltung werden unter **4.4.** diskutiert.

Für das hier dargestellte Faltungsmodell können folgende allgemeine Aussagen zur Faltung von EGFP in Gegenwart von GuHCl und Ionischen Flüssigkeiten getroffen werden: Die Prozesse zur Denaturierung und Renaturierung sind allgemein reversibel. Das Gleichgewicht zwischen den genannten Zuständen wird durch Aggregatbildung perturbiert und kann somit wie auch in der Literatur als quasi-Gleichgewicht (Stepanenko, 2004) bezeichnet werden. Demzufolge ist die Rückfaltungsausbeute davon abhängig, nach welcher Zeit der Entfaltung die Rückfaltung eingeleitet wird. Neben der Verwendung als Denaturierungsmittel sind Ionische Flüssigkeiten auch Faltungsadditive und wirken auf die entfalteten Spezies unterschiedlich ein. Nach mechanistischen Vorstellungen geschieht dies durch die unterschiedliche Hydrophobizität und den amphiphilen Charakter der verwendeten Ionischen Flüssigkeiten, welche zur Löslichkeit von Strukturbereichen beitragen. Weitere Ausführungen dazu sind Kapitel **4.3.** zu entnehmen.

### **4.2.1. Ionische Flüssigkeiten als Denaturierungsmittel**

Wie an verschiedenen Proteinen wie Lysozym, rPA, scFvOx, RNase A, GFP gezeigt, können Ionische Flüssigkeiten in hohen Konzentrationen denaturierend wirken (Summers & Flowers II, 2000; Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010; Constantinescu et al., 2010; Heller et al., 2010). Mit den in dieser Arbeit verwendeten Ionischen Flüssigkeiten der Reihe EMIM Cl, BMIM Cl und HMIM Cl konnte ein destabilisierender Effekt bestätigt und diese somit auch als Denaturierungsmittel eingesetzt werden. Faltungsuntersuchungen an EGFP zeigten, wie analog für GuHCl dargestellt, eine einphasige Denaturierungskinetik. Der Einfluss auf die Entfaltung des EGFP lässt jedoch Unterschiede im Vergleich zu GuHCl erkennen. In einer halblogarithmischen Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung gegen die Denaturationskonzentration sind deutlich höhere Anstiege ( $m$ -Werte) für die Ionischen Flüssigkeiten ermittelt worden. Die Anstiege, als Index für die lösungsmittelzugängliche Oberfläche (*solvent accessible surface area*, SASA), welche für die Entfaltung direkt proportional zur Änderung der SASA zwischen dem nativen Zustand und dem Übergangszustand ist, sind etwa um den Faktor 2 – 4,5 größer als für GuHCl. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche ist somit während der Entfaltung deutlich größer als bei

der chemisch induzierten Entfaltung in Gegenwart von Guanidiniumhydrochlorid und in folgender Reihenfolge bestimmt worden:



Die Unterschiede der  $m$ -Werte der Denaturierung in Ionischen Flüssigkeiten lassen darauf schließen, dass EMIM Cl eine höhere Zugänglichkeit zur Proteinoberfläche beim Übergang vom nativen in den Übergangszustand der Faltung hat, als BMIM Cl und HMIM Cl. Dies kann mit der geringeren Größe des EMIM<sup>+</sup> im Vergleich zu den beiden anderen Derivaten mit längerer Alkylkettenlänge erklärt werden. Das EMIM<sup>+</sup> ist möglicherweise in der Lage, mehr Interaktionen mit der Proteinoberfläche einzugehen und die Struktur des Übergangszustandes mehr „aufzuweichen“ und somit zu vergrößern als die voluminöseren Verbindungen. Durch das größere Volumen von BMIM<sup>+</sup> und HMIM<sup>+</sup> kommt es hier möglicherweise zu sterischen Behinderungen und damit zu einer verminderten Zugänglichkeit zur Proteinoberfläche.

Aussagen über die Stärke der ionischen Flüssigkeiten als Denaturierungsmittel lassen sich nur bedingt treffen. Für HMIM Cl konnte anhand der Faltungsdaten zu EGFP, mit der Bestimmung des Gleichgewichtsübergangs bei etwa 1,5 M im Gegensatz zu etwa 1,8 M – 2,2 M in Gegenwart von GuHCl, gezeigt werden, dass es ein stärkeres Denaturierungsmittel ist. Aus den Regressionsgeraden der Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung und der Renaturierung in einer halblogarithmischen Auftragung gegen die Denaturationskonzentration wird die Konzentration des Gleichgewichtsübergangs bestimmt. Der Vergleich der ermittelten Konzentrationen, die zur Erreichung dieses Werts benötigt werden, sollte eine Einstufung zulassen. Für EMIM Cl und BMIM Cl wurde dieser Wert jedoch nicht bestimmt, da nicht genügend kinetische Parameter für die Renaturierung erhoben wurden. Somit kann aus den vorhandenen Daten auch nicht direkt abgeleitet werden, ob EMIM Cl und BMIM Cl stärkere Denaturierungsmittel sind als HMIM Cl und GuHCl.

### **4.3. Interaktionen und Wirkmechanismen Ionischer Flüssigkeiten mit EGFP**

Durch die Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten der Kat- und Anionen und Substitutionen einzelner Komponenten ergeben sich verschiedene physikochemische Eigenschaften der Ionischen Flüssigkeiten und daraus unterschiedliche Wechselwirkungen mit Proteinen. So

können Stabilität, Selektivität und Halbwertszeit von Enzymen in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten als reines Lösungsmittel oder Co-Solvens deutlich erhöht werden (siehe **1.2.3.**). Der positive Einfluss Ionischer Flüssigkeiten bei der *in vitro* Faltung von EGFP ist unter **4.1.** beschrieben und in Abhängigkeit von der Hydrophobizität, der Löslichkeitvermittelnden Wirkung und den chaotropen und kosmotropen Eigenschaften zu sehen. Diese Abhängigkeiten konnten qualitativ ähnlich auch für Lysozym, rPA und scFvOx nachgewiesen werden (Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010). Der in dieser Arbeit aufgezeigte destabilisierende Einfluss hoher Konzentrationen Ionischer Flüssigkeiten auf EGFP, welcher mit Zunahme der Hydrophobizität verstärkt wird, ist in der Literatur für weitere Proteine in ähnlicher Weise beschrieben worden (Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010; Constantinescu et al., 2007 und 2010). Hier wurde eine Einordnung der verschiedenen Kat- und Anionen hinsichtlich ihrer Chaotropizität bzw. Kosmotropizität vorgenommen. Diese Stabilitätsstudien zeigten, dass sich Ionischen Flüssigkeiten in die für einfache anorganische Salze bekannte Hofmeister-Reihe einordnen lassen. So kann anhand der verwendeten Kat- und Anionen eine Korrelation hergestellt werden, welche Ionischen Flüssigkeiten stabilisierend oder destabilisierend auf den nativen Zustand der Proteine wirken. Jedoch liefern diese Erkenntnisse keine vollständige mechanistische Erklärung über die Wirkungsweise und ob es sich hierbei um spezifische oder unspezifische Interaktionen mit Proteinen oder Strukturelementen dieser handelt.

Detailliertere Interpretationen zu den Wirkmechanismen sind von TISCHER erarbeitet worden (Tischer, 2011; Tischer et al., 2014). Anhand von Löslichkeitsmessungen und der Bestimmung von Transferenergien von Aminosäuren und DKP (einem Modell des Peptidrückgrats) in Ionischen Flüssigkeiten konnten Abhängigkeiten und Zusammenhänge festgestellt werden, welche die hier vorgestellten experimentellen Ergebnisse untermauern und mechanistisch interpretieren lassen. So zeigte sich für EMIM Cl eine deutlich vorteilhafte Interaktion mit aromatischen Aminosäuren (Trp, Tyr und Phe) insbesondere mit Tryptophan. Dies wurde in der Reihe EMIM Cl – OMIM Cl noch verstärkt. Die ermittelten Transferenergien für DKP in EMIM Cl und BMIM Cl waren positiv, was für eine unvorteilhafte Interaktion mit dem Peptidrückgrat spricht. Mit zunehmender Alkylkettenlänge wurde die Interaktion zunehmend vorteilhafter. Das bedeutet letztlich, dass Ionischen Flüssigkeiten mit längeren Alkylketten stark mit den Seitenketten der Aromaten interagieren und mit zunehmender Alkylkettenlänge die denaturierende Wirkung dahingehend verstärkt wird, als dass auch das Peptidrückgrat durch zunehmend vorteilhafte Interaktionen solubilisiert wird.

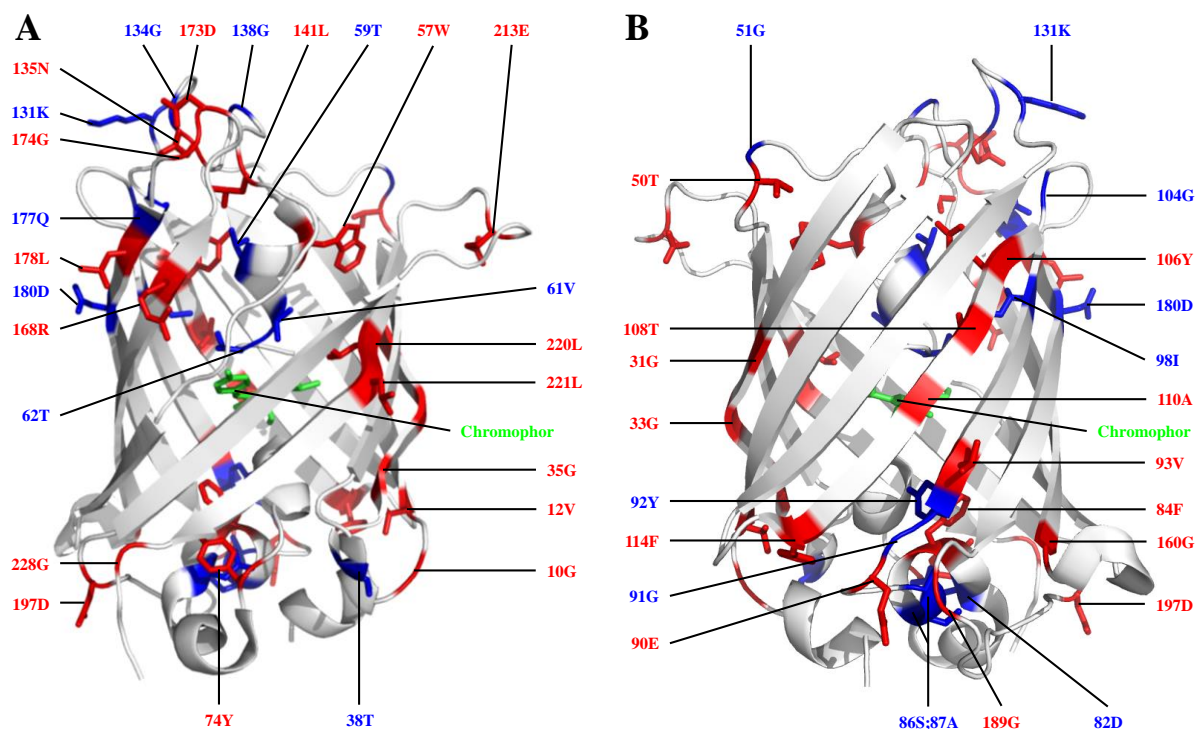
Diese Betrachtungsweise und Aussagen beziehen sich jedoch nur auf einzelne Aminosäuren mit freier Zugänglichkeit zum Lösungsmittel. Das entspricht jedoch nicht den natürlichen

Gegebenheiten von Proteinen, da hydrophobe Aminosäureseitenketten häufig ins Innere gerichtet und geladene Seitenketten an der Oberfläche lokalisiert sind und dem Lösungsmittel exponiert vorliegen. Theoretisch vorteilhafte oder unvorteilhafte Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten und dem Peptidrückgrat sind somit differenzierter zu betrachten. Von Interesse war deshalb, ob diese Interpretation über die Interaktionen mit Aminosäuren und dem Peptidrückgrat von der Ebene der Aminosäuren auf Proteine übertragbar ist. Ziel dieser Arbeit war es deshalb unter anderem, mittels spektroskopischer Methoden die diskutierten Interaktionen und Wechselwirkungen auf Proteinebene zu untersuchen und darzustellen.

Hierfür war die 2D-NMR-Spektroskopie als strukturanzeigende Methode geeignet, welche direkte Wechselwirkungen ionischer Flüssigkeiten mit Proteinen für einzelne Aminosäuren sichtbar macht. Für diesen Zweck wurde eine Konzentration von ionischer Flüssigkeit gewählt, die über den Zeitraum der Messung nicht zur Denaturierung des EGFP führte, jedoch mögliche Wechselwirkungen und strukturelle Veränderungen nachweisen sollte. Durch den Vergleich hochaufgelöster  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren unter nativen Bedingungen und in Gegenwart von 1 M HMIM Cl konnte (nach entsprechender Referenzierung und Überlagerung der Spektren) der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf EGFP visualisiert werden (siehe **Abbildung 7.1.**). Anhand der veränderten chemischen Verschiebung der Signale der Amidprotonen war somit die Unterscheidung zwischen schwacher und starker Wechselwirkung, gezielt für einzelne Aminosäuren, möglich. Der Einfluss der anionischen Komponente des HMIM Cl auf die Stabilität des EGFP ist eher moderat einzuschätzen, da sich das  $\text{Cl}^-$  nach der Einstufung in der Hofmeister-Reihe im Grenzbereich zwischen kosmotrop und chaotrop befindet. Daher liegt das Hauptaugenmerk bei der Beurteilung von Effekten bei der kationischen Komponente. Zu bedenken ist, dass es sich bei der kationischen Komponente des HMIM Cl um eine amphiphile Struktur handelt, deren Imidazolium-Kopfgruppe eine partiell positive Ladung trägt und deren Alkylkette hydrophob ist. Bei der Bewertung und Interpretation der Spektren ist somit zu berücksichtigen, dass die chemische Verschiebung der Signale der Amidprotonen zum einen durch eine direkte Wechselwirkung mit dem Peptidrückgrat und zum anderen indirekt als Folge der Wechselwirkung der ionischen Flüssigkeiten mit den Aminosäureseitenketten zustande kommen kann. Hierbei ist anzunehmen, dass es durch den amphiphilen Charakter des  $\text{HMIM}^+$  zu ionischen Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Aminosäuren und der Imidazolium-Kopfgruppe und weiterhin zu hydrophoben Interaktionen mit der Alkylkette des  $\text{HMIM}^+$  kommen kann. Zudem kann auch eine starke Interaktion mit direkt angrenzenden Aminosäuren ursächlich für eine Signalverschiebung der benachbarten Aminosäuren sein. In der Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren

(siehe **Abbildung 7.1.**) konnten 50 Signale Aminosäuren zugeordnet und somit etwa 20 % aller Aminosäuren erfasst werden. Davon wurde für 17 Aminosäuren eine schwache bzw. keine und für 29 Aminosäuren eine starke chemische Verschiebung festgestellt (die chemische Verschiebung der verbleibenden vier Signale konnte nicht mit ausreichender Genauigkeit zugeordnet werden).

Bei den Signalen mit geringer chemischer Verschiebung (blau) handelt es sich größtenteils um Aminosäuren, welche basisch sind beziehungsweise direkt von basischen Aminosäuren flankiert werden, und für die deshalb auch eine Interaktion mit dem  $\text{HMIM}^+$  eher unwahrscheinlich ist.



**Abbildung 4.1:** Darstellung von Aminosäuren des EGFP mit starker und schwacher Wechselwirkung in Gegenwart von 1 M HMIM Cl.

Dargestellt ist EGFP in der Vorderansicht (A) und der Rückansicht um  $180^\circ$  gedreht (B). Die Auswahl der dargestellten Aminosäuren basiert auf der Zuordnung von Signalen aus den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren in **Abbildung 7.1**. Signale mit einer großen chemischen Verschiebung im Vergleich zum nativen Protein deuten auf eine stärkere Wechselwirkung der Aminosäure mit den Ionischen Flüssigkeiten hin und sind rot markiert. Im Gegensatz dazu weisen Signale mit einer geringen chemischen Verschiebung auf eine schwächere Wechselwirkung der Aminosäure mit der Ionischen Flüssigkeit hin und sind blau markiert.

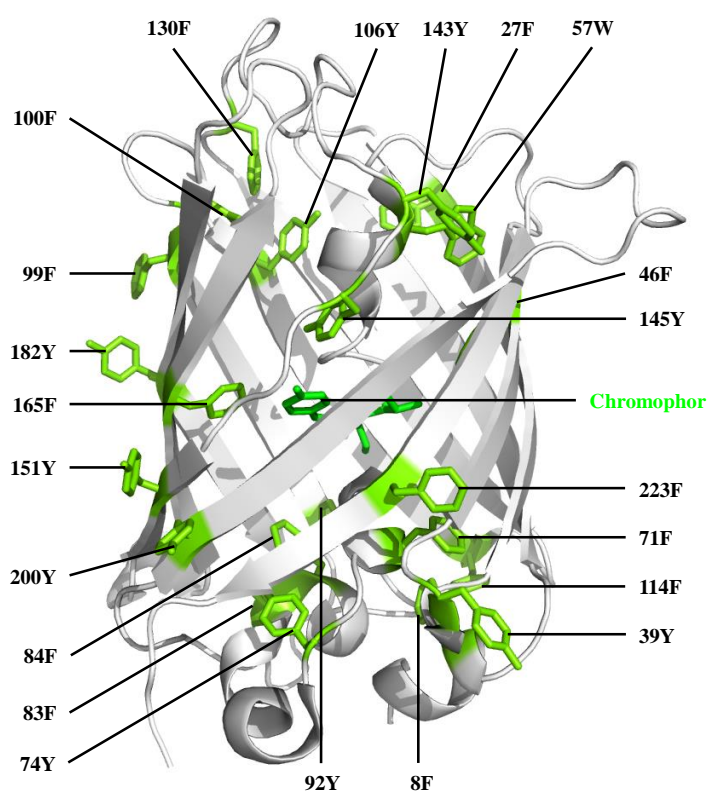
Die Abbildung ist in freundlicher Zusammenarbeit mit Frau Dr. Annett Weidner entstanden.

Weitere Aminosäuren mit geringer chemischer Verschiebung sind im Inneren des EGFP lokalisiert und somit nicht zugänglich (siehe **Abbildung 4.1**). Hervorzuheben ist hier Tyr92 als aromatische Aminosäure, welche, laut Annahme aus den Löslichkeitsmessungen mit Aminosäuren, eine starke Interaktion mit HMIM Cl anzeigen sollte (Tischer, 2011; Tischer et



al., 2014). Die dennoch nur schwache chemische Verschiebung kann damit begründet werden, dass die Orientierung der aromatischen Seitenkette ins Innere gerichtet ist und sie somit auch nicht mit der Ionischen Flüssigkeit interagieren kann.

Bei den Signalen mit starker chemischer Verschiebung handelt es sich vornehmlich um Glycine, hydrophobe, aromatische und negativ geladene Aminosäuren. Bei genauerer Betrachtung und nach Struktur- und Sequenzabgleich (siehe **Abbildung 4.1.** und **Tabelle 7.12.**) kann man die Signale beziehungsweise die zugeordneten Aminosäuren in zwei Gruppen einordnen. Die 1. Gruppe besteht aus Aminosäuren, deren Signaländerungen unspezifisch sind (G10, V12, G24, T50, N135, G160 und G228) und auf deren Lage in exponierten Regionen (in *loops* oder in Übergangsbereichen von *loop*-Strukturen zu  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Strängen) zurückzuführen sind. Da in diesen Strukturbereichen *per se* mit einer höheren Flexibilität und Dynamik zu rechnen ist, kann damit folgerichtig auch eine stärkere chemische Verschiebung erklärt werden. Die größere Gruppe mit Aminosäuren, deren Signaländerung auf spezifische Interaktionen zurückzuführen ist, kann nochmals unterteilt werden. Als spezifische Interaktion der Ionischen Flüssigkeit kann die Signalverschiebung der aromatischen Aminosäuren Tyr74, Phe84, Tyr106 und Phe114 gewertet werden. Hierbei handelt es sich um Aromaten, welche sich vornehmlich in *loops*, exponierten helikalen Bereichen oder in einem Übergangsbereich von einer *loop*-Struktur zu  $\beta$ -Strängen befinden (siehe **Abbildung 4.2.** und **Tabelle 7.12.**).



**Abbildung 4.2:** Darstellung aromatischer Aminosäuren des EGFP.

Die Darstellung zeigt natives EGFP mit den aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan mit der räumlichen Orientierung der Seitenketten. Die Abbildung ist in freundlicher Zusammenarbeit mit Frau Dr. Annett Weidner entstanden.

Die Seitenketten dieser Aromaten sind unter nativen Bedingungen zwar nicht direkt oberflächenexponiert, aber offensichtlich in Gegenwart von 1 M HMIM Cl zugänglich, da hier starke chemische Verschiebungen ersichtlich waren. Die Interaktion kann also indirekt als Folge einer Wechselwirkung mit den Seitenketten verstanden werden. Durch diese Wechselwirkungen kommt es zu strukturellen Veränderungen im Peptidrückgrat, deren Ausdruck eine veränderte chemische Verschiebung der Signale der Amidprotonen ist. Zu den vier erwähnten indirekten Wechselwirkungen konnte zudem eine direkte des HMIM Cl mit einer Seitenkette einer aromatischen Aminosäure nachgewiesen werden. Bei dem Signal des Trp57 handelt es sich um die NH-Gruppe des Indolrings. Diese starke chemische Verschiebung spiegelt somit eine direkte Interaktion zwischen HMIM Cl und der Seitenkette des Tryptophans wider und untermauert die von TISCHER beschriebenen Ergebnisse aus den Löslichkeitsmessungen mit Aminosäuren (Tischer, 2011; Tischer et al., 2014). Darüber hinaus zeigte sich, dass der Großteil der spezifischen Wechselwirkungen des HMIM Cl auf eine Interaktion der negativ geladenen Aminosäuren beziehungsweise auf Aminosäuren mit direkter Nachbarschaft zu negativ geladenen Aminosäuren zurückzuführen ist (siehe **Tabelle 7.12.**). Als Ursache ist hier die Interaktion der partiell positiv geladenen Imidazolium-Kopfgruppe des HMIM<sup>+</sup> mit den Carboxylatgruppen der Glutamin- und Asparaginsäure über ionische Wechselwirkungen anzunehmen. Durch diese Anlagerung des HMIM<sup>+</sup> kann es somit zu einer partiellen Verdrängung der Hydrathülle des Peptidrückgrats durch den hydrophoben Alkylrest kommen und somit zu einer Destabilisierung von Strukturelementen. Ähnliche Ergebnisse und Interpretationen sind von FIGUEIREDO an Im7 in Gegenwart von Ionischen Flüssigkeiten durch NMR-spektroskopische Untersuchungen beschrieben worden (Figueiredo et al., 2013). Hier wurden unter anderem vergleichende NMR-Experimente mit EMIM<sup>+</sup> und BMIM<sup>+</sup> in Kombination mit Cl<sup>-</sup> und Dicyanamid (dca<sup>-</sup>) durchgeführt. Bei der anionischen Komponente zeigte sich für das Chlorid ein eher geringer und für dca<sup>-</sup> ein deutlich stärkerer destabilisierender Einfluss entsprechend der Einordnung der Anionen in die Hofmeister-Reihe, wie es von der Gruppe um WEINGÄRTNER für selbige Verbindungen durch DSC-Messungen an Ribonuklease A gezeigt wurde (Constantinescu et al., 2007 und 2010). Für die kationische Komponente zeigte sich mit zunehmender Länge der Alkylkette (respektive zunehmender Hydrophobizität) eine stärkere Interaktion des BMIM<sup>+</sup> im Vergleich zu EMIM<sup>+</sup> an der negativ geladenen Proteinoberfläche des Im7. Die Destabilisierung wird demzufolge durch eine höhere Hydrophobizität der Alkylkette begünstigt. Die Wirkungsweise wird mechanistisch so erklärt, dass es mit dem zunehmend hydrophoben Charakter zu einer verstärkten Dehydratisierung geladener Proteinbereiche kommt, mit der Folge einer Exposition hydrophober Oberflächen

zum Lösungsmittel. Resultierend kommt es zur verstärkten Interaktion der Ionischen Flüssigkeit mit hydrophoben Aminosäureseitenketten was letztlich zur Entfaltung des Proteins führt (Figueiredo et al., 2013). Diese Interpretation geht mit den oben beschriebenen Ausführungen über die Wirkmechanismen des HMIM Cl auf EGFP einher und unterstützt diese. Um die Modellvorstellung der *preferential interaction* mechanistisch besser zu verstehen und den Einfluss der Hydrophobizität, die Interaktion mit den Aromaten und die ionischen Wechselwirkungen besser auszuarbeiten, sollten Vergleichsmessungen mit den Kationen in der Reihe von EMIM<sup>+</sup> – OMIM<sup>+</sup> und anderen Denaturierungsmitteln wie Harnstoff oder GuHCl einen besseren Aufschluss geben. Eine Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen Interaktionen könnte somit genauer vorgenommen und eine Modellvorstellung besser ausformuliert werden.

Anhand der unterschiedlichen chemischen Verschiebung einzelner Signale in den <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-TROSY-HSQC unter nativen Bedingungen und in Gegenwart von 1 M HMIM Cl konnte für EGFP auf Proteinebene gezeigt werden, dass es zu spezifischen Interaktionen zwischen Ionischen Flüssigkeiten und den Seitenketten aromatischer Aminosäuren kommt, wenn diese zugänglich sind. Die hier dargestellten Erkenntnisse der *preferential interaction* aus den <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-TROSY-HSQC Experimenten gehen mit den von TISCHER erhobenen Ergebnissen aus den Löslichkeitsversuchen mit Aminosäuren in Ionische Flüssigkeiten, bei denen eine erhöhte Löslichkeit der Aromaten vorlag, einher (Tischer, 2011; Tischer et al., 2014). Darüber hinaus wurde für HMIM Cl gezeigt, dass ein großer Teil der Interaktionen auf ionische Wechselwirkungen der Ionischen Flüssigkeit mit negativ geladenen Aminosäuren zurückzuführen ist. Ursächlich für die strukturelle Veränderung an EGFP ist somit die Kombination aus hydrophober Interaktion der Alkylkette mit den Aromaten, als auch ionische Wechselwirkungen der partiell positiv geladenen Imidazolium-Kopfgruppe mit den funktionellen Gruppen saurer Aminosäuren, in deren Folge es zur Dehydratisierung des Proteins und Entfaltung kommt.

### **4.3.1. Strukturelle Unterschiede im denaturierten Zustand von EGFP**

Wie bereits ausführlich beschrieben, üben die hier verwendeten N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloride in hohen Konzentrationen einen stark destabilisierenden Einfluss auf EGFP aus. Diese Ionischen Flüssigkeiten können als starke Denaturierungsmittel

eingestuft werden. Im Gegensatz zu der aggregationsunterdrückenden Wirkung der Ionischen Flüssigkeiten in niedermolaren Konzentrationsbereichen (Pultke, 2003), welche sie als Rückfaltungshelfer auszeichnet, unterbinden sie unter denaturierend wirkenden Konzentrationen ein Aggregieren jedoch nicht. Zudem lassen sich unter denaturierenden Bedingungen mittels spektroskopischer Methoden Unterschiede zwischen dem IL- und GuHCl-induziert denaturierten Zustand feststellen. Es konnte anhand von CD-Spektren im VIS-Bereich, also bei Betrachtung der EGFP-spezifischen chromophoren Gruppe, ein zum GuHCl-induziert denaturierten Zustand deutlich verschiedenes Spektrum dargestellt werden. Dem könnte eine unterschiedliche Form der Interaktion der Ionischen Flüssigkeiten mit Proteinen im Vergleich zum GuHCl zugrunde liegen und nahelegen, dass der Zustand nach chemischer Denaturierung durch Ionische Flüssigkeiten verschieden von dem durch GuHCl-induzierten ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass dies nur die Folge einer Interaktion Ionischer Flüssigkeiten mit dem ausgedehnten  $\pi$ -Elektronensystem des freiliegenden Chromophors ist. Durch den aromatischen Charakter der N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloride könnte allerdings auch durch Wechselwirkungen beider aromatischer Systeme die Elektronendichte des Chromophors so verändert werden, dass die ausgeprägte Schulter bei 442 nm, wie sie in Gegenwart von GuHCl deutlich zu sehen ist, ausgelöscht beziehungsweise überlagert wird und somit ein verändertes Messsignal liefert. Der Vergleich von IR-Spektren zwischen den denaturierten Zuständen des EGFP, induziert durch Ionische Flüssigkeiten beziehungsweise durch Hitze, weist ebenso Unterschiede im Bereich der Amid I-Bande respektive Sekundärstrukturelemente auf. So ist der Anteil von intermolekularen  $\beta$ -Strängen im durch Ionische Flüssigkeiten denaturierten Zustand deutlich geringer als im thermisch denaturierten Zustand. Der Anteil an intermolekularen  $\beta$ -Strängen ist jedoch weiter klar dominierend. Mit der Modellvorstellung der *preferential interaction* wie sie unter 4.3. beschrieben ist, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Vielzahl an Interaktionen, die Ionische Flüssigkeiten mit EGFP eingehen und durch den hydrophoben Charakter der durch die Alkylierung eingebracht wird, der denaturierte Zustand vom GuHCl-induzierten strukturell verschieden ist. Definierte Strukturen wie Fibrillen, wie für RNase A und Lysozym in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten in der Literatur beschrieben (Byrne & Angell, 2009; Constantinescu et al., 2010), konnten nicht gezeigt werden.

## 4.4. Aggregationsverhalten von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten

Die Rückfaltung des GFP aus dem chemisch- und Säure-induziert denaturierten Zustand ist kein vollständig reversibler Prozess und als solcher auch in der Literatur beschrieben (Fukuda et al., 2000; Battistutta et al., 2000; Enoki et al., 2004; Huang et al., 2007). Die Faltung des EGFP wird durch Aggregationsprozesse perturbiert und geht mit einem Verlust der Faltungsausbeute in Abhängigkeit der Denaturierungszeit einher.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aggregation während des Rückfaltungsprozesses in niedermolaren Konzentrationsbereichen Ionischer Flüssigkeiten (< 300 mM; 1-Butyl-4-methylpyridinium-tetrafluoroborat und EMIM Cl) unterdrückt beziehungsweise verlangsamt wird (Pultke, 2003). Der Mechanismus der Aggregation blieb unter den gewählten Reaktionsbedingungen bei der Überführung des EGFP aus dem GuHCl-induziert denaturierten Zustand in einen Rückfaltungspuffer (0,1 mg/ml, 0,6 M GuHCl, 30 °C) in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten unverändert. Die Reaktionsordnung der initialen Aggregationsreaktion – die Nukleationskeimbildung – wurde beibehalten, jedoch um den Faktor 3 verlangsamt. Die sich anschließende Polymerisationsreaktion wurde fast vollständig unterdrückt.

Ein anderes Verhalten konnte jedoch nach Inkubation in Gegenwart hoher Konzentrationen Ionischer Flüssigkeiten bei der Rückfaltung aufgezeigt werden. Hier war erkennbar, dass es zunehmend zu Aggregationsprozessen mit einem negativen Einfluss auf die Ausbeute während der Rückfaltung kommt. Die Abnahme der Faltungsausbeute über die Zeit in Gegenwart hoher Konzentrationen Ionischer Flüssigkeiten wurde durch eine biphasische Kinetik beschrieben und die apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  für die jeweilige Phase bestimmt (siehe 3.6.4.). Die bei den ausgewählten Konzentrationen der Ionischen Flüssigkeiten ermittelte apparente Geschwindigkeitskonstante, der nur wenige Stunden umfassenden ersten Phase entsprach jeweils etwa der Geschwindigkeitskonstante, die für die Denaturierung der getesteten Verbindungen bei den entsprechenden Konzentrationen ermittelt worden waren. Die Geschwindigkeit, mit der die Ausbeute in der ersten Phase der Kinetik abnahm, korreliert offenbar direkt mit der Denaturierung des EGFP. Dies könnte bedeuten, dass es während des Denaturierungsprozesses, bedingt durch die Interaktion der IL mit EGFP, zur Bildung und Akkumulierung aggregationsanfälliger Strukturen kommt. In der zweiten deutlich langsameren Phase führt dies zunehmend zur Bildung von Aggregaten. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Ionischen Flüssigkeiten. In Gegenwart von 5,4 M EMIM Cl konnte nach 14-tägiger Denaturierungszeit ein vollständiger Verlust der Faltungsausbeute abgebildet

werden. Zudem wurde die Abnahme der Faltungsausbeute bei Erhöhung der Proteinkonzentration deutlich beschleunigt. In Gegenwart von 3,9 M BMIM Cl und 3,0 M HMIM Cl war der Verlust der Faltungsausbeute nach selber Denaturierungsdauer hingegen nicht vollständig und es konnte eine Ausbeute von etwa 20 % – 35 % unabhängig von der hier eingesetzten Proteinkonzentration (0,1 bis 2,5 mg/ml) bestimmt werden. Die Verschiedenheit im Aggregationsverhalten kann mit den unterschiedlichen Interaktionen der einzelnen Ionischen Flüssigkeiten, die sie mit EGFP eingehen, erklärt werden. Wie in Kapitel 4.1.1. und 4.3. diskutiert, ist das Zusammenspiel (bedingt durch den amphiphilen Charakter der Verbindungen) von Hydrophobizität, löslichkeitvermittelnder Wirkung sowie die Interaktion mit den Aminosäureseitenketten und dem Peptidrückgrat entscheidend. Für EMIM Cl gab es zwar vorteilhafte Interaktionen mit hydrophoben Aminosäuren (besonders vorteilhaft mit aromatischen Aminosäuren), aber die Interaktion mit DKP als Modell für das Peptidrückgrat war unvorteilhaft, so dass EMIM Cl zwar denaturierend aber nicht solubilisierend wirkt (Löslichkeitsmessungen von Aminosäuren in IL – [Tischer, 2011](#), [Tischer et al., 2014](#)). Dieser Umstand könnte ursächlich für die irreversible Aggregation des EGFP sein. Im Umkehrschluss könnte die zunehmend vorteilhafte Interaktion mit DKP respektive mit dem Peptidrückgrat bei zunehmender Länge der Alkylkette der Ionischen Flüssigkeiten zu Bedingungen führen, die einer Irreversibilität der Rückfaltung teilweise entgegenwirken oder sie zumindest zeitlich verzögern. Durch den höheren Solubilisierungsgrad des Peptidrückgrats erhöht sich offensichtlich die Löslichkeit der denaturierten Spezies, was der Aggregation entgegenwirkt. Dass es sich um die Bildung hochmolekularer Aggregate handelt, zeigen die AF4-Messungen und die Bestimmung der hydrodynamischen Radien durch dynamische Lichtstreuung unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart hoher IL-Konzentrationen (siehe 3.7.). Gleiche Aussagen konnten aus den Ergebnissen der IR-Spektroskopie und NMR-Messungen in Gegenwart von hochmolaren HMIM Cl-Lösungen getroffen werden. Das Maximum der erhobenen IR-Spektren bei einer Wellenzahl von etwa  $1617\text{ cm}^{-1}$  weist deutlich auf denaturierte beziehungsweise aggregierte  $\beta$ -Stränge hin ([Herberhold et al., 2003](#)). Die Bildung definierter Strukturen wie Fibrillen, wie es für RNase A und Lysozym in der Literatur beschrieben wird ([Byrne & Angell, 2009](#); [Constantinescu et al., 2010](#)), konnte jedoch nicht gezeigt werden. Am deutlichsten war der Effekt der Aggregation in Gegenwart von EMIM Cl, da hier die Aggregationsbildung im zeitlichen Verlauf bereits durch eine visuelle Betrachtung der Denaturierungsansätze beobachtet werden konnte.

## 5. Zusammenfassung

Der Einsatz Ionischer Flüssigkeiten in der Proteinchemie, im Speziellen die Anwendung in der Proteinfaltung, ist vergleichsweise neu und relativ unerforscht. Die Ergründung von Wirkmechanismen und Effekten und deren Auswirkung auf Proteine sind von prinzipieller Bedeutung und können ergänzende Beiträge liefern, um die Effizienz der *in vitro*-Proteinfaltung zu erhöhen.

Angesichts einer hohen Eigenabsorption durch Verunreinigungen und des aromatischen Charakters einiger Ionischer Flüssigkeiten und der daraus resultierenden Interferenzen bei Anwendung spektroskopischer Methoden, gerade in Gegenwart hoher Konzentrationen, wurde EGFP als Modellprotein gewählt. Dieses Protein sollte aufgrund seiner charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften, welche auch direkt mit der strukturellen Integrität korrelieren, eine spektroskopische Analyse der experimentellen Fragestellungen erlauben.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde mittels verschiedener spektroskopischer Methoden der Einfluss der Länge der Alkylketten respektive der Hydrophobizität von N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden und deren endständig hydroxylierter Analoga auf die Faltung, Denaturierung und Aggregation von EGFP analysiert. Ergänzt wurde diese systematische Reihe durch quartäre Amine und auf Pyridin basierender Ionischer Flüssigkeiten sowie Kombinationen mit unterschiedlichen Anionen. Für einige der getesteten Ionischen Flüssigkeiten konnte eine deutliche Erhöhung der Rückfaltungsausbeute von EGFP gezeigt werden, welche das durch L-Arginin vermittelte hohe Rückfaltungsniveau erreichten beziehungsweise übertrafen. Konnte für die Reihe der endständig hydroxylierten Verbindungen HO-EMIM Cl bis HO-HMIM Cl noch eine klare Korrelation zwischen Hydrophobizität der IL und Faltungsausbeute hergestellt werden (Abnahme der Ausbeute mit zunehmender Hydrophobizität), war dies für die Reihe der nicht endständig hydroxylierten Analoga nicht der Fall. Stark hydrophobe Verbindungen, wie die der Ammoeng-Reihe und Verbindungen deren Anion von Chlorid verschieden ist, waren als Additive bei der *in vitro*-Proteinfaltung des EGFP ungeeignet. Dies verdeutlicht, dass der Einfluss der Ionischen Flüssigkeiten auf EGFP ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren ist. Neben der Hydrophobizität spielen Faktoren wie löslichkeitvermittelnde Wirkung, chaotrope und kosmotrope Eigenschaften sowohl der Kat- als auch der Anionen sowie die Interaktion mit den Aminosäureseitenketten und dem Peptidrückgrat eine entscheidende Rolle für die Eignung als Faltungsadditiv. Die Balance zwischen vorteilhaften Interaktionen mit Aminosäureseitenketten und leicht unvorteilhaften beziehungsweise leicht vorteilhaften Interaktionen mit dem Peptidrückgrat ist hier bestimmend. Unter diesen Gesichtspunkten konnten für die *in vitro*-

Faltung von EGFP die Ionischen Flüssigkeiten HO-EMIM Cl, BMIM Cl und HO-EPy Cl als die am besten geeigneten identifiziert werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, diese Effekte und mögliche Interaktionen mechanistisch auf Proteinebene zu untersuchen. Exemplarisch wurde durch den Vergleich hochaufgelöster  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren unter nativen Bedingungen und in Gegenwart von 1 M HMIM Cl der Einfluss Ionischer Flüssigkeiten auf EGFP visualisiert. Es zeigte sich, dass es zu spezifischen Interaktionen zwischen Ionischen Flüssigkeiten und aromatischen Aminosäuren kommt, wenn diese zugänglich sind, und dass ein Großteil der Interaktionen auf ionische Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Vermittelt wird dies durch die partiell positiv geladene Imidazolium-Kopfgruppe und die funktionellen Gruppen saurer Aminosäuren. Diese Interaktionen entsprechen somit der Modellvorstellung der *preferential interaction*. In Folge dessen kommt es zur Dehydratisierung des Proteins und Entfaltung.

Die in dieser Arbeit untersuchten Ionischen Flüssigkeiten wirken in hohen Konzentrationen denaturierend. Ausgehend vom chemisch denaturierten Zustand, induziert durch Ionische Flüssigkeiten, wurde durch intensive Rückfaltungsanalysen nachgewiesen, dass die mehrphasige Kinetik der Rückfaltung mit steigenden IL-Konzentrationen im Rückfaltungspuffer nur verlangsamt wurde, der Charakter der Kinetik jedoch nahezu unverändert blieb. Die Rückfaltung mit zunehmender Inkubationsdauer ging jedoch mit einer veränderten Kinetik einher. EGFP unterlag hier einer fortschreitenden Veränderung im denaturierten Zustand und unterschied sich im zunehmenden Maße vom anfänglichen denaturierten Zustand. Ferner wurde eine Abnahme der Rückfaltungsausbeute in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer beobachtet, da der Faltungsprozess durch Aggregation perturbiert wird. Vergleichend für EMIM Cl, BMIM Cl und HMIM Cl wurde die Rückfaltung des EGFP in Abhängigkeit der Inkubationsdauer und Proteinkonzentration anhand von Doppelsprungexperimenten untersucht. Für EMIM Cl gestaltete sich dieser Prozess über die Zeit als irreversibel und führte zum Verlust der Ausbeute, welcher durch eine Erhöhung der Proteinkonzentration noch beschleunigt wurde. Dies konnte für BMIM Cl und HMIM Cl in dieser Ausprägung nicht bestätigt werden. Hohe Konzentrationen EMIM Cl wirken zwar denaturierend aber durch die leicht unvorteilhaften Interaktionen des EMIM Cl mit dem Peptidrückgrat nicht solubilisierend. Dieser Umstand könnte ursächlich für die irreversible Aggregation des EGFP sein. Im Umkehrschluss führt ein höherer Solubilisierungsgrad durch vorteilhaftere Interaktion mit dem Peptidrückgrat bei zunehmender Länge der Alkylkette der Ionischen Flüssigkeiten zu Bedingungen, die einer Irreversibilität der Rückfaltung teilweise entgegenwirken oder sie zumindest zeitlich verzögern.



## 6. Literaturverzeichnis

- [Ando R., Hama H., Yamamoto-Hino M., Mizuno H., Miyawaki A., *An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2002** Oct 1;99(20):12651-12656]
- [Anfinsen C.B., Haber E., Sela M., White F.H. Jr., *The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1961** Sep 15;47:1309-1314]
- [Arakawa T. & Tsumoto K., *The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation*; Biochemical and Biophysical Research Communications, **2003** Apr 25;304(1):148-152]
- [Bae J.H., Rubini M., Jung G., Wiegand G., Seifert M.H., Azim M.K., Kim J.S., Zumbusch A., Holak T.A., Moroder L., Huber R., Budisa N., *Expansion of the genetic code enables design of a novel "gold" class of green fluorescent proteins*; Journal of Molecular Biology (JMB), **2003** May 16;328(5):1071-1081]
- [Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y., *Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2000** Oct 24;97(22):11984-11989]
- [Baldwin R.L., *How Hofmeister ion interactions affect protein stability*; Biophysical Journal, **1996** Oct;71(4):2056-2063]
- [Bardwell J.C., McGovern K., Beckwith J., *Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo*; Cell, **1991** Nov 1;67(3), 581-589]
- [Battistutta R., Negro A., Zanotti G., *Crystal structure and refolding properties of the mutant F99S/M153T/V163A of the green fluorescent protein*; Proteins, **2000** Dec 1;41(4):429-437]
- [Birnboim H.C. & Doly J., *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*; Nucleic Acids Research, **1979** Nov 24;7(6):1513-1523]
- [Bokman S.H. & Ward W.W., *Renaturation of Aequorea gree-fluorescent protein*; Biochemical and Biophysical Research Communications, **1981** Aug 31;101(4):1372-1380]
- [Bose S., Armstrong D.W., Petrich J.W., *Enzyme-catalyzed hydrolysis of cellulose in ionic liquids: a green approach toward the production of biofuels*; The Journal of Physical Chemistry B, **2010** Jun 24;114(24):8221-8227]
- [Buchner J., *Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones.*; Federation of American Societies For Experimental Biology (FASEB), **1996** Jan;10(1):10-19]
- [Buchfink R., Tischer A., Patil G., Rudolph R., Lange C., *Ionic liquids as refolding additives: variation of the anion*; Journal of Biotechnology, **2010** Oct 1;150(1):64-72]
- [Byler D.M. & Susi H., *Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra*; Biopolymers, **1986**;25:469-487]
- [Byrne N. & Angell C.A., *Formation and dissolution of hen egg white lysozyme amyloid fibrils in protic ionic liquids*; Chemical Communications, **2009**;1046-1048]

- [Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*; Science, **1994** Feb 11;263(5148):802-805]
- [Chudakov D.M., Verkhusha V.V., Staroverov D.B., Souslova E.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A., *Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking*; Nature Biotechnology, **2004** Nov;22(11):1435-1439]
- [Collins K.D., *Charge density-dependent strength of hydration and biological structure*; Biophysical Journal, **1997** Jan;72(1):65-76]
- [Constantinescu D., Weingärtner H., Herrmann C., *Protein denaturation by ionic liquids and the Hofmeister series: a case study of aqueous solutions of ribonuclease A*; Angewandte Chemie International Edition, **2007**;46(46):8887-8889]
- [Constantinescu D., Herrmann C., Weingärtner H., *Patterns of protein unfolding and protein aggregation in ionic liquids*; Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP, **2010** Feb 28;12(8):1756-1763]
- [Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S., *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*; Gene, **1996**;173(1 Spec No):33-38]
- [Cubitt A.B., Heim R., Adams S.R., Boyd A.E., Gross L.A., Tsien R.Y., *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*; Trends in Biochemical Sciences, **1995** Nov;20(11):448-455]
- [De Los Ríos A.P., Hernández-Fernández F.J., Martínez F.A., Rubio M. and VÍllora G., *The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of Candida antarctica lipase B in transesterification reactions*; Biocatalysis and Biotransformation, **2007**; 25(24):151-156]
- [Dreyer S. & Kragl U., *Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes*; Biotechnology and Bioengineering, **2008** Apr 15;99(6):1416-1424]
- [Dzyuba S.V. & Bartsch R.A., *Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO<sub>2</sub> systems*; Angewandte Chemie (International Edition in English), **2003**; 42(2):148-150]
- [Eckstein M., Villela Filho M., Liese A., Kragl U., *Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction*; Chemical Communication (Camb). **2004** May 7;(9):1084-1085]
- [Enoki S., Saeki K., Maki K., Kuwajima K., *Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein*; Biochemistry, **2004** Nov 9;43(44):14238-14248.]
- [Erbeldinger M., Mesiano A.J., Russell A.J., *Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents*; Biotechnology Progress, **2000** Nov-Dec;16(6):1129-1131]
- [Esser D., *Etablierung proteinbasierter Transfersysteme*; Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2000**]
- [Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F., *Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane*; Biochemistry, **1971** Jun 22;10(13):2606-2617]
- [Falcioni F., Housden H.R., Ling Z., Shimizu S., Walker A.J., Bruce N.C., *Soluble, folded and active subtilisin in a protic ionic liquid*; Chemical Communication (Camb), **2010** Feb 7;46(5):749-751]

- [Fehér E., Illeová V., Kelemen-Horváth I., Bélafi-Bakó K., Polakovič M. and Gubicza L., *Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid–alcohol biphasic system*; Journal of Molecular Catalysis B, **2008** Jan 2; Enzymatic 50(1):28-32]
- [Figueiredo A.M., Sardinha J., Moore G.R., Cabrita E.J., *Protein destabilisation in ionic liquids: the role of preferential interactions in denaturation*; Physical Chemistry Chemical Physics (PCCP), **2013** Dec 7;15(45):19632-19643]
- [Fischer G., *Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerases and Their Effectors*; Angewandte Chemie International Edition in English, **1994** Aug 2;33(14):1415-1436]
- [Fischer G. & Schmid F.X., *The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell*; Biochemistry, **1990** Mar 6;29(9):2205-2212]
- [Freedman R.B., Brockway B.E., Lambert N., *Protein disulphide-isomerase and the formation of native disulphide bonds*; Biochemical Society Transactions, **1984** Dec;12(6):929-932]
- [Freemantle M., *BASF'S smart ionic liquids*; Chemical & Engineering News, **2003** Mar 31;81(13):9]
- [Fukuda H., Arai M., Kuwajima K., *Folding of green fluorescent protein and the cycle3 mutant*; Biochemistry, **2000** Oct 3;39(39):12025-12032]
- [Garlitz J.A., Summers C.A., Flowers R.A. 2nd, Borgstahl G.E., *Ethylammonium nitrate: a protein crystallization reagent*; Acta Crystallographica, Section D, Biological Crystallography, **1999** Dec;55(Pt 12):2037-2038]
- [Gill S.C. & von Hippel P.H., *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*; Analytical Biochemistry, **1989** Nov 1;182(2):319-326]
- [Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruysschaert J.M., *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange*; Subcell Biochem, **1994**;23:363-403]
- [Gurskaya N.G., Fradkov A.F., Pounkova N.I., Staroverov D.B., Bulina M.E., Yanushevich Y.G., Labas Y.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A., *A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa Aequorea coerulescens and its fluorescent mutants*; The Biochemical Journal, **2003** Jul 15;373(Pt 2):403-408]
- [Hamada H., Arakawa T., Shiraki K., *Effect of additives on protein aggregation*; Current Pharmaceutical Biotechnology, **2009** Jun;10(4):400-407]
- [Hastings J.W. & Morin J.G., *Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the ctenophore, Mnemiopsis, and the coelenterates Aequorea, Obelia, Pelagia and Renilla*; Abstracts of Papers Presented at the Marine Biological Laboratory **1969**]
- [Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y., *Improved green fluorescence*; Nature, **1995** Feb 23;373(6516):663-664]
- [Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y., *Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1994** Dec 20;91(26):12501-12504]
- [Heller W.T., O'Neill H.M., Zhang Q., Baker G.A., *Characterization of the influence of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride on the structure and thermal stability of green fluorescent protein*; The Journal of Physical Chemistry B, **2010** Nov 4;114(43):13866-13871]

- [Herberhold H., Marchal S., Lange R., Scheyhing C.H., Vogel R.F. and Winter R., *Characterization of the Pressure-induced Intermediate and Unfolded State of Red-shifted Green Fluorescent Protein – A Static and Kinetic FTIR, UV/VIS and Fluorescence Spectroscopy Study*; Journal of Molecular Biology, **2003** Jun 25;330 (5):1153–1164]
- [Hofmeister F., *Zur Lehre von der Wirkung der Salze*; Arbeiten aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität zu Prag, Zweite Mittheilung, **1888**]
- [Huang J., Craggs T.D., Christodoulou J. and Jackson S.E., *Stable Intermediate States and High Energy Barriers in the Unfolding of GFP*; Journal of Molecular Biology, **2007**;370: 356–371]
- [Ishibashi M., Tsumoto K., Tokunaga M., Ejima D., Kita Y., Arakawa T., *Is arginine a protein-denaturant?*; Protein Expression and Purification, **2005** Jul;42(1):1-6]
- [Itoh T., Han S., Matsushita Y. and Hayase S., *Enhanced enantioselectivity and remarkable acceleration on the lipase-catalyzed transesterification using novel ionic liquids*; Green Chemistry, **2004**;6:437-439]
- [Jackson M., Haris P.I. and Chapman D., *Conformational transitions in poly (L-lysine): studies using Fourier transform infrared spectroscopy*; Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, **1989** Sep 14;998(1):75-79]
- [Jackson S.E., Craggs T.D. and Huang J.R., *Understanding the folding of GFP using biophysical techniques*; Expert Review of Proteomics, **2006** Oct;3(5):545-559]
- [Jiang Y., Guo C., Xia H., Mahmood I., Liu C. and Liu H., *Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2009** Jun;58(1-4):103-109]
- [Jones G. & Dole M., *The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride*; Journal of the American Chemical Society, **1929**;51(10): 2950–2964]
- [Judge R.A., Takahashi S., Longenecker K.L., Fry E.H, Abad-Zapatero C. and Chiu M.L., *The Effect of Ionic Liquids on Protein Crystallization and X-ray Diffraction Resolution*; Crystal Growth & Design, **2009**;9(8):3463-3469]
- [Kaftzik N., Wasserscheid P. and Kragl U., *Use of Ionic Liquids to Increase the Yield and Enzyme Stability in the  $\beta$ -Galactosidase Catalysed Synthesis of N-Acetyllactosamine*; Organic Process Research & Development, **2002**;6(4):553–557]
- [Khan F., Stott K., Jackson S.,  *$^1H$ ,  $^{15}N$  and  $^{13}C$  backbone assignment of the green fluorescent protein (GFP)*; Journal of Biomolecular NMR, **2003** Jul;26(3):281-282]
- [Kim K.W., Song B., Choi M.Y., Kim M.J., *Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase*; Organic Letters, **2001** May 17;3(10):1507-1509]
- [Kragl U., Eckstein M., Kaftzik N., *Enzyme catalysis in ionic liquids*; Current Opinion in Biotechnology, **2002** Dec;13(6):565-71. Review.]
- [Laemmli U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*; Nature, **1970**;227:680-685]
- [Lange C., Patil G., Rudolph R., *Ionic liquids as refolding additives: N'-alkyl and N'-(omega-hydroxyalkyl) N-methylimidazolium chlorides*; Protein Science, **2005** Oct;14(10):2693-2701]

- [Laszlo J.A. & Compton D.L., *Alpha-chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids*; Biotechnology and Bioengineering, **2001** Oct 20;75(2):181-186]
- [Laszlo J.A. & Compton D.L., *Comparison of peroxidase activities of hemin, cytochrome c and microperoxidase-11 in molecular solvents and imidazolium-based ionic liquids*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2002**;18:109-120]
- [Levinthal C., *Are there pathways for protein folding?*; Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique, **1968**;65:44-45]
- [Lilie H., Raue U. & Rudolph R. (2003), *Verfahren zur Renaturierung von Proteinen*; Deut. Patentanmeldung 10161577.9]
- [Lilie H., Schwarz E., Rudolph R., *Advances in refolding of proteins produced in E. coli.*; Current Opinion in Biotechnology, **1998** Oct;9(5):497-501]
- [Lim W.K., Smith-Somerville H.E., Hardman J.K., *Solubilization and renaturation of overexpressed aggregates of mutant tryptophan synthase alpha-subunits*; Applied and Environmental Microbiology, **1989** May;55(5):1106-1111]
- [Louros C.L., Cláudio A.F., Neves C.M., Freire M.G., Marrucho I.M., Pauly J., Coutinho J.A., *Extraction of biomolecules using phosphonium-based ionic liquids + K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aqueous biphasic systems*; International Journal of Molecular Sciences, **2010** Apr 15;11(4):1777-1791]
- [Lozano P., de Diego T., Guegan J.P., Vaultier M., Iborra J.L., *Stabilization of alpha-chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions*; Biotechnology and bioengineering, **2001**;75(5):563-569]
- [Magnuson D.K., Bodley J.W. and Evans D.F., *The activity and stability of alkaline phosphatase in solutions of water and the fused salt ethylammonium nitrate*; Journal of Solution Chemistry, Volume 13, Number 8, **1984**; 583-587]
- [McDavit W.F. & Long F.A., *The Activity Coefficient of Benzene in Aqueous Salt Solutions*; Journal of the American Chemical Society, **1952**;74(7):1773-1777]
- [Moniruzzaman M., Kamiya N., Goto M., *Activation and stabilization of enzymes in ionic liquids*; Organic & Biomolecular Chemistry, **2010** Jun 28;8(13):2887-2899, Review]
- [Morin J.G. & Hastings J.W., *Energy transfer in a bioluminescent system*; Journal of Cellular and Comparative Physiology (Journal of Cellular Physiology), **1971** Jun;77(3):313-318]
- [Morise H., Shimomura O., Johnson F.H., Winant J., *Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea*; Biochemistry, **1974** Jun 4;13(12):2656-2662]
- [Oberg K.A. and Fink A.L., *A new attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy method for the study of proteins in solution*; Analytical Biochemistry, **1998** Feb 1;256(1):92-106.]
- [Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*; Science, **1996** Sep 6;273(5280):1392-1395]
- [Park S. & Kazlauskas R.J., *Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations*; The Journal of Organic Chemistry, **2001** Dec 14;66(25):8395-8401]
- [Patterson G., Day R.N., Piston D., *Fluorescent protein spectra*; Journal of Cell Science **2001** Mar;114(5):837-838]

- [Pei Y.C., Li Z.Y., Liu L., Wang J.J. and Wang H.Y., *Selective separation of protein and saccharides by ionic liquids aqueous two-phase systems*; Science China Chemistry, **2010** May 31, 53(7):1554-1560]
- [Persson M. & Bornscheuer U.T., *Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2003** Apr 1;22(1-2):21-27]
- [Phillips G.N. Jr., *Structure and dynamics of green fluorescent protein*; Current Opinion in Structural Biology, **1997** Dec;7(6):821-827]
- [Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J., *Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein*; Gene, **1992** Feb 15;111(2):229-233]
- [Pultke H., *Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Faltung und Aggregation des Grün Fluoreszierenden Proteins*; Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2003**]
- [Pusey M.L., Paley M.S., Turner M.B. and Rogers R.D., *Protein Crystallization Using Room Temperature Ionic Liquids*; Crystal Growth & Design, **2007**;7(4):787-793]
- [Reddy K R.C., Lilie H., Rudolph R., Lange C., *L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme*; Protein Science, **2005** Apr;14(4):929-935]
- [Rehm H., *Der Experimentator: Proteinchemie*; 2. Auflage, **1997**, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart]
- [Reid B.G. & Flynn G.C., *Chromophore formation in green fluorescent protein*; Biochemistry, **1997** Jun 3;36(22):6786-6791]
- [Roosen C., Müller P., Greiner L., *Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations*; Applied Microbiology and Biotechnology, **2008** Dec;81(4):607-614]
- [Rudolph R. & Fischer S. (1990), *Process for Obtaining Renatured Proteins*; United States Patent 4933434 A]
- [Rudolph R., Böhm G., Lilie H. & Jaenicke R. (1997) *Protein Function: A Practical Approach* (Creighton, T. E., ed.), Oxford University Press, p. 57-99 Folding Proteins]
- [Rudolph R., Lilie H., *In vitro folding of inclusion body proteins*; The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, **1996** Jan;10(1):49-56]
- [Saxena V.P. & Wetlaufer D.B., *Formation of three-dimensional structure in proteins. I. Rapid nonenzymic reactivation of reduced lysozyme*; Biochemistry, **1970** Dec 8;9(25):5015-5023]
- [Scheyhing C.H., Meersman F., Ehrmann M.A., Heremans K., Vogel R.F., *Temperature-Pressure Stability of Green Fluorescent Protein: A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study*; Biopolymers, **2002** Nov 15;65(4):244-253]
- [Seddon K.R., *Ionic liquids: A taste of the future*; Nature Materials, **2003** Jun;2(6):363-365]
- [Shimomura O., Johnson F.H. and Saiga Y., *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea**; Journal of Cellular and Comparative Physiology (Journal of Cellular Physiology), **1962** Jun;59:223-239]

- [**Shimomura O.**, *Structure of the Chromophore of the Aequorea Green Fluorescent Protein*; FEBS Letters, **1979** Aug;104:2]
- [**Speare J.O. and Rush III T.S.**, *IR spectra of cytochrome c denatured with deuterated guanidine hydrochloride show increase in beta sheet*; Biopolymers, **2003**;72(3):193-204]
- [**Stepanenko O.V.**, Verkhusha V.V., Kazakov V.I., Shavlovsky M.M., Kuznetsova I.M., Uversky V.N., Turoverov K.K., *Comparative studies on the structure and stability of fluorescent proteins EGFP, zFP506, mRFP1, "dimer2", and DsRed1*; Biochemistry, **2004** Nov 30;43(47):14913-14923]
- [**Sudgen S. & Wilkins H.**, *The Parachor and Chemical Constitution. Part XII. Fused Metals and Salts*; Journal of the Chemical Society, **1929**;1291-1298]
- [**Summers C.A. & Flowers R.A. 2nd**, *Protein renaturation by the liquid organic salt ethylammonium nitrate*; Protein Science, **2000** Oct;9(10):2001-2008]
- [**Timasheff S.N.**, *Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration*; Biochemistry, **2002** Nov 19;41(46):13473-13482]
- [**Tischer A.**, *Effekte von Arginin und von ionischen Flüssigkeiten auf Proteine*; Dissertation, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2011**]
- [**Tischer A.**, Pultke H., Topf., Auton M., Lange C., Lilie H., *The Effects of N-ethyl-N'-methyl imidazolium chloride on the solubility, stability, and aggregation of tc-rPA*; FEBS Journal, **2014** Apr;281(14):1738-1749]
- [**Tsien R.Y.**, *The green fluorescent protein*; Annual Review of Biochemistry, **1998**;67:509-544]
- [**Visser N.V.**, Hink M.A., Borst J.W., van der Krogt G.N., Visser A.J., *Circular dichroism spectroscopy of fluorescent proteins*; FEBS Letters, **2002** Jun 19;521(1-3):31-35]
- [**Voityuk A.A.**, Michel-Beyerle M.E., Rösch N., *Quantum chemical modeling of structure and absorption spectra of the chromophore in green fluorescent proteins*; Chemical Physics, **1998** May 15;231(1):13-25]
- [**Wahlund K.G.**, Winegarner H.S., Caldwell K.D., Giddings J.C., *Improved flow field-flow fractionation system applied to water-soluble polymers: programming, outlet stream splitting, and flow optimization*; Analytical Chemistry, **1986** Mar;58(3):573-578]
- [**Walden P.**, *Ueber die Molekulargrösse und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzenen Salze*; Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St.-Pétersbourg, **1914**, 405-422]
- [**Wang J.H.**, Cheng D.H., Chen X.W., Du Z., Fang Z.L., *Direct extraction of double-stranded DNA into ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and its quantification*; Analytical Chemistry, **2007** Jan 15;79(2):620-625]
- [**Wang Z.**, Dang L., Han Y., Jiang P., Wei H., *Crystallization control of thermal stability and morphology of hen egg white lysozyme crystals by ionic liquids*; Journal of Agriculture and Food Chemistry, **2010** May 12;58(9):5444-5448]
- [**Ward W.W. & Bokman S.H.**, *Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein*; Biochemistry, **1982** Sep 14;21(19):4535-4540]

- [Ward W.W., Prentice H.J., Roth A.F., Cody C.W., Reeves S.C., *Spectral perturbations of the Aequorea green fluorescent protein*; Photochemistry and Photobiology, **1982** June;35(6):803–808]
- [Wasserscheid P. & Keim W., *Ionic Liquids-New "Solutions" for Transition Metal Catalysis*; Angewandte Chemie (International Edition in English), **2000**;39(21):3772-3789]
- [Wehofsky N., Wespe C., Cerovsky V., Pech A., Hoess E., Rudolph R., Bordusa F., *Ionic liquids and proteases: a clean alliance for semisynthesis*; Chembiochem, **2008** Jun 16;9(9):1493-1499]
- [Wetlaufer D.B., Branca P.A., Chen G.X., *The oxidative folding of proteins by disulfide plus thiol does not correlate with redox potential*; Protein Engineering, **1987** Feb-Mar;1(2):141-146]
- [Wilkes J.S. & Zaworotko M.J., *Air and Water Stable 1-Ethyl-3-methylimidazolium Based Ionic Liquids*; J. Chem. Soc., Chem. Commun., **1992**;965-967]
- [Wunderlich M., Glockshuber R., *In vivo control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA)*, The journal of biological chemistry, **1993** Nov 25;268(33):24547-24550]
- [Yang F., Moss L.G., Phillips G.N. Jr., *The molecular structure of green fluorescent protein*; Nature Biotechnology, **1996** Oct;14(10):1246-1251]
- [Yang Z., *Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis*; Journal of Biotechnology, **2009** Oct 12;144(1):12-22]
- [Zapata-Hommer O. & Griesbeck O., *Efficiently folding and circularly permuted variants of the Sapphire mutant of GFP*; BMC Biotechnology, **2003** May 22;3:5]
- [Zhao H., *Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids*; Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **2006**;81:877-891]
- [Zhao H., Olubajo O., Song Z., Sims A.L., Person T.E., Lawal R.A., Holley L.A., *Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions*; Bioorganic Chemistry, **2006**;34:15-25]



## 7. Anhang

### 7.1. Kinetische Parameter der Denaturierung und Renaturierung von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl

**Tabelle 7.1:** Kinetische Parameter der chemisch induzierten Denaturierung von EGFP durch GuHCl. Die Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{n \rightarrow d}$ ) der Entfaltung wurden durch Änderung der Intensität mittels Absorption bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (490 nm und 385 nm) ermittelt. Die Kurvenanpassung erfolgte durch eine einfach exponentielle Gleichung 1. Ordnung. Die graphische Darstellung der Parameter erfolgte in **Abbildung 3.20**.

Denaturans	Konzentration (M)	$k_{n \rightarrow d}$ (s <sup>-1</sup> ) 490 nm	$k_{n \rightarrow d}$ (s <sup>-1</sup> ) 385 nm
GuHCl	6,00	$6,956 \pm 0,085 \times 10^{-3}$	$6,936 \pm 0,277 \times 10^{-3}$
	5,90	$4,637 \pm 0,054 \times 10^{-3}$	$4,764 \pm 0,200 \times 10^{-3}$
	5,80	$3,674 \pm 0,041 \times 10^{-3}$	$3,597 \pm 0,124 \times 10^{-3}$
	5,70	$2,512 \pm 0,026 \times 10^{-3}$	$2,579 \pm 0,049 \times 10^{-3}$
	5,60	$1,558 \pm 0,013 \times 10^{-3}$	$1,657 \pm 0,021 \times 10^{-3}$
	5,50	$1,131 \pm 0,006 \times 10^{-3}$	$1,212 \pm 0,012 \times 10^{-3}$
	5,40	$8,815 \pm 0,103 \times 10^{-4}$	$9,108 \pm 0,085 \times 10^{-4}$
	5,30	$6,764 \pm 0,055 \times 10^{-4}$	$7,263 \pm 0,069 \times 10^{-4}$
	5,20	$4,429 \pm 0,021 \times 10^{-4}$	$4,851 \pm 0,045 \times 10^{-4}$
	5,10	$3,259 \pm 0,014 \times 10^{-4}$	$3,743 \pm 0,025 \times 10^{-4}$
	5,00	$2,666 \pm 0,009 \times 10^{-4}$	$2,928 \pm 0,011 \times 10^{-4}$
	4,90	$2,036 \pm 0,006 \times 10^{-4}$	$2,310 \pm 0,009 \times 10^{-4}$
	4,80	$1,775 \pm 0,005 \times 10^{-4}$	$1,974 \pm 0,010 \times 10^{-4}$
	4,70	$1,342 \pm 0,003 \times 10^{-4}$	$1,486 \pm 0,010 \times 10^{-4}$
	4,60	$1,009 \pm 0,006 \times 10^{-4}$	$1,081 \pm 0,019 \times 10^{-4}$
	4,50	$8,612 \pm 0,109 \times 10^{-5}$	$7,002 \pm 0,072 \times 10^{-5}$

**Tabelle 7.2:** Kinetische Parameter der Renaturierung nach chemisch induzierter Denaturierung von EGFP durch GuHCl.

Die Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{d \rightarrow n}$ ) der Rückfaltung wurden durch Änderung der Intensität der Fluoreszenz bei 510 nm ermittelt. Die Kurvenanpassung erfolgte je nach Anzahl der detektierbaren Phasen durch eine einfach, zweifach oder dreifach exponentielle Gleichung 1. Ordnung. Die Kinetiken werden durch die Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$ ,  $k_2$  und  $k_3$  bzw. durch die Amplituden  $amp_1$ ,  $amp_2$  und  $amp_3$  der schnellen, mittleren und langsamen Phase repräsentiert. Bei den hier aufgelisteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  bis  $k_3$  handelt es sich um apparente Geschwindigkeitskonstanten. Die graphische Darstellung der Parameter erfolgte in **Abbildung 3.21**.

GuHCl (M)	$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	$k_3$ (s <sup>-1</sup> )
0,10	$2,047 \pm 0,012 \times 10^{-1}$	$3,921 \pm 0,020 \times 10^{-2}$	$5,567 \pm 0,046 \times 10^{-3}$
0,10	$2,071 \pm 0,012 \times 10^{-1}$	$3,986 \pm 0,024 \times 10^{-2}$	$6,587 \pm 0,066 \times 10^{-3}$
0,25	$1,790 \pm 0,009 \times 10^{-1}$	$3,710 \pm 0,020 \times 10^{-2}$	$4,436 \pm 0,039 \times 10^{-3}$
0,50	$7,608 \pm 0,058 \times 10^{-2}$	$2,521 \pm 0,013 \times 10^{-2}$	$3,147 \pm 0,017 \times 10^{-3}$
0,50	$7,514 \pm 0,076 \times 10^{-2}$	$2,274 \pm 0,016 \times 10^{-2}$	$2,443 \pm 0,021 \times 10^{-3}$
0,75	$1,699 \pm 0,018 \times 10^{-2}$	$5,817 \pm 0,038 \times 10^{-3}$	$1,324 \pm 0,038 \times 10^{-3}$
1,00#		$2,507 \pm 0,038 \times 10^{-3}$	$9,330 \pm 0,061 \times 10^{-4}$
1,25*			$5,077 \pm 0,004 \times 10^{-5}$
GuHCl (M)	$amp_1$ (%)	$amp_2$ (%)	$amp_3$ (%)
0,10	50,9	43,0	6,0
0,10	52,6	41,5	5,9
0,25	56,7	38,5	4,9
0,50	47,3	46,6	6,1
0,50	42,2	50,3	7,5
0,75	22,1	68,2	9,7
1,00#		15,8	84,2
1,25*			100

# zweiphasiger Kurvenverlauf

\* einphasiger Kurvenverlauf

**Tabelle 7.3:** Kinetische Parameter der chemisch induzierten Denaturierung von EGFP durch unterschiedliche Denaturanzien.

Die Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{n \rightarrow d}$ ) der Entfaltung wurden durch fluoreszenzspektroskopische Messungen bei 510 nm beziehungsweise durch Zirkulardichroismus im Nah-UV-Bereich bei 278 nm ermittelt. Die Kurvenanpassung erfolgte durch eine einfach exponentielle Gleichung 1. Ordnung. Die graphische Darstellung der Parameter erfolgte in **Abbildung 3.20** und **Abbildung 3.25**.

Denaturans	Konzentration (M)	$k_{n \rightarrow d}$ (s <sup>-1</sup> ) #	$k_{n \rightarrow d}$ (s <sup>-1</sup> ) *
GuHCl	5,50		$8,378 \pm 0,095 \times 10^{-4}$
	5,40		$6,548 \pm 0,054 \times 10^{-4}$
	5,30		$4,738 \pm 0,029 \times 10^{-4}$
	5,20	$2,827 \pm 0,009 \times 10^{-4}$	$3,577 \pm 0,021 \times 10^{-4}$
	5,10		$2,981 \pm 0,013 \times 10^{-4}$
	5,00		$1,965 \pm 0,008 \times 10^{-4}$
	4,80	$9,707 \pm 0,218 \times 10^{-5}$	
	4,40	$3,101 \pm 0,197 \times 10^{-5}$	
	4,00	$1,102 \pm 0,0335 \times 10^{-5}$	
	3,80	$6,921 \pm 0,735 \times 10^{-6}$	
	3,60	$4,015 \pm 0,530 \times 10^{-6}$	
	3,40	$2,134 \pm 0,341 \times 10^{-6}$	
	3,20	$1,263 \pm 0,226 \times 10^{-6}$	
	3,00	$9,404 \pm 1,177 \times 10^{-7}$	
	2,90	$7,623 \pm 1,226 \times 10^{-7}$	
	2,80	$6,450 \pm 1,086 \times 10^{-7}$	
2,70	$4,517 \pm 1,027 \times 10^{-7}$		
2,60	$3,827 \pm 1,016 \times 10^{-7}$		
EMIM Cl	5,60	$3,790 \pm 0,002 \times 10^{-2}$	
	5,50	$4,511 \pm 0,063 \times 10^{-3}$	
	5,40	$2,027 \pm 0,0006 \times 10^{-3}$	n.a.
	5,20	$1,155 \pm 0,001 \times 10^{-4}$	n.a.
	5,00	$9,061 \pm 0,783 \times 10^{-6}$	n.a.
	4,80	$1,278 \pm 0,084 \times 10^{-6}$	
BMIM Cl	4,00	$1,501 \pm 0,001 \times 10^{-3}$	$1,671 \pm 0,026 \times 10^{-3}$
	3,80	$2,167 \pm 0,0002 \times 10^{-4}$	$2,250 \pm 0,014 \times 10^{-4}$
	3,60	$3,542 \pm 0,002 \times 10^{-5}$	$4,313 \pm 0,020 \times 10^{-5}$
	3,40	$6,375 \pm 0,069 \times 10^{-6}$	$6,870 \pm 0,063 \times 10^{-6}$
HMIM Cl	3,50	$1,101 \pm 0,001 \times 10^{-2}$	
	3,25	$2,246 \pm 0,002 \times 10^{-3}$	
	3,00	$7,997 \pm 0,003 \times 10^{-4}$	$6,636 \pm 0,130 \times 10^{-4}$
	2,75	$2,850 \pm 0,002 \times 10^{-4}$	
	2,50	$6,462 \pm 0,001 \times 10^{-5}$	

# Fluoreszenzmessungen

\* Elliptizitätsmessung im Nah-UV-Bereich

n.a. = nicht auswertbar

**Tabelle 7.4:** Parameter der linearen Regressionsgeraden der Entfaltungskinetik des EGFP in Gegenwart von GuHCl und Ionischer Flüssigkeiten.

Die Anstiege und die Schnittpunkte mit der y-Achse wurden aus einer halblogarithmischen Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten gegen die Denaturationskonzentration (siehe **Abbildung 3.25**) durch lineare Regression ermittelt.

Denaturans	Anstieg der Regressionsgerade	Schnittpunkt mit y-Achse
GuHCl	$m_{(490 \text{ nm})} = 1,28 \pm 0,03$	$\log_{10} = -9,94 \pm 0,18$
	$m_{(385 \text{ nm})} = 1,28 \pm 0,03$	$\log_{10} = -9,90 \pm 0,15$
	$m_{(510 \text{ nm})} = 1,18 \pm 0,02$	$\log_{10} = -9,66 \pm 0,09$
	$m_{(278 \text{ nm})} = 1,23 \pm 0,05$	$\log_{10} = -9,82 \pm 0,28$
EMIM Cl	$m_{(510 \text{ nm})} = 5,52 \pm 0,25$	$\log_{10} = -32,52 \pm 1,30$
BMIM Cl	$m_{(510 \text{ nm})} = 3,91 \pm 0,10$	$\log_{10} = -18,48 \pm 0,37$
	$m_{(278 \text{ nm})} = 3,93 \pm 0,10$	$\log_{10} = -18,56 \pm 0,38$
HMIM Cl	$m_{(510 \text{ nm})} = 2,14 \pm 0,10$	$\log_{10} = -9,51 \pm 0,29$

**Tabelle 7.5:** Kinetische Parameter der Renaturierung von EGFP in Abhängigkeit der HMIM Cl-Konzentration im Renaturierungspuffer und der Denaturierungsdauer in 3 M HMIM Cl.

Die Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden wurden durch fluoreszenzspektroskopische Messungen und dreifach exponentieller Kurvenanpassung ermittelt. Die kinetischen Parameter in **A** und **B** wurden nach einer Denaturierungszeit von 4 h erhoben. Bei den hier aufgelisteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  bis  $k_3$  handelt es sich um apparente Geschwindigkeitskonstanten. Die graphische Darstellung der Parameter erfolgte in **Abbildung 3.30**.

Konzentration (M)		$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	$k_3$ (s <sup>-1</sup> )
<b>A</b>	0,05	$1,06 \pm 0,02 \times 10^{-1}$	$2,70 \pm 0,05 \times 10^{-2}$	$1,80 \pm 0,01 \times 10^{-3}$
	0,10	$7,40 \pm 0,07 \times 10^{-2}$	$1,44 \pm 0,02 \times 10^{-2}$	$1,17 \pm 0,01 \times 10^{-3}$
	0,25	$2,67 \pm 0,01 \times 10^{-2}$	$1,64 \pm 0,01 \times 10^{-3}$	$3,25 \pm 0,03 \times 10^{-4}$
	0,50	$3,10 \pm 0,03 \times 10^{-3}$	$9,76 \pm 0,10 \times 10^{-4}$	$8,09 \pm 0,28 \times 10^{-5}$
Konzentration (M)		$amp_1$ (%)	$amp_2$ (%)	$amp_3$ (%)
<b>B</b>	0,05	65,7	24,7	9,5
	0,10	70,9	15,6	13,5
	0,25	76,2	14,5	9,3
	0,50	51,9	40,2	7,9
Zeit (h)		$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	$k_3$ (s <sup>-1</sup> )
<b>C</b>	4	$7,40 \pm 0,07 \times 10^{-2}$	$1,44 \pm 0,02 \times 10^{-2}$	$1,17 \pm 0,006 \times 10^{-3}$
	26	$5,36 \pm 0,10 \times 10^{-2}$	$7,41 \pm 0,14 \times 10^{-3}$	$6,63 \pm 0,006 \times 10^{-4}$
	29	$3,74 \pm 0,03 \times 10^{-2}$	$2,21 \pm 0,02 \times 10^{-3}$	$3,97 \pm 0,006 \times 10^{-4}$
	48	$2,71 \pm 0,04 \times 10^{-2}$	$1,57 \pm 0,01 \times 10^{-3}$	$3,23 \pm 0,005 \times 10^{-4}$
	52	$1,94 \pm 0,02 \times 10^{-2}$	$1,04 \pm 0,005 \times 10^{-3}$	$2,68 \pm 0,003 \times 10^{-4}$
	56	$1,64 \pm 0,03 \times 10^{-2}$	$9,92 \pm 0,06 \times 10^{-4}$	$2,67 \pm 0,005 \times 10^{-4}$
Zeit (h)		$amp_1$ (%)	$amp_2$ (%)	$amp_3$ (%)
<b>D</b>	4	70,9	15,6	13,5
	26	31,9	11,7	56,4
	29	25,8	15,8	58,3
	48	12,6	15,2	72,3
	52	10,9	21,3	67,8
	56	8,5	22,6	68,9

**Tabelle 7.6:** Kinetische Parameter der Renaturierung des EGFP aus dem chemisch denaturierten Zustand in 3 M HMIM Cl.

Die Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden wurden durch fluoreszenzspektroskopische Messungen und dreifach exponentieller Kurvenanpassung ermittelt. Die Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung ( $k_{1\text{ n}\rightarrow\text{d}}$ ) wurde aus den  $y_{(0)}$ -Werten der Renaturierungskinetiken und einfach exponentieller Kurvenanpassung ermittelt.

Bei den hier aufgelisteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  bis  $k_3$  handelt es sich um apparente Geschwindigkeitskonstanten. Die graphische Darstellung der Parameter erfolgte in **Abbildung 3.32**.

Konzentration (M)	$k_{1\text{ n}\rightarrow\text{d}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )		
3,0	$5,56 \pm 0,002 \times 10^{-4}$		
Zeit	$k_1$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_3$ ( $\text{s}^{-1}$ )
5 min	$2,36 \pm 1,50 \times 10^{-1}$	$5,43 \pm 4,92 \times 10^{-2}$	$1,13 \pm 0,28 \times 10^{-2}$
45 min	$7,07 \pm 0,06 \times 10^{-2}$	$8,83 \pm 0,24 \times 10^{-3}$	$9,37 \pm 0,51 \times 10^{-4}$
92 min	$6,99 \pm 0,05 \times 10^{-2}$	$1,17 \pm 0,02 \times 10^{-2}$	$6,61 \pm 0,06 \times 10^{-4}$
360 min	$5,54 \pm 0,10 \times 10^{-2}$	$4,46 \pm 0,16 \times 10^{-3}$	$3,65 \pm 0,02 \times 10^{-4}$
Zeit	$amp_1$ (%)	$amp_2$ (%)	$amp_3$ (%)
5 min	78,9	12,9	8,0
45 min	83,7	11,3	4,9
92 min	79,0	12,1	8,8
360 min	66,4	10,1	23,5

**Tabelle 7.7:** Kinetische Parameter des Verlusts der Rückfaltungsausbeute in Gegenwart verschiedener Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl bei verschiedenen EGFP-Konzentrationen.

Die Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden wurden durch zweifach exponentielle Kurvenanpassung ermittelt. Der prozentuale Anteil beider resultierenden Amplituden bezieht sich jeweils auf die Gesamtamplitude. Die ermittelten Endwerte der Kurvenanpassung ( $y_{(0)}$ ) sind jeweils ins Verhältnis zur normierten Fluoreszenz gesetzt und spiegeln somit die Ausbeute der Rückfaltung in Prozent wider. Bei den hier aufgelisteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  handelt es sich um apparente Geschwindigkeitskonstanten. Die graphische Darstellung der Parameter erfolgte in **Abbildung 3.33** und **Abbildung 3.34**.

Denaturans	EGFP (mg/ml)	$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	
GuHCl (5,5 M)	0,1	$4,061 \pm 3,156 \times 10^{-3}$	$3,113 \pm 0,256 \times 10^{-6}$	
	0,5	$4,251 \pm 1,165 \times 10^{-4}$	$1,493 \pm 0,164 \times 10^{-6}$	
	2,5	$4,203 \pm 1,580 \times 10^{-4}$	$2,415 \pm 1,240 \times 10^{-6}$	
Denaturans	EGFP (mg/ml)	$y_{(0)}$ (%)	$amp_1$ (%)	$amp_2$ (%)
GuHCl (5,5 M)	0,1	9,8	10,3	89,7
	0,5	10,4	13,0	87,0
	2,5	8,2	47,7	52,3
Denaturans	EGFP (mg/ml)	$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	
EMIM Cl (5,4 M)	0,1	$6,449 \pm 0,040 \times 10^{-3}$	$7,268 \pm 0,345 \times 10^{-6}$	
	0,5	$1,116 \pm 0,389 \times 10^{-4}$	$1,754 \pm 0,522 \times 10^{-5}$	
	2,5	$9,228 \pm 1,620 \times 10^{-4}$	$1,119 \pm 1,423 \times 10^{-4}$	
Denaturans	EGFP (mg/ml)	$y_{(0)}$ (%)	$amp_1$ (%)	$amp_2$ (%)
EMIM Cl (5,4 M)	0,1	4,8	11,1	88,9
	0,5	0,8	45,9	54,1
	2,5	0,3	88,5	11,5
Denaturans	EGFP (mg/ml)	$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	
BMIM Cl (3,9 M)	0,1	$6,925 \pm 1,977 \times 10^{-4}$	$7,755 \pm 1,608 \times 10^{-7}$	
	0,5	$1,963 \pm 1,047 \times 10^{-3}$	$2,425 \pm 0,319 \times 10^{-6}$	
	2,5	$6,585 \pm 2,971 \times 10^{-4}$	$1,906 \pm 0,303 \times 10^{-6}$	
Denaturans	EGFP (mg/ml)	$y_{(0)}$ (%)	$amp_1$ (%)	$amp_2$ (%)
BMIM Cl (3,9 M)	0,1	-27,5	8,1	91,9
	0,5	19,5	17,3	82,7
	2,5	14,5	17,2	82,8
Denaturans	EGFP (mg/ml)	$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (s <sup>-1</sup> )	
HMIM Cl (3,0 M)	0,1	$1,113 \pm 0,262 \times 10^{-3}$	$4,911 \pm 0,662 \times 10^{-6}$	
	0,5	$6,915 \pm 2,933 \times 10^{-4}$	$1,477 \pm 0,274 \times 10^{-5}$	
	2,5	$3,707 \pm 0,758 \times 10^{-4}$	$5,596 \pm 1,137 \times 10^{-6}$	
Denaturans	EGFP (mg/ml)	$y_{(0)}$ (%)	$amp_1$ (%)	$amp_2$ (%)
HMIM Cl (3,0 M)	0,1	21,3	34,4	65,6
	0,5	35,5	33,2	66,8
	2,5	18,6	42,6	57,4

## 7.2. Kinetische Parameter der Intensitätsänderungen aus $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl

**Tabelle 7.8:** Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 4,4 M GuHCl.

Die kinetischen Parameter wurden durch einfach exponentielle Kurvenanpassung ermittelt. In Spalte 2 (AS) wurde wenn möglich, dem jeweiligen Signal die entsprechende Aminosäure zugeordnet. Bei den hier aufgelisteten Geschwindigkeitskonstanten handelt es sich um apparente Geschwindigkeitskonstanten. Die gemittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in **Tabelle 3.2** aufgelistet.

Signal	AS	$k_{1\ 0\rightarrow\text{U}}\ (\text{s}^{-1})$	$k_{2\ 0\rightarrow\text{U}}\ (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{N}\rightarrow\text{U}}\ (\text{s}^{-1})$
1				$3,58 \pm 1,07 \times 10^{-4}$
2				$3,21 \pm 1,14 \times 10^{-4}$
3				$1,46 \pm 0,54 \times 10^{-4}$
4				$1,20 \pm 0,35 \times 10^{-4}$
5				$1,64 \pm 0,48 \times 10^{-4}$
6				$1,48 \pm 0,26 \times 10^{-4}$
7				$5,51 \pm 3,43 \times 10^{-4}$
8				$2,12 \pm 0,21 \times 10^{-4}$
9				$2,28 \pm 0,33 \times 10^{-4}$
10				$2,09 \pm 0,41 \times 10^{-4}$
11				$1,66 \pm 0,34 \times 10^{-4}$
12				$1,65 \pm 0,23 \times 10^{-4}$
13				$1,66 \pm 0,25 \times 10^{-4}$
14				$2,22 \pm 0,59 \times 10^{-4}$
15				$2,06 \pm 0,44 \times 10^{-4}$
16				$1,56 \pm 0,37 \times 10^{-4}$
17				$3,03 \pm 0,80 \times 10^{-4}$
18				$2,80 \pm 0,80 \times 10^{-4}$
19				$1,75 \pm 0,37 \times 10^{-4}$
20				$2,36 \pm 0,64 \times 10^{-4}$
21				$2,11 \pm 0,53 \times 10^{-4}$
22				$3,98 \pm 1,25 \times 10^{-4}$
23				$1,72 \pm 0,40 \times 10^{-4}$
24				$2,64 \pm 0,90 \times 10^{-4}$
25				$2,18 \pm 0,54 \times 10^{-4}$
26				$2,46 \pm 0,27 \times 10^{-4}$
27				$4,30 \pm 2,78 \times 10^{-4}$
28				$2,10 \pm 0,33 \times 10^{-4}$
29	D82			$2,11 \pm 0,46 \times 10^{-4}$
30				$2,09 \pm 0,38 \times 10^{-4}$
31				$1,63 \pm 0,30 \times 10^{-4}$
32				$1,85 \pm 0,65 \times 10^{-4}$
33				$3,05 \pm 0,97 \times 10^{-4}$

**Tabelle 7.8:** Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 4,4 M GuHCl (Fortsetzung).

Signal	AS	$k_{1\text{O}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$	$k_{2\text{O}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{N}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$
34				$1,12 \pm 0,30 \times 10^{-4}$
35				$2,25 \pm 0,58 \times 10^{-4}$
36				$2,66 \pm 0,55 \times 10^{-4}$
37	N135			$2,20 \pm 0,50 \times 10^{-4}$
38	T108			$3,45 \pm 1,20 \times 10^{-4}$
<b>39</b>	<b>G51</b>			<b><math>8,15 \pm 5,12 \times 10^{-4}</math></b>
40				$1,47 \pm 0,23 \times 10^{-4}$
41				$1,82 \pm 0,37 \times 10^{-4}$
42				$1,73 \pm 0,31 \times 10^{-4}$
43	G134			$1,56 \pm 0,27 \times 10^{-4}$
44	G138			$1,77 \pm 0,50 \times 10^{-4}$
45				$2,20 \pm 0,47 \times 10^{-4}$
46				$1,62 \pm 0,27 \times 10^{-4}$
47				$3,04 \pm 0,81 \times 10^{-4}$
48		$1,32 \pm 0,27 \times 10^{-4}$	$9,94 \pm 3,62 \times 10^{-7}$	
<b>49</b>		<b><math>1,66 \pm 0,06 \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>1,41 \pm 0,17 \times 10^{-6}</math></b>	
50		$1,65 \pm 0,11 \times 10^{-4}$	n.a.	
51		$1,95 \pm 0,14 \times 10^{-4}$	$1,22 \pm 0,16 \times 10^{-6}$	
52		$1,95 \pm 0,23 \times 10^{-4}$	$3,04 \pm 1,80 \times 10^{-7}$	
53		$2,89 \pm 0,49 \times 10^{-4}$	$2,05 \pm 0,48 \times 10^{-6}$	
54		$1,35 \pm 0,11 \times 10^{-4}$	$1,74 \pm 0,34 \times 10^{-6}$	
55		$1,27 \pm 0,06 \times 10^{-4}$	n.a.	
56		$1,23 \pm 0,06 \times 10^{-4}$	n.a.	
57		$1,53 \pm 0,05 \times 10^{-4}$	n.a.	
58		$1,41 \pm 0,07 \times 10^{-4}$	n.a.	
59		$1,55 \pm 0,05 \times 10^{-4}$	n.a.	
60		$1,59 \pm 0,08 \times 10^{-4}$	$1,43 \pm 0,31 \times 10^{-6}$	
61		$1,40 \pm 0,32 \times 10^{-4}$	n.a.	
62		$1,45 \pm 0,06 \times 10^{-4}$	$1,65 \pm 0,51 \times 10^{-6}$	
63		$1,46 \pm 0,09 \times 10^{-4}$	$1,39 \pm 0,49 \times 10^{-6}$	
64		$1,57 \pm 0,13 \times 10^{-4}$	$1,27 \pm 0,93 \times 10^{-6}$	
65		$1,90 \pm 0,14 \times 10^{-4}$	$4,64 \pm 0,47 \times 10^{-6}$	
66		$1,77 \pm 0,06 \times 10^{-4}$	$4,46 \pm 0,79 \times 10^{-6}$	
67		$1,63 \pm 0,15 \times 10^{-4}$	$1,60 \pm 0,37 \times 10^{-6}$	
68		$1,78 \pm 0,17 \times 10^{-4}$	$1,85 \pm 0,45 \times 10^{-6}$	
69		$1,25 \pm 0,05 \times 10^{-4}$	n.a.	
70		$1,67 \pm 0,05 \times 10^{-4}$	$6,96 \pm 1,50 \times 10^{-7}$	
71		$1,44 \pm 0,05 \times 10^{-4}$	$8,57 \pm 3,35 \times 10^{-7}$	
72		$1,50 \pm 0,13 \times 10^{-4}$	$1,85 \pm 0,45 \times 10^{-6}$	
73		$1,94 \pm 0,29 \times 10^{-4}$	$6,35 \pm 0,83 \times 10^{-7}$	

n.a. = nicht auswertbar



**Tabelle 7.8:** Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 4,4 M GuHCl (Fortsetzung).

Signal	AS	$k_{1\text{O}\rightarrow\text{U}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{2\text{O}\rightarrow\text{U}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{N}\rightarrow\text{U}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
73		$1,94 \pm 0,29 \times 10^{-4}$	$6,35 \pm 0,83 \times 10^{-7}$	
74		$1,86 \pm 0,23 \times 10^{-4}$	$2,60 \pm 0,50 \times 10^{-6}$	
75		n.a.	$3,01 \pm 0,36 \times 10^{-6}$	
76		$1,67 \pm 0,32 \times 10^{-4}$	$1,02 \pm 0,64 \times 10^{-6}$	
77		$2,22 \pm 0,29 \times 10^{-4}$	$4,89 \pm 3,88 \times 10^{-7}$	
78		$1,30 \pm 0,25 \times 10^{-4}$	n.a.	
79		$1,74 \pm 0,40 \times 10^{-4}$	n.a.	
80		$1,44 \pm 0,16 \times 10^{-4}$	$2,55 \pm 1,42 \times 10^{-6}$	
81		$2,17 \pm 0,52 \times 10^{-4}$	n.a.	
82		$2,36 \pm 0,46 \times 10^{-4}$	$8,74 \pm 6,70 \times 10^{-7}$	
83		$2,32 \pm 0,61 \times 10^{-4}$	$8,21 \pm 2,69 \times 10^{-7}$	
		<u>Mittelwert</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Mittelwert</u>
		$1,69 \pm 0,37 \times 10^{-4}$	$1,66 \pm 1,10 \times 10^{-6}$	$2,39 \pm 1,21 \times 10^{-4}$

n.a. = nicht auswertbar

Die farblich markierten Signale entsprechen den in **Abbildung 3.39** verwendeten.

**Tabelle 7.9:** Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 2,5 M HMIM Cl.

Die kinetischen Parameter wurden durch einfach exponentielle Kurvenanpassung ermittelt. In Spalte 2 (AS) wurde wenn möglich dem jeweiligen Signal die entsprechende Aminosäure zugeordnet. Bei den hier aufgelisteten Geschwindigkeitskonstanten handelt es sich um apparente Geschwindigkeitskonstanten. Die gemittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in **Tabelle 3.2** aufgelistet.

Signal	AS	$k_{1\text{O}\rightarrow\text{U}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{2\text{O}\rightarrow\text{U}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{N}\rightarrow\text{U}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
1		$3,46 \pm 0,61 \times 10^{-5}$	$5,69 \pm 1,82 \times 10^{-6}$	
2*		n.a.	$7,88 \pm 0,52 \times 10^{-6}$	
3		$4,15 \pm 0,54 \times 10^{-5}$	$7,74 \pm 1,80 \times 10^{-6}$	
4		$3,27 \pm 0,29 \times 10^{-5}$	$5,16 \pm 0,89 \times 10^{-6}$	
5		$2,99 \pm 0,21 \times 10^{-5}$	$5,60 \pm 0,56 \times 10^{-6}$	
6		$2,70 \pm 0,19 \times 10^{-5}$	$5,37 \pm 0,77 \times 10^{-6}$	
7		$2,91 \pm 0,25 \times 10^{-5}$	$4,93 \pm 0,52 \times 10^{-6}$	
8		$3,38 \pm 0,44 \times 10^{-5}$	$2,28 \pm 1,54 \times 10^{-6}$	
9		$3,29 \pm 0,43 \times 10^{-5}$	$4,95 \pm 0,56 \times 10^{-6}$	
10		$3,80 \pm 0,31 \times 10^{-5}$	$7,08 \pm 0,78 \times 10^{-6}$	
11		$3,34 \pm 0,29 \times 10^{-5}$	$6,76 \pm 0,47 \times 10^{-6}$	
12		$3,19 \pm 0,25 \times 10^{-5}$	$6,43 \pm 0,55 \times 10^{-6}$	
13		$3,05 \pm 0,26 \times 10^{-5}$	$5,67 \pm 0,57 \times 10^{-6}$	
14		$3,02 \pm 0,24 \times 10^{-5}$	$5,41 \pm 0,52 \times 10^{-6}$	
15		$2,83 \pm 0,34 \times 10^{-5}$	$4,24 \pm 0,61 \times 10^{-6}$	
16		$3,20 \pm 0,29 \times 10^{-5}$	$5,32 \pm 0,63 \times 10^{-6}$	
17		$3,12 \pm 0,29 \times 10^{-5}$	$4,07 \pm 0,67 \times 10^{-6}$	
18		$3,26 \pm 0,28 \times 10^{-5}$	$5,52 \pm 0,72 \times 10^{-6}$	

n.a. = nicht auswertbar

\* Signale weisen bereits zu Beginn der Kinetik eine erhöhte Anfangsintensität auf

**Tabelle 7.9:** Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 2,5 M HMIM Cl (Fortsetzung).

Signal	AS	$k_{1\text{O}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$	$k_{2\text{O}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{N}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$
<b>19</b>		<b><math>3,55 \pm 0,22 \times 10^{-5}</math></b>	<b><math>5,91 \pm 0,41 \times 10^{-6}</math></b>	
20		$3,52 \pm 0,30 \times 10^{-5}$	$7,54 \pm 0,75 \times 10^{-6}$	
21		$3,91 \pm 0,38 \times 10^{-5}$	$8,18 \pm 1,75 \times 10^{-6}$	
22		$3,33 \pm 0,26 \times 10^{-5}$	$6,83 \pm 0,85 \times 10^{-6}$	
23		$3,46 \pm 0,37 \times 10^{-5}$	$6,44 \pm 1,00 \times 10^{-6}$	
24		$4,09 \pm 0,59 \times 10^{-5}$	$4,34 \pm 1,19 \times 10^{-6}$	
25		$3,33 \pm 0,43 \times 10^{-5}$	$5,60 \pm 1,13 \times 10^{-6}$	
26		$2,61 \pm 0,14 \times 10^{-5}$	$5,02 \pm 0,39 \times 10^{-6}$	
27		$2,83 \pm 0,13 \times 10^{-5}$	$4,70 \pm 0,23 \times 10^{-6}$	
28		$3,10 \pm 0,15 \times 10^{-5}$	$4,94 \pm 0,43 \times 10^{-6}$	
29		$3,36 \pm 0,12 \times 10^{-5}$	$4,63 \pm 0,43 \times 10^{-6}$	
30		$3,54 \pm 0,22 \times 10^{-5}$	$7,87 \pm 1,81 \times 10^{-6}$	
31		$2,49 \pm 0,61 \times 10^{-5}$	$4,69 \pm 0,77 \times 10^{-6}$	
32		$2,82 \pm 0,34 \times 10^{-5}$	$7,79 \pm 1,86 \times 10^{-6}$	
33		$3,25 \pm 0,14 \times 10^{-5}$	$5,54 \pm 0,18 \times 10^{-6}$	
34		$3,31 \pm 0,15 \times 10^{-5}$	$5,49 \pm 0,23 \times 10^{-6}$	
35		$3,22 \pm 0,14 \times 10^{-5}$	$5,04 \pm 0,27 \times 10^{-6}$	
36		$3,19 \pm 0,14 \times 10^{-5}$	$4,52 \pm 0,33 \times 10^{-6}$	
37		$2,89 \pm 0,14 \times 10^{-5}$	$5,02 \pm 0,47 \times 10^{-6}$	
<b>38</b>				<b><math>9,75 \pm 0,46 \times 10^{-6}</math></b>
39		$5,40 \pm 0,63 \times 10^{-5}$	$6,53 \pm 0,75 \times 10^{-6}$	
40		$2,63 \pm 0,33 \times 10^{-5}$	$5,57 \pm 1,16 \times 10^{-6}$	
41		$3,51 \pm 0,73 \times 10^{-5}$	$5,12 \pm 1,93 \times 10^{-6}$	
42		$2,78 \pm 0,68 \times 10^{-5}$	$3,69 \pm 0,91 \times 10^{-6}$	
43		$2,24 \pm 0,49 \times 10^{-5}$	$3,96 \pm 0,92 \times 10^{-6}$	
44*		$3,96 \pm 1,18 \times 10^{-5}$	$8,24 \pm 0,68 \times 10^{-6}$	
45		$4,11 \pm 0,46 \times 10^{-5}$	$7,81 \pm 1,18 \times 10^{-6}$	
46		$2,70 \pm 0,46 \times 10^{-5}$	$6,71 \pm 0,90 \times 10^{-6}$	
47		$3,12 \pm 0,20 \times 10^{-5}$	$5,38 \pm 0,42 \times 10^{-6}$	
48		$2,99 \pm 0,21 \times 10^{-5}$	$5,87 \pm 0,51 \times 10^{-6}$	
49*		$3,79 \pm 0,44 \times 10^{-5}$	$7,33 \pm 0,54 \times 10^{-6}$	
50		$2,62 \pm 0,36 \times 10^{-5}$	$4,48 \pm 0,72 \times 10^{-6}$	
51		$2,68 \pm 0,51 \times 10^{-5}$	$4,63 \pm 1,33 \times 10^{-6}$	
52		$2,91 \pm 0,42 \times 10^{-5}$	$4,67 \pm 1,13 \times 10^{-6}$	
53		$2,81 \pm 0,22 \times 10^{-5}$	$6,00 \pm 0,98 \times 10^{-6}$	
54		$3,26 \pm 0,23 \times 10^{-5}$	$4,41 \pm 1,24 \times 10^{-6}$	
55		$2,07 \pm 0,56 \times 10^{-5}$	$4,03 \pm 1,03 \times 10^{-6}$	
56		$2,00 \pm 0,53 \times 10^{-5}$	$5,43 \pm 1,04 \times 10^{-6}$	
57		$3,06 \pm 0,37 \times 10^{-5}$	$9,76 \pm 1,58 \times 10^{-6}$	

n.a. = nicht auswertbar

\* Signale weisen bereits zu Beginn der Kinetik eine erhöhte Anfangsintensität auf

**Tabelle 7.9:** Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 2,5 M HMIM Cl (Fortsetzung).

Signal	AS	$k_{1\text{O}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$	$k_{2\text{O}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{N}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$
58		$2,20 \pm 0,32 \times 10^{-5}$	$4,75 \pm 0,93 \times 10^{-6}$	
59		$3,04 \pm 0,23 \times 10^{-5}$	$4,12 \pm 0,49 \times 10^{-6}$	
60		$2,80 \pm 0,20 \times 10^{-5}$	$3,90 \pm 0,47 \times 10^{-6}$	
61		$3,30 \pm 0,63 \times 10^{-5}$	$6,20 \pm 1,44 \times 10^{-6}$	
62		$3,81 \pm 0,38 \times 10^{-5}$	$5,80 \pm 0,67 \times 10^{-6}$	
63		$3,62 \pm 0,24 \times 10^{-5}$	$5,78 \pm 0,72 \times 10^{-6}$	
64		$3,33 \pm 0,34 \times 10^{-5}$	$5,53 \pm 1,22 \times 10^{-6}$	
65		$3,42 \pm 0,82 \times 10^{-5}$	$4,53 \pm 1,25 \times 10^{-6}$	
66		$2,44 \pm 0,58 \times 10^{-5}$	$5,49 \pm 1,06 \times 10^{-6}$	
67		$2,82 \pm 0,42 \times 10^{-5}$	$6,41 \pm 1,10 \times 10^{-6}$	
68		$3,38 \pm 0,39 \times 10^{-5}$	$4,37 \pm 0,91 \times 10^{-6}$	
69		$3,17 \pm 0,36 \times 10^{-5}$	$4,98 \pm 0,58 \times 10^{-6}$	
70		$3,07 \pm 0,29 \times 10^{-5}$	$4,96 \pm 2,03 \times 10^{-6}$	
71		$4,22 \pm 1,02 \times 10^{-5}$	$5,55 \pm 1,93 \times 10^{-6}$	
72		$2,72 \pm 0,54 \times 10^{-5}$	$4,66 \pm 0,84 \times 10^{-6}$	
73		$2,28 \pm 0,27 \times 10^{-5}$	n.a.	
74		$3,32 \pm 0,33 \times 10^{-5}$	$3,23 \pm 1,34 \times 10^{-6}$	
75		$3,32 \pm 0,22 \times 10^{-5}$	$4,88 \pm 0,40 \times 10^{-6}$	
76		$2,99 \pm 0,21 \times 10^{-5}$	$2,41 \pm 0,80 \times 10^{-6}$	
77		$3,10 \pm 0,30 \times 10^{-5}$	$5,19 \pm 0,44 \times 10^{-6}$	
78		$3,60 \pm 0,41 \times 10^{-5}$	$4,69 \pm 0,77 \times 10^{-6}$	
79		$2,88 \pm 0,40 \times 10^{-5}$	$5,13 \pm 0,63 \times 10^{-6}$	
80		$3,79 \pm 0,27 \times 10^{-5}$	$4,40 \pm 0,72 \times 10^{-6}$	
81		$2,69 \pm 0,19 \times 10^{-5}$	$4,13 \pm 0,33 \times 10^{-6}$	
82		$2,71 \pm 0,24 \times 10^{-5}$	$4,32 \pm 0,36 \times 10^{-6}$	
83		$3,70 \pm 0,58 \times 10^{-5}$	$7,02 \pm 1,14 \times 10^{-6}$	
84		$2,85 \pm 0,87 \times 10^{-5}$	$5,66 \pm 1,77 \times 10^{-6}$	
85		$2,88 \pm 0,15 \times 10^{-5}$	$4,79 \pm 0,42 \times 10^{-6}$	
86		$3,52 \pm 0,23 \times 10^{-5}$	$5,32 \pm 0,54 \times 10^{-6}$	
87		$2,69 \pm 0,20 \times 10^{-5}$	$5,86 \pm 0,39 \times 10^{-6}$	
88		$3,08 \pm 0,19 \times 10^{-5}$	$3,92 \pm 0,48 \times 10^{-6}$	
89*		$5,17 \pm 2,79 \times 10^{-5}$	$6,91 \pm 0,91 \times 10^{-6}$	
90*		n.a.	$1,02 \pm 0,41 \times 10^{-5}$	
91				$1,28 \pm 0,17 \times 10^{-5}$
		<b><u>Mittelwert</u></b>	<b><u>Mittelwert</u></b>	<b><u>Mittelwert</u></b>
		$3,19 \pm 0,57 \times 10^{-5}$	$5,51 \pm 1,40 \times 10^{-6}$	$1,13 \pm 0,22 \times 10^{-5}$

n.a. = nicht auswertbar

\* Signale weisen bereits zu Beginn der Kinetik eine erhöhte Anfangsintensität auf  
Die farblich markierten Signale entsprechen den in **Abbildung 3.40** verwendeten.

**Tabelle 7.10:** Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 2,0 M HMIM Cl.

Die kinetischen Parameter wurden durch einfach exponentielle Kurvenanpassung ermittelt. In Spalte 2 (AS) wurde wenn möglich dem jeweiligen Signal die entsprechende Aminosäure zugeordnet. Bei den hier aufgelisteten Geschwindigkeitskonstanten handelt es sich um apparente Geschwindigkeitskonstanten. Die gemittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in **Tabelle 3.2** aufgelistet.

Signal	AS	$k_{1\text{O}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$	$k_{2\text{O}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{N}\rightarrow\text{U}} (\text{s}^{-1})$
1		$7,79 \pm 1,03 \times 10^{-6}$	n.a.	
2*		$6,67 \pm 0,57 \times 10^{-6}$	n.a.	
3		$5,09 \pm 0,41 \times 10^{-6}$	n.a.	
4		$4,17 \pm 0,52 \times 10^{-6}$	n.a.	
5		$5,84 \pm 0,57 \times 10^{-6}$	n.a.	
6		$5,79 \pm 0,54 \times 10^{-6}$	n.a.	
7		$4,99 \pm 0,41 \times 10^{-6}$	n.a.	
8		$4,46 \pm 0,33 \times 10^{-6}$	n.a.	
9		$5,26 \pm 0,32 \times 10^{-6}$	n.a.	
10		$5,34 \pm 0,48 \times 10^{-6}$	n.a.	
11		$6,14 \pm 0,62 \times 10^{-6}$	n.a.	
12		$4,59 \pm 0,92 \times 10^{-6}$	n.a.	
13		$3,88 \pm 0,70 \times 10^{-6}$	n.a.	
14		$4,33 \pm 0,35 \times 10^{-6}$	n.a.	
15		$4,49 \pm 0,54 \times 10^{-6}$	n.a.	
16		$3,03 \pm 0,76 \times 10^{-6}$	n.a.	
17		$4,63 \pm 0,82 \times 10^{-6}$	n.a.	
18		$4,02 \pm 0,96 \times 10^{-6}$	n.a.	
19		$5,78 \pm 0,89 \times 10^{-6}$	n.a.	
20		$4,96 \pm 0,33 \times 10^{-6}$	n.a.	
<b>21</b>		<b><math>4,91 \pm 0,41 \times 10^{-6}</math></b>	<b>n.a.</b>	
22		$4,21 \pm 0,93 \times 10^{-6}$	n.a.	
23		$5,63 \pm 0,83 \times 10^{-6}$	n.a.	
24*		n.a.	n.a.	
25*		$2,18 \pm 0,95 \times 10^{-6}$	n.a.	
26*		n.a.	n.a.	
27*		n.a.	n.a.	
<b>28</b>				<b><math>6,24 \pm 0,31 \times 10^{-6}</math></b>
		<u>Mittelwert</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Mittelwert</u>
		$4,93 \pm 1,14 \times 10^{-6}$	n.a.	$6,24 \pm 0,31 \times 10^{-6}$

n.a. = nicht auswertbar

\* Signale weisen bereits zu Beginn der Kinetik eine erhöhte Anfangsintensität auf  
Die farblich markierten Signale entsprechen den in **Abbildung 3.40** verwendeten.

**Tabelle 7.11:** Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 1,5 M HMIM Cl.

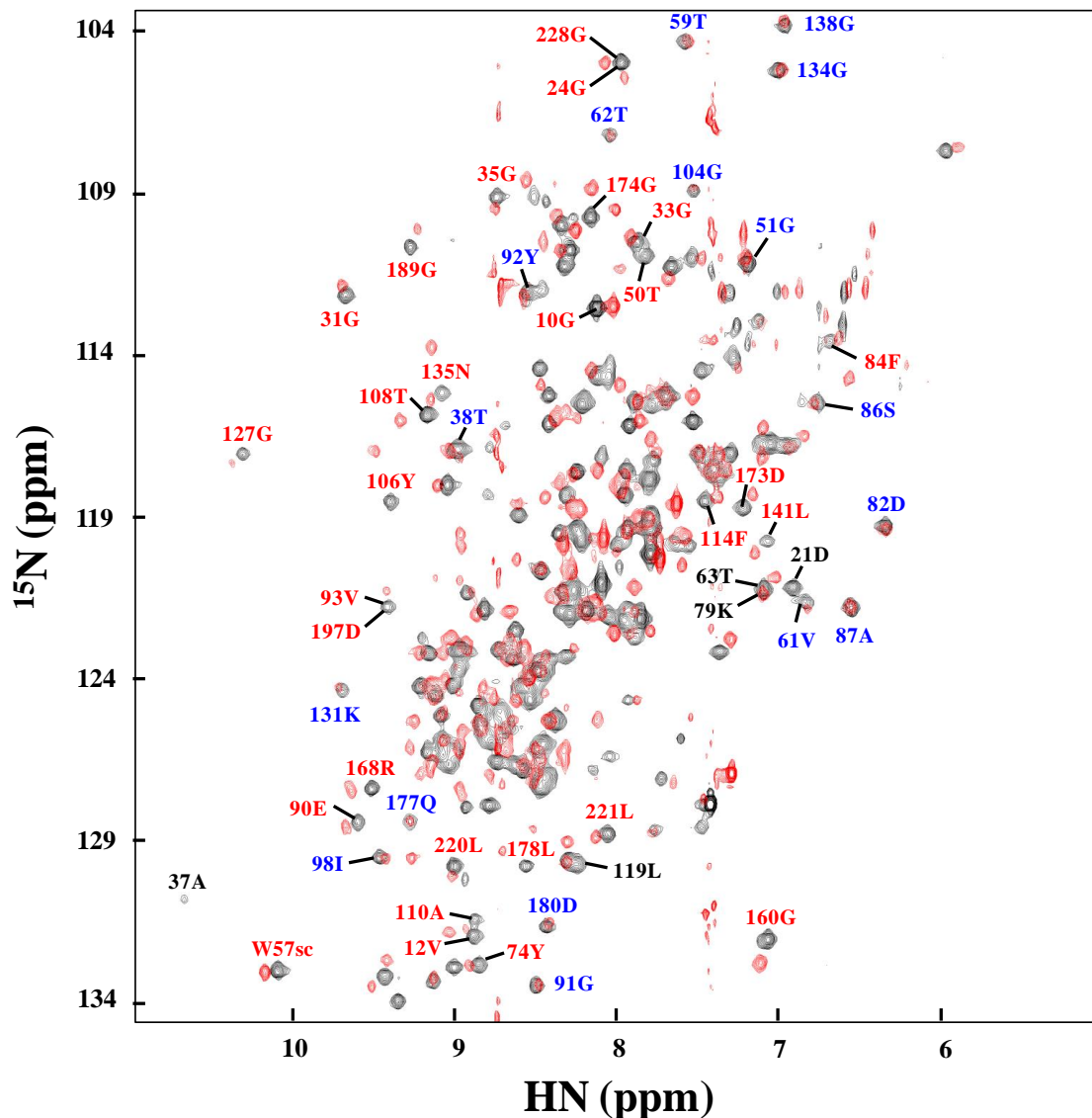
Die kinetischen Parameter wurden durch einfach exponentielle Kurvenanpassung ermittelt. In Spalte 2 (AS) wurde wenn möglich, dem jeweiligen Signal die entsprechende Aminosäure zugeordnet. Bei den hier aufgelisteten Geschwindigkeitskonstanten handelt es sich um apparente Geschwindigkeitskonstanten. Die gemittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in **Tabelle 3.2** aufgelistet.

Signal	AS	$k_{1\text{O}\rightarrow\text{U}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{2\text{O}\rightarrow\text{U}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{N}\rightarrow\text{U}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
1				$1,16 \pm 0,34 \times 10^{-6}$
2	G160			$1,72 \pm 0,55 \times 10^{-6}$
3				$9,92 \pm 3,55 \times 10^{-7}$
4				$3,31 \pm 0,80 \times 10^{-6}$
5				$1,70 \pm 0,43 \times 10^{-6}$
6				$1,64 \pm 0,55 \times 10^{-6}$
7				$9,27 \pm 2,31 \times 10^{-7}$
8				$1,14 \pm 0,28 \times 10^{-6}$
9				$9,43 \pm 9,09 \times 10^{-7}$
10				$1,42 \pm 0,46 \times 10^{-6}$
11	T108			$1,10 \pm 0,75 \times 10^{-6}$
12	N135			$1,08 \pm 0,74 \times 10^{-6}$
13				$1,73 \pm 0,41 \times 10^{-6}$
14				$9,90 \pm 4,87 \times 10^{-7}$
15	A87			$4,63 \pm 1,40 \times 10^{-6}$
16	D82			$9,71 \pm 4,35 \times 10^{-7}$
<b>17</b>	<b>G10</b>			<b><math>1,43 \pm 0,26 \times 10^{-6}</math></b>
18	G51			$1,32 \pm 0,36 \times 10^{-6}$
19				$1,05 \pm 0,35 \times 10^{-6}$
20				$2,10 \pm 0,62 \times 10^{-6}$
21		n.a.	n.a.	
22		n.a.	n.a.	
23		n.a.	n.a.	
24		n.a.	n.a.	
25		n.a.	n.a.	
26		n.a.	n.a.	
<b>27</b>		<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	
28		n.a.	n.a.	
29		n.a.	n.a.	
		<b><u>Mittelwert</u></b>	<b><u>Mittelwert</u></b>	<b><u>Mittelwert</u></b>
		n.a.	n.a.	$1,57 \pm 0,91 \times 10^{-6}$

n.a. = nicht auswertbar

Die farblich markierten Signale entsprechen den in **Abbildung 3.40** verwendeten.

### 7.3. Änderung der chemischen Verschiebung in $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von EGFP in Gegenwart von 1 M HMIM Cl



**Abbildung 7.1:** Überlagerung von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren unter nativen Bedingungen und in Gegenwart von 1 M HMIM Cl.

Dargestellt ist die Überlagerung eines  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrums von nativem EGFP (schwarz) in 50 mM Na-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 8,0 mit einem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektrum in Gegenwart von 1 M HMIM Cl (rot) nach einer Inkubationszeit von 40 min in 50 mM Na-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 8,0. Die Messungen wurden an einem Bruker Avance II 600 NMR-Spektrometer bei einer Temperatur von 303 K unter Zusatz von 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  und einer Proteinkonzentration von 12 mg/ml (0,45 mM) durchgeführt. Die Zuordnung der Aminosäuren erfolgte auf Basis einer verkürzten GFPuv-Variante (Met1-Ile229) nach Khan et al., 2003, wobei bei manchen Zuordnungen eine gewisse Unsicherheit vorhanden sein kann. Im Vergleich der Spektren untereinander zeigen die rot markierten Aminosäuren eine starke und die blau markierten eine schwache oder keine chemische Verschiebung. Bei den schwarzen Markierungen erfolgte keine Einstufung in starke oder schwache chemische Verschiebung, da eine sichere Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Aminosäuren nicht gegeben war.

W57sc (Tryptophan 57 *side chain*) ist das einzige Signal welches einer Aminosäureseitenkette zugeordnet werden konnte. Bei den restlichen Signalen handelt es sich ausschließlich um Signale der Amidprotonen des Peptidrückgrats (Peptidbindung).

## 7.4. Übersicht zugeordneter Aminosäuren aus den $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von EGFP in Gegenwart von 1 M HMIM Cl

**Tabelle 7.12:** Übersicht zugeordneter Aminosäuren und Einstufung nach schwacher und starker chemischer Verschiebung aus der Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren.

Dargestellt sind Aminosäuren (AS) mit schwacher (blau) und starker (rot) chemischer Verschiebung im Vergleich der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren unter nativen Bedingungen und in Gegenwart von 1 M HMIM Cl (siehe **Abbildung 7.1.**). Die orange unterlegten Felder zeigen negativ geladene Aminosäuren bzw. zugeordnete AS in direkter Nachbarschaft zu negativ geladenen Aminosäuren. Die rot unterlegten Felder zeigen die zugeordneten aromatischen Aminosäuren.

AS	Primärsequenz	zugeordnete AS	Strukturelement	AS	Primärsequenz	zugeordnete AS	Strukturelement
-2	H			30	S		$\beta$ -Faltblatt #2
-1	M			31	G	<b>G</b>	$\beta$ -Faltblatt #2
1	V			32	E		$\beta$ -Faltblatt #2
2	S			33	G	<b>G</b>	$\beta$ -Faltblatt #2
3	K		$\alpha$ -helix #1	34	E		$\beta$ -Faltblatt #2
4	G		$\alpha$ -helix #1	35	G	<b>G</b>	$\beta$ -Faltblatt #2
5	E		$\alpha$ -helix #1	36	D		$\beta$ -Faltblatt #2
6	E		$\alpha$ -helix #1	37	A		loop
7	L		$\alpha$ -helix #1	38	T	<b>T</b>	loop
8	F		$\alpha$ -helix #1	39	Y		loop
9	T		$\alpha$ -helix #1	40	G		loop
10	G	<b>G</b>	$\alpha$ -helix #1	41	K		$\beta$ -Faltblatt #3
11	V		$\beta$ -Faltblatt #1	42	L		$\beta$ -Faltblatt #3
12	V	<b>V</b>	$\beta$ -Faltblatt #1	43	T		$\beta$ -Faltblatt #3
13	P		$\beta$ -Faltblatt #1	44	L		$\beta$ -Faltblatt #3
14	I		$\beta$ -Faltblatt #1	45	K		$\beta$ -Faltblatt #3
15	L		$\beta$ -Faltblatt #1	46	F		$\beta$ -Faltblatt #3
16	V		$\beta$ -Faltblatt #1	47	I		$\beta$ -Faltblatt #3
17	E		$\beta$ -Faltblatt #1	48	C		$\beta$ -Faltblatt #3
18	L		$\beta$ -Faltblatt #1	49	T		loop
19	D		$\beta$ -Faltblatt #1	50	T	<b>T</b>	loop
20	G		$\beta$ -Faltblatt #1	51	G	<b>G</b>	loop
21	D	D	$\beta$ -Faltblatt #1	52	K		loop
22	V		$\beta$ -Faltblatt #1	53	L		loop
23	N		loop	54	P		loop
24	G	<b>G</b>	loop	55	V		loop
25	H		$\beta$ -Faltblatt #2	56	P		$\alpha$ -helix #2
26	K		$\beta$ -Faltblatt #2	57	W	<b>W sc</b>	$\alpha$ -helix #2
27	F		$\beta$ -Faltblatt #2	58	P		$\alpha$ -helix #2
28	S		$\beta$ -Faltblatt #2	59	T	<b>T</b>	$\alpha$ -helix #2
29	V		$\beta$ -Faltblatt #2	60	L		$\alpha$ -helix #2

**Tabelle 7.12:** Übersicht zugeordneter Aminosäuren und Einstufung nach schwacher und starker chemischer Verschiebung aus der Überlagerung der 1H-15N-TROSY-HSQC-Spektren (Fortsetzung).

AS	Primär-sequenz	zugeordnete AS	Struktur-element	AS	Primär-sequenz	zugeordnete AS	Struktur-element
61	V	V	$\alpha$ -helix #2	100	F		$\beta$ -Faltblatt #4
62	T	T	$\alpha$ -helix #2	101	K		loop
63	T	T	$\alpha$ -helix #2	102	D		loop
64	L		$\alpha$ -helix #2	103	D		loop
65	T		Chromophor	104	G	G	loop
66	Y		Chromophor	105	N		$\beta$ -Faltblatt #5
67	G		Chromophor	106	Y	Y	$\beta$ -Faltblatt #5
68	V		$\alpha$ -helix #2	107	K		$\beta$ -Faltblatt #5
69	Q		$\alpha$ -helix #2	108	T	T	$\beta$ -Faltblatt #5
70	C		$\alpha$ -helix #2	109	R		$\beta$ -Faltblatt #5
71	F		$\alpha$ -helix #2	110	A	A	$\beta$ -Faltblatt #5
72	S		$\alpha$ -helix #2	111	E		$\beta$ -Faltblatt #5
73	R		loop	112	V		$\beta$ -Faltblatt #5
74	Y	Y	loop	113	K		$\beta$ -Faltblatt #5
75	P		loop	114	F	F	$\beta$ -Faltblatt #5
76	D		$\alpha$ -helix #3	115	E		$\beta$ -Faltblatt #5
77	H		$\alpha$ -helix #3	116	G		loop
78	M		$\alpha$ -helix #3	117	D		loop
79	K	K	$\alpha$ -helix #3	118	T		$\beta$ -Faltblatt #6
80	Q		$\alpha$ -helix #3	119	L	L	$\beta$ -Faltblatt #6
81	H		$\alpha$ -helix #3	120	V		$\beta$ -Faltblatt #6
82	D	D	loop	121	N		$\beta$ -Faltblatt #6
83	F		$\alpha$ -helix #4	122	R		$\beta$ -Faltblatt #6
84	F	F	$\alpha$ -helix #4	123	I		$\beta$ -Faltblatt #6
85	K		$\alpha$ -helix #4	124	E		$\beta$ -Faltblatt #6
86	S	S	$\alpha$ -helix #4	125	L		$\beta$ -Faltblatt #6
87	A	A	$\alpha$ -helix #4	126	K		$\beta$ -Faltblatt #6
88	M		$\alpha$ -helix #4	127	G		$\beta$ -Faltblatt #6
89	P		loop	128	I		$\beta$ -Faltblatt #6
90	E	E	loop	129	D		loop
91	G	G	loop	130	F		loop
92	Y	Y	$\beta$ -Faltblatt #4	131	K	K	loop
93	V	V	$\beta$ -Faltblatt #4	132	E		loop
94	Q		$\beta$ -Faltblatt #4	133	D		loop
95	E		$\beta$ -Faltblatt #4	134	G	G	loop
96	R		$\beta$ -Faltblatt #4	135	N	N	loop
97	T		$\beta$ -Faltblatt #4	136	I		loop
98	I	I	$\beta$ -Faltblatt #4	137	L		loop
99	F		$\beta$ -Faltblatt #4	138	G	G	loop



**Tabelle 7.12:** Übersicht zugeordneter Aminosäuren und Einstufung nach schwacher und starker chemischer Verschiebung aus der Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren (Fortsetzung).

AS	Primärsequenz	zugeordnete AS	Strukturelement	AS	Primärsequenz	zugeordnete AS	Strukturelement
139	H		loop	179	A		$\beta$ -Faltblatt #9
140	K		loop	180	D	<b>D</b>	$\beta$ -Faltblatt #9
141	L	<b>L</b>	loop	181	H		$\beta$ -Faltblatt #9
142	E		loop	182	Y		$\beta$ -Faltblatt #9
143	Y		loop	183	Q		$\beta$ -Faltblatt #9
144	N		loop	184	Q		$\beta$ -Faltblatt #9
145	Y		loop	185	N		$\beta$ -Faltblatt #9
146	N		loop	186	T		$\beta$ -Faltblatt #9
147	S		$\beta$ -Faltblatt #7	187	P		$\beta$ -Faltblatt #9
148	H		$\beta$ -Faltblatt #7	188	I		loop
149	N		$\beta$ -Faltblatt #7	189	G	<b>G</b>	loop
150	V		$\beta$ -Faltblatt #7	190	D		loop
151	Y		$\beta$ -Faltblatt #7	191	G		loop
152	I		$\beta$ -Faltblatt #7	192	P		loop
153	M		$\beta$ -Faltblatt #7	193	V		loop
154	A		$\beta$ -Faltblatt #7	194	L		loop
155	D		$\beta$ -Faltblatt #7	195	L		loop
156	K		loop	196	P		loop
157	Q		loop	197	D	<b>D</b>	loop
158	K		loop	198	N		loop
159	N		loop	199	H		$\beta$ -Faltblatt #10
160	G	<b>G</b>	$\beta$ -Faltblatt #8	200	Y		$\beta$ -Faltblatt #10
161	I		$\beta$ -Faltblatt #8	201	L		$\beta$ -Faltblatt #10
162	K		$\beta$ -Faltblatt #8	202	S		$\beta$ -Faltblatt #10
163	V		$\beta$ -Faltblatt #8	203	T		$\beta$ -Faltblatt #10
164	N		$\beta$ -Faltblatt #8	204	Q		$\beta$ -Faltblatt #10
165	F		$\beta$ -Faltblatt #8	205	S		$\beta$ -Faltblatt #10
166	K		$\beta$ -Faltblatt #8	206	A		$\beta$ -Faltblatt #10
167	I		$\beta$ -Faltblatt #8	207	L		$\beta$ -Faltblatt #10
168	R	<b>R</b>	$\beta$ -Faltblatt #8	208	S		$\beta$ -Faltblatt #10
169	H		$\beta$ -Faltblatt #8	209	K		loop
170	N		$\beta$ -Faltblatt #8	210	D		loop
171	I		$\beta$ -Faltblatt #8	211	P		loop
172	E		loop	212	N		loop
173	D	<b>D</b>	loop	213	E	<b>E</b>	loop
174	G	<b>G</b>	loop	214	K		loop
175	S		loop	215	R		loop
176	V		$\beta$ -Faltblatt #9	216	D		loop
177	Q	<b>Q</b>	$\beta$ -Faltblatt #9	217	H		$\beta$ -Faltblatt #11
178	L	<b>L</b>	$\beta$ -Faltblatt #9	218	M		$\beta$ -Faltblatt #11

**Tabelle 7.12:** Übersicht zugeordneter Aminosäuren und Einstufung nach schwacher und starker chemischer Verschiebung aus der Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren (Fortsetzung).

AS	Primärsequenz	zugeordnete AS	Strukturelement	AS	Primärsequenz	zugeordnete AS	Strukturelement
219	V		$\beta$ -Faltblatt #11	229	I		
220	L	<b>L</b>	$\beta$ -Faltblatt #11	230	T		
221	L	<b>L</b>	$\beta$ -Faltblatt #11	231	L		
222	E		$\beta$ -Faltblatt #11	232	G		
223	F		$\beta$ -Faltblatt #11	233	M		
224	V		$\beta$ -Faltblatt #11	234	D		
225	T		$\beta$ -Faltblatt #11	235	E		
226	A		$\beta$ -Faltblatt #11	236	L		
227	A		$\beta$ -Faltblatt #11	237	Y		
228	G	<b>G</b>		238	K		

## 7.5. Aminosäuresequenz und physikalische Eigenschaften der verwendeten EGFP-Variante

(M)GHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSG  
EGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSA  
MPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN  
YNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYL  
STQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

N-terminale Fusions-linker-Sequenz mit His<sub>10</sub>-tag und Enterokinaseschnittstelle:

(M)GHHHHHHHHHHSSGHIDDDDK

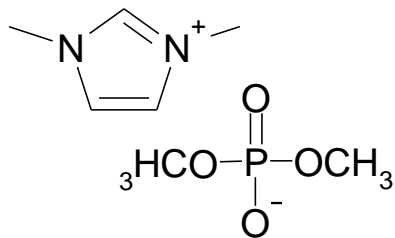
Beteiligte Aminosäuren des durch autokatalytische Zyklisierung gebildeten Chromophors:

**TYG**

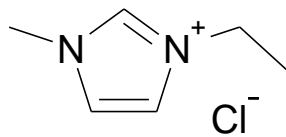
Anzahl der Aminosäuren nach Prozessierung:	240
Molekulargewicht:	27061,8 Da
$\epsilon_{280}$ :	$21890 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
$\epsilon_{490}$ :	$55000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
Isoelektrischer Punkt:	5,67

## 7.6. Chemische Struktur der genutzten Ionischen Flüssigkeiten

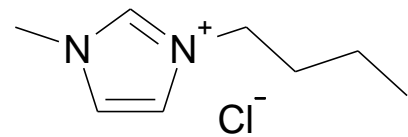
MMIM DMP



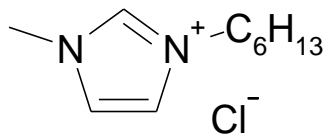
EMIM Cl



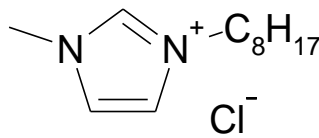
BMIM Cl



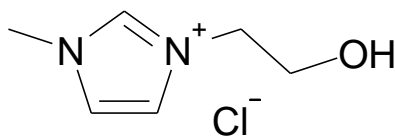
HMIM Cl



OMIM Cl



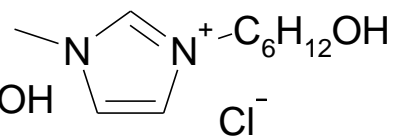
HO-EMIM Cl



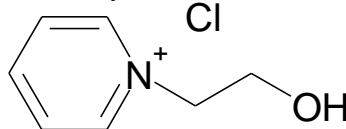
HO-PMIM Cl



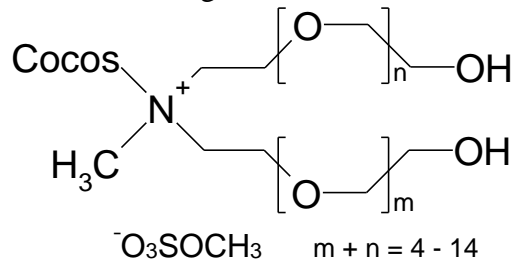
HO-HMIM Cl



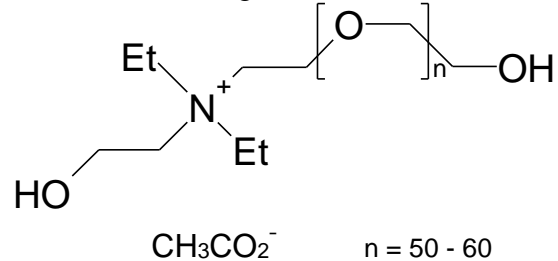
HO-EPy Cl



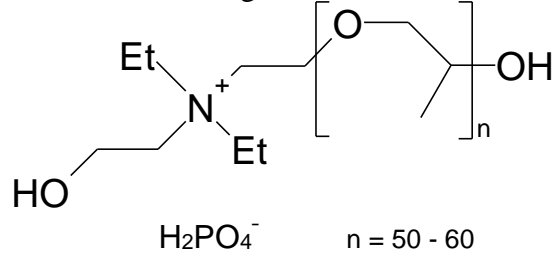
Ammoeng™ 100



Ammoeng™ 111



Ammoeng™ 112



# I. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Schematische Darstellung der Proteinfaltung <i>in vitro</i> .	4
<b>Abbildung 1.2:</b> Darstellung verschiedener Interaktionsmöglichkeiten eines Additivs mit einer Proteinoberfläche nach TIMASHEFF (Timasheff, 2002).	6
<b>Abbildung 1.3:</b> Salze der Hofmeister-Reihe und deren Einteilung in stabilisierende und destabilisierende Wirkung auf Proteine (modifiziert nach Yang, 2009).	8
<b>Abbildung 1.4:</b> Übersicht über häufig vorkommende Kationen und Anionen in Ionischen Flüssigkeiten.	10
<b>Abbildung 1.5:</b> Einordnung einiger Ionischer Flüssigkeiten in die Hofmeister-Reihe.	11
<b>Abbildung 1.6:</b> Vorgeschlagerener Mechanismus der Chromophorbildung.	17
<b>Abbildung 1.7:</b> Strukturdarstellung des EGFP.	18
<b>Abbildung 1.8:</b> Vereinfachte schematische Darstellung der GFP-Faltung (Cycle3) nach Enoki et al., 2004.	22
<b>Abbildung 2.1:</b> Vereinfachte Darstellung eines JABLONSKI-Diagramms.	50
<b>Abbildung 2.2:</b> Aufbau des Trennkanals und Trennprinzip der AF4.	62
<b>Abbildung 3.1:</b> Absorptionsspektren von Ionischen Flüssigkeiten.	66
<b>Abbildung 3.2:</b> Fluoreszenzspektren der Ionischen Flüssigkeit HMIM Cl bei verschiedenen Konzentrationen.	67
<b>Abbildung 3.3:</b> Infrarotspektren von Ionischen Flüssigkeiten.	68
<b>Abbildung 3.4:</b> Analyse der Prozessierung des <sup>15</sup> N-markierten EGFP durch Enterokinase bei 37 °C.	70
<b>Abbildung 3.5:</b> Coomassie-gefärbte SDS-PAGE verschiedener Reinigungsstufen des <sup>15</sup> N-markierten EGFP.	71
<b>Abbildung 3.6:</b> Absorptionsspektren von EGFP und Differenzspektrum zwischen nativem und in 6 M GuHCl denaturiertem EGFP.	72
<b>Abbildung 3.7:</b> Anregungs- und Emissionsspektrum von EGFP.	73
<b>Abbildung 3.8:</b> Fluoreszenzspektren von EGFP.	74
<b>Abbildung 3.9:</b> Fern-UV-CD-Spektren von EGFP.	75
<b>Abbildung 3.10:</b> Nah-UV- und VIS-CD-Spektren von EGFP.	76
<b>Abbildung 3.11:</b> Infrarotspektrum von EGFP.	77
<b>Abbildung 3.12:</b> <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-TROSY-HSQC-Spektren von EGFP.	78
<b>Abbildung 3.13:</b> pH-Stabilität des EGFP.	79
<b>Abbildung 3.14:</b> Ausbeutebestimmung nach Rückfaltung von EGFP.	81
<b>Abbildung 3.15:</b> Ausbeutebestimmung nach Rückfaltung von EGFP in Gegenwart von N-alkylierter 3-Methylimidazoliumchloride und deren endständig hydroxylierter Analoga.	83
<b>Abbildung 3.16:</b> Ausbeutebestimmung nach Rückfaltung in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten.	85
<b>Abbildung 3.17:</b> Ausbeutebestimmung nach Rückfaltung in Gegenwart von auf quartären Aminen basierenden Ionischen Flüssigkeiten.	85
<b>Abbildung 3.18:</b> Chemisch induzierte Denaturierung von EGFP durch Guanidinhydrochlorid.	88

<b>Abbildung 3.19:</b> Chemisch induzierte Denaturierung von EGFP durch Guanidinhydrochlorid. ....	89
<b>Abbildung 3.20:</b> Entfaltungskinetik des EGFP in Gegenwart von GuHCl. ....	90
<b>Abbildung 3.21:</b> Kinetische Parameter der Renaturierung aus der chemisch induzierten Denaturierung von EGFP durch GuHCl. ....	91
<b>Abbildung 3.22:</b> Chevron-Plot der Faltungskinetik von EGFP. ....	92
<b>Abbildung 3.23:</b> Vereinfachtes Schema der Rückfaltung von EGFP aus dem GuHCl-induziert denaturierten Zustand. ....	94
<b>Abbildung 3.24:</b> Chemisch induzierte Denaturierung von EGFP durch Ionische Flüssigkeiten. ....	96
<b>Abbildung 3.25:</b> Entfaltungskinetiken des EGFP in Gegenwart verschiedener Denaturanzien. ....	97
<b>Abbildung 3.26:</b> CD-Spektren im VIS-Bereich von EGFP in Gegenwart verschiedener Denaturanzien. ....	99
<b>Abbildung 3.27:</b> CD-Spektren im VIS-Bereich von EGFP in Gegenwart von Ionischen Flüssigkeiten bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und anschließender Ultrazentrifugation. ....	100
<b>Abbildung 3.28:</b> CD-Spektren im Nah-UV- und VIS-Bereich von EGFP in Gegenwart von BMIM Cl bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. ....	101
<b>Abbildung 3.29:</b> Infrarotspektren von nativem EGFP und in Gegenwart von HMIM Cl. ....	102
<b>Abbildung 3.30:</b> Renaturierung von EGFP in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubationszeit in Gegenwart von HMIM Cl. ....	103
<b>Abbildung 3.31:</b> Chevron-Plot der Faltungskinetik von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl. ....	106
<b>Abbildung 3.32:</b> Verlust der Faltungsausbeute von EGFP in Abhängigkeit der Inkubationsdauer in HMIM Cl. ....	107
<b>Abbildung 3.33:</b> Verlust der Faltungsausbeute von EGFP in Gegenwart von GuHCl und verschiedener Ionischer Flüssigkeiten in Abhängigkeit von der Denaturierungszeit und Proteinkonzentration. ....	109
<b>Abbildung 3.34:</b> Prozentuale Verteilung der beiden Amplituden die den Verlust der Faltungsausbeute von EGFP in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl in Abhängigkeit der Proteinkonzentration abbilden. ....	111
<b>Abbildung 3.35:</b> Vereinfachte schematische Darstellung der Faltung von EGFP zur Beschreibung des Verlustes der Faltungsausbeute in Gegenwart Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl. ....	112
<b>Abbildung 3.36:</b> Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (AF4) mit EGFP. ....	114
<b>Abbildung 3.37:</b> Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (AF4) mit EGFP in Gegenwart von HMIM Cl. ....	115
<b>Abbildung 3.38:</b> DLS-Messung von EGFP in 3 M HMIM Cl zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius. ....	116
<b>Abbildung 3.39:</b> $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren von EGFP in Gegenwart von GuHCl. ....	119
<b>Abbildung 3.40:</b> $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Spektren von EGFP in Gegenwart von HMIM Cl. ....	122

---

<b>Abbildung 3.41:</b> Entfaltungskinetiken der $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC Messungen an EGFP in Gegenwart von GuHCl und HMIM Cl. ....	124
<b>Abbildung 4.1:</b> Darstellung von Aminosäuren des EGFP mit starker und schwacher Wechselwirkung in Gegenwart von 1 M HMIM Cl. ....	140
<b>Abbildung 4.2:</b> Darstellung aromatischer Aminosäuren des EGFP. ....	141
<b>Abbildung 7.1:</b> Überlagerung von $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren unter nativen Bedingungen und in Gegenwart von 1 M HMIM Cl. ....	170

## II. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1:</b> Überblick über spektrale Eigenschaften der sieben Hauptklassen der fluoreszierenden Proteine. ....	19
<b>Tabelle 2.1:</b> Liste der verwendeten Geräte. ....	26
<b>Tabelle 2.2:</b> Liste sonstiger Geräte, Kits, Referenzmarker und Materialien. ....	28
<b>Tabelle 2.3:</b> Liste der verwendeten Ionischen Flüssigkeiten. ....	30
<b>Tabelle 2.4:</b> Liste der verwendeten Chemikalien. ....	30
<b>Tabelle 2.5:</b> Liste der verwendeten Enzyme und Proteine. ....	32
<b>Tabelle 2.6:</b> Liste der verwendeten Organismen und Plasmide. ....	32
<b>Tabelle 2.7:</b> Liste der verwendeten Software. ....	32
<b>Tabelle 2.8:</b> Liste der verwendeten Geräte anderer Institute. ....	33
<b>Tabelle 2.9:</b> Liste der verwendeten Kulturmedien und deren Zusammensetzung. ....	33
<b>Tabelle 2.10:</b> Liste der verwendeten Puffersysteme und deren Zusammensetzung für die SDS-PAGE. ....	35
<b>Tabelle 2.11:</b> Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele. ....	35
<b>Tabelle 2.12:</b> Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung nach FAIRBANKS. ....	35
<b>Tabelle 2.13:</b> Übersicht der detektierten spektralen Bereiche der Emission bei entsprechender Anregungswellenlänge. ....	52
<b>Tabelle 3.1:</b> Vergleich der kinetischen Parameter der Renaturierung von EGFP und Cycle3. ....	93
<b>Tabelle 3.2:</b> Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von HMIM Cl und GuHCl. ....	120
<b>Tabelle 4.1:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>in vitro</i> -Faltung von EGFP in Gegenwart von L-Arginin sowie N-alkylierten 3-Methylimidazoliumchloriden und deren endständig hydroxylierter Analoga. ....	129
<b>Tabelle 4.2:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>in vitro</i> -Faltung von EGFP in Gegenwart von L-Arginin und weiterer Ionischer Flüssigkeiten. ....	133
<b>Tabelle 7.1:</b> Kinetische Parameter der chemisch induzierten Denaturierung von EGFP durch GuHCl. ....	157
<b>Tabelle 7.2:</b> Kinetische Parameter der Renaturierung nach chemisch induzierter Denaturierung von EGFP durch GuHCl. ....	158
<b>Tabelle 7.3:</b> Kinetische Parameter der chemisch induzierten Denaturierung von EGFP durch unterschiedliche Denaturanzien. ....	159
<b>Tabelle 7.4:</b> Parameter der linearen Regressionsgeraden der Entfaltungskinetik des EGFP in Gegenwart von GuHCl und Ionischer Flüssigkeiten. ....	160
<b>Tabelle 7.5:</b> Kinetische Parameter der Renaturierung von EGFP in Abhängigkeit der HMIM Cl-Konzentration im Renaturierungspuffer und der Denaturierungsdauer in 3 M HMIM Cl. ....	160
<b>Tabelle 7.6:</b> Kinetische Parameter der Renaturierung des EGFP aus dem chemisch denaturierten Zustand in 3 M HMIM Cl. ....	161



<b>Tabelle 7.7:</b> Kinetische Parameter des Verlusts der Rückfaltungsausbeute in Gegenwart verschiedener Ionischer Flüssigkeiten und GuHCl bei verschiedenen EGFP-Konzentrationen.....	162
<b>Tabelle 7.8:</b> Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 4,4 M GuHCl.....	163
<b>Tabelle 7.9:</b> Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 2,5 M HMIM Cl. ....	165
<b>Tabelle 7.10:</b> Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 2,0 M HMIM Cl. ....	168
<b>Tabelle 7.11:</b> Geschwindigkeitskonstanten der aus den Intensitätsänderungen von Signalen aus $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren ermittelten Kinetiken von EGFP in Gegenwart von 1,5 M HMIM Cl. ....	169
<b>Tabelle 7.12:</b> Übersicht zugeordneter Aminosäuren und Einstufung nach schwacher und starker chemischer Verschiebung aus der Überlagerung der $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-Spektren.....	171

### III. Lebenslauf

Name: Heiko Pultke

Geburtsdatum: 06.11.1978

Geburtsort: Wilhelm-Pieck-Stadt Guben

#### **Bildungsweg:**

1985-1991 POS Rosa Luxemburg Guben

1991-1993 Gymnasium Guben

1993-1998 Pestalozzi Gymnasium Guben  
Leistungskurse: Chemie und Biologie  
Abschluss: Abitur

1998-2003 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

September 2003 Abschluss zum Diplom Biochemiker  
Diplomarbeit: *Einfluss Ionischer Flüssigkeiten auf die Faltung und Aggregation des Grün Fluoreszierenden Proteins*

2003-2008 Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Biotechnologie (AG Prof. Dr. R. Rudolph), Titel: *Einfluss Ionischer Flüssigkeiten auf die Faltung und Aggregation des Grün Fluoreszierenden Proteins*

seit 2008 Wissenschaftlicher Angestellter bei Scil Proteins später Wacker Biotech (Halle / Saale)

## IV. Publikationen, Vorträge und Poster

- 2003 16. Faltertage – Leucorea Wittenberg  
**Vortrag:** „*Ionic liquids promote protein folding*“
- 2004-2006 Max-Buchner-Forschungsstiftung / DECHEMA  
Forschungsprojekt 2467: „*Verwendung Ionischer Flüssigkeiten zur Verbesserung der in vitro Faltung von inclusion body Proteinen*“
- 2006 19. Faltertage – Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
**Poster:** „*EGFP in Ionic Liquids*“
- 2007 Workshop – Uni Rostock / Interaction of Ionic Liquids and Proteins  
**Poster:** „*EGFP in Ionic Liquids*“
- 2014 **Publikation:**  
[Tischer A., Pultke H., Topf., Auton M., Lange C., Lilie H., *The Effects of N-ethyl-N'-methyl imidazolium chloride on the solubility, stability, and aggregation of tc-rPA*; FEBS Journal, **2014** Apr;281(14):1738-1749]

## V. Danksagung

Ich danke an erster Stelle Prof. Dr. Rainer Rudolph. Zum einen dafür, dass ich an seinem Institut meine Diplom- und Doktorarbeit anfertigen durfte und zum anderen, dass er durch sein Interesse an den Ionischen Flüssigkeiten und deren Wirkung auf Proteine immer am Fortlauf der Arbeit interessiert war.

Bei Dr. Christian Lange bedanke ich mich für die langjährige Betreuung meiner Doktorarbeit bei der er mir in seiner gutmütigen, geduldigen Art stets mit Rat beistand und für die Anregungen bei der Korrektur dieser Arbeit.

PD Dr. Hauke Lilie gilt ein besonderer Dank da er mich in die Thematik einführte, meine Diplomarbeit und die Anfangszeit meiner Doktorarbeit betreute, bevor ich in die AG Lange wechselte. Trotzdem blieb er des Öfteren Anlaufpunkt für gezielte Fragestellungen und war immer ein Quell kurzer jedoch sehr präziser und zielführender Interpretationen von Daten, Denkanstößen und Hilfestellungen bei der Umsetzung von Ideen. Darüber hinaus gebührt ihm Dank, dass er mir ermöglichte nach all den Jahren diese Arbeit einzureichen.

Das der recht langwierige Prozess der Fertigstellung dieser Doktorarbeit letztlich zu einem guten Ende geführt hat, ist vor allem PD Dr. Ralph Golbik zu verdanken. Über all die Jahre hinweg hat er mich regelmäßig motiviert und angehalten die Arbeit voranzutreiben und zu einem Abschluss zu bringen. Auch die Hinweise und Anregungen sich mit bestimmten Sachverhalten auseinanderzusetzen führten zu einer kritischeren Betrachtung der Daten.

Meinen Mitstreitern und Kollegen des gesamten Instituts für Biotechnologie insbesondere der AG Lange und AG Lilie danke ich für die sehr schöne und abwechslungsreiche Zeit im Labor: allen voran Dr. Philine Dobberthien mit der ich Seite an Seite Büro- und Arbeitsplatz über die gesamte Zeit teilte, Dr. Thomas Schröder, Dr. Alexander Tischer, Dr. Stefan Frost, Dr. Sabine Bergelt, Dr. Thomas Klose, Dr. Roman Dalüge, Dr. Claudia Simon, meinem damaligen HiWi Dr. Tobias Grube, Dr. Claudius Stordeur, Robert Buchfink, Olaf Birkenmeier, Dr. Ganesh Patil, Christian Klewitz und natürlich der guten Seele des Labors Renate Nitsch.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich den Arbeitsgruppen und Firmen bei denen außerhalb des Instituts für Biotechnologie Messungen durchgeführt werden konnten. Hervorzuheben ist hier die Fachgruppe Biophysik unter Leitung von Prof. Dr. Jochen Balbach in der die NMR-spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt wurden. Allen voran ist hier Dr. Ulrich Weininger zu nennen, der die Messungen durchführte und mit dem ich die Ergebnisse

diskutieren konnte. Im Institut für Physikalische Chemie um Prof. Dr. Alfred Blume wurden die IR-spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt. Hier ist vor allem Dr. Andreas Kerth zu nennen, mit dessen Hilfe die Messungen umgesetzt werden konnten. Ein weiter Dank gilt Herrn Dr. Dierk Roessner der Firma Wyatt Technology Europe GmbH der freundlicherweise die asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung durchführte.

Beim Verbundprojektes Wachstumskern II "Wertschöpfung durch Proteine als Wirkstoffe und Werkzeuge" und auch bei der Max-Buchner-Forschungstiftung bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt Sabine Fröhlich und Katharina Wolters für das Korrekturlesen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie die mich die lange Zeit über unterstützte und das ein oder andere Mal zurückstecken musste und dafür, dass sie die Hoffnung nicht aufgegeben hat.  
DANKE!

## **VI. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angeführten Literatur sowie der genannten Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlichen oder inhaltlichen Zitate wurden als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde bisher noch keiner Prüfungskommission zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt.

---

Heiko Pultke

Halle / Saale,