

**Biophysikalische Charakterisierung der Proteinfaltung
und Lipidinteraktion der humanen AmphiphysinII/Bin1
N-BAR-Domäne**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

von Tobias Gruber

geboren am 19. April 1984 in Köthen(Anhalt)

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.12.2014

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 27.04.2015

Gutachter: (1) PD Dr. Ralph Golbik
(2) Prof. Dr. Jochen Balbach
(3) Prof. Dr. Robert Seckler

Die größten Wunder gehen
in der größten Stille vor sich.

Wilhelm Raabe

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das Proteinfaltungsproblem	1
1.1.1 Proteinstabilität.....	2
1.1.2 Faltungswege und Energielandschaften	4
1.1.3 Die Prolinisomerisierung als spezielle Faltungsreaktion	9
1.2 Die AmphiphysinII/Bin1 N-BAR-Domäne und ihre Funktion in der Membrankrümmung	11
1.2.1 Biologische Membranen und Möglichkeiten der Membrankrümmung	11
1.2.2 Die BAR-Domänen-Superfamilie	12
1.2.3 Die humane AmphiphysinII/Bin1 N-BAR-Domäne	15
1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit	17
2 Materialien und Methoden	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Chemikalien und Säulenmaterialien	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Geräte.....	18
2.1.4 Nährmedien, Bakterienstämme und Plasmide	19
2.1.5 Enzyme, Peptide und Lipide	20
2.1.6 Standards und Kits.....	21
2.1.7 Software	21
2.2 Molekularbiologische Arbeiten	22
2.2.1 Herstellung und Transformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	22
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	22
2.2.3 Kolonie-PCR	23
2.2.4 Sequenzspezifische Mutagenese (QuikChange®).....	23
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.6 Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	24
2.2.7 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA	24
2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
2.4 Überproduktion und Reinigung von N-BAR und SH3	26
2.5 Überproduktion und Reinigung von SUMO-Fusionsprodukten	27
2.6 Präparation der SUMO-Protease Ulp1	28
2.7 Spektroskopische Methoden	29
2.7.1 Theoretische Grundlagen der optischen Spektroskopie	29
2.7.2 Grundlagen der Fluoreszenzanisotropie	32

2.7.3 Absorptionsspektroskopie.....	33
2.7.4 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie.....	33
2.7.5 Fluoreszenzspektroskopie	34
2.7.6 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante durch Fluoreszenzspektroskopie	34
2.7.7 Messung der Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid zur Bestimmung der Oberflächenzugänglichkeit von Tryptophan	35
2.8 Messung und Auswertung konformationeller Übergänge.....	36
2.8.1 Auswertung von Entfaltungsübergängen für monomere Proteine.....	36
2.8.2 Auswertung von Entfaltungsübergängen für dimere Proteine	37
2.9 Messung und Auswertung von Faltungskinetiken	39
2.10 Langmuir-Filmwaagemessungen.....	42
2.11 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	44
2.12 Liposomen- und Bicellpräparation	45
2.13 Transmissionselektronenmikroskopie.....	46
2.14 Analytische Ultrazentrifugation	46
2.15 NMR-Spektroskopie	47
3 Ergebnisse.....	51
3.1 Charakterisierung der Faltung von N-BAR	51
3.1.1 Thermodynamische Stabilität von N-BAR	51
3.1.2 Kinetische Faltungsphasen von N-BAR.....	53
3.1.2.1 Beobachtbare Rück- und Entfaltungsphasen von N-BAR.....	53
3.1.2.2 Harnstoffabhängigkeit der CD-basierten Faltungsphasen	56
3.1.2.3 Harnstoffabhängigkeit der fluoreszenz-basierten Faltungsphasen	57
3.1.2.4 Untersuchung der Natriumchloridkonzentrations- und Temperaturabhängigkeit der langsamsten Rückfaltungsphase.....	59
3.1.2.5 Thermodynamische und kinetische Charakterisierung der N-BAR- Prolinmutante P95S	60
3.1.3 Doppelsprungexperimente zur Charakterisierung der kinetischen Faltungsphasen und Zuordnung zu Faltungsereignissen.....	62
3.1.3.1 Bildung von nativem Protein während der Rückfaltung	62
3.1.3.2 Charakterisierung des Faltungsvorgangs unabhängig von der langsamen Rückfaltungsphase	66
3.1.3.3 Doppelsprungexperimente zur Untersuchung des Entfaltungsvorgangs	68
3.1.3.4 Untersuchung des Faltungs- und Entfaltungsvorgangs mittels Fluoreszenzanisotropie.....	70
3.1.4 Zusammenfassende Diskussion.....	71
3.2 Thermodynamische und kinetische Charakterisierung weiterer N-BAR-Varianten und der SH3- Domäne	77

3.2.1 Charakterisierung von N-BAR(1-286)	77
3.2.2 Charakterisierung der AmphII/Bin1 SH3-Domäne	80
3.2.3 Zusammenfassende Diskussion.....	81
3.3 Untersuchungen zur Membranbindung und Interaktion zu SH3.....	83
3.3.1 Helixinduktion der Helix0	83
3.3.2 Lipidzusammensetzung und Tubulierung von N-BAR an SUVs	87
3.3.3 Interaktion zwischen N-BAR und der SH3-Domäne	92
3.3.4 Zusammenfassende Diskussion.....	97
4 Zusammenfassung	103
5 Summary	105
6 Weitere wissenschaftliche Ergebnisse.....	106
6.1 Einfluss der Prolin-Alanin Substitution auf die Stabilität und Rückfaltung von Onconase.....	106
6.2 Etablierung eines Reinigungsprotokolls für das AmphiphysinII/Bin1-Protein	107
7 Literaturverzeichnis.....	108
8 Anhang.....	118
8.1 Abbildungen	118
8.2 Tabellen	124
8.3 Pulssequenzen.....	129
9 Eigene Publikationen.....	145
10 Lebenslauf.....	147
11 Eidesstattliche Erklärung	149
12 Danksagung.....	150

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicilin
AS	Aminosäure
BAR	Bin, Amphiphysin, Rvs
bp	Basenpaar
bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration
CD	Zirkulardichroismus
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppeltentionisiertes Wasser
$\Delta\delta_{MW}$	mittlere Änderung der chemischen Verschiebung
ΔG_u^0	freie Stabilisierungsenthalpie in Abwesenheit von Denaturanzmitteln
Δn	Differenz der Brechungsindices
d	Schichtdicke der Küvette
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPS	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoserin
DTT	Dithiothreitol
dYT	double yeast trypton
ε	molarer Extinktionskoeffizient
E_A	Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
hNOE	heteronuklearer NOE-Effekt
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
I	intermediärer Zustand
IPTG	sopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie

K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
k_f, k_u	Intrinsische Geschwindigkeitskonstante der Rück- bzw. Entfaltung
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
m	Kooperativitätsparameter
min	Minute
min.	mindestens
N	native Zustand
n	Stöchiometrie
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement spectroscopy</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>protein data bank</i>
PPIase	Peptidyl-prolyl- <i>cis/trans</i> -isomerase
ppm	<i>parts per million</i>
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
SUV	<i>small unimolecular vesicel</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	entfaltete Zustand
u.a.	und andere
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
WATERGATE	<i>water supression by gradient-taylorred excitation</i>
(w/v)	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

Für Aminosäure wurde der übliche Ein- bzw. Dreibuchstabencode verwendet. Aminosäuren die N-terminal zu einer Aminosäure positioniert sind, wurden als Vorgängeraminosäuren bezeichnet.

1 Einleitung

Proteine sind die vielfältigsten Biomoleküle die es in der Natur gibt. Sie bestehen aus einer Abfolge von Aminosäuren, welche in der DNA codiert ist. Diese Aminosäureabfolge ist in der Lage, sich spontan in eine spezifische, funktionelle dreidimensionale Struktur zu falten. Dieser Faltungsprozess ist eine zentrale Fragestellung in der Wissenschaft. Trotz intensiver Forschung in den letzten 50 Jahren ist das Proteinfaltungsproblem noch an vielen Punkten unverstanden. Die Kenntnis, wie ein Protein seine native Struktur findet, ist nicht nur von theoretischem Interesse, sondern beinhaltet auch viele praktische Anwendungen in der Biotechnologie und Medizin. Die große Frage welche man versucht zu beantworten ist, ob es einen Faltungscode gibt. Die genaue Kenntnis dieses Codes würde den Informationsgewinn aus der bekannten DNA-Sequenz vieler Organismen erheblich erhöhen. Mit diesen Informationen kann eine Struktur aus der Aminosäuresequenz vorhergesagt werden. Jedoch ist die Faltung ein sehr spezifischer Prozess. Folgendes Beispiel soll dies verdeutlichen: Im humanen Genom sind etwa 100000 Proteine codiert. Jedes dieser Proteine besitzt eine eigene Aminosäureabfolge, eine eigene Struktur und einen eigenen Faltungsweg. Zwar lassen sich die Proteine in etwa 1000 verschiedene Strukturarchitekturen einordnen, jedoch muss jedes Protein in der Lage sein, schnell und effizient seine native Struktur zu finden. Dadurch gestaltet sich die Suche nach dem Faltungscode als sehr schwierig, da hierfür eine molekulare Auflösung des Faltungsweges erforderlich ist. Im Gegensatz dazu lassen sich kinetische Faltungsstudien mit geringer Auflösung recht einfach durchführen und auswerten. Die Grundlage jedes dieser Experimente basiert darauf, dass sich Proteine durch Zugabe von Denaturierungsmitteln (Harnstoff oder Guanidiniumchlorid) entfalten und bei Entfernung bzw. Verdünnung des Denaturierungsmittels wieder allein in ihre native Struktur zurückfalten¹. Mit Hilfe dieser Experimente konnten viele grundlegende Erkenntnisse über die thermodynamische Stabilität, also der energetische Unterschied zwischen dem nativen und entfalteten Zustand, sowie die grundlegenden Mechanismen der Faltungswege vieler Proteine hervorgebracht werden.

1.1 Das Proteinfaltungsproblem

Die meisten biologischen Funktionen (Stoffwechsel, Signal- und Informationsweiterleitung, Genregulation, Immunreaktionen u.a.) sind an Proteine gekoppelt. Die Funktion eines Proteins ist abhängig von seiner dreidimensionalen Struktur, wobei ein Verlust oder eine Veränderung dieser Struktur auch zu einem Funktionsverlust führen kann. Die Stabilität dieser Struktur wird hauptsächlich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie van-der-Waals- und ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und den hydrophoben Effekt bestimmt². Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins kann durch verschiedene Methoden, hauptsächlich durch Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie, ferner auch durch

Einleitung

Röntgenkleinwinkelstreuung oder cryo-EM erfolgen. Die Kenntnis der Struktur eines Proteins beantwortet aber nicht die Frage, wie diese dreidimensionale Struktur erreicht bzw. gebildet wird. Diese Frage wird als Proteinfaltungsproblem bezeichnet, aus der drei zentrale Fragestellungen hervorgegangen sind, die versuchen Antworten auf diese Fragen zu finden³. (1) Welche thermodynamischen Parameter bzw. Einflüsse bestimmen die Struktur eines Proteins? (2) Kann eine Struktur aus ihrer Aminosäuresequenz vorhergesagt werden? (3) Gibt es bestimmte Mechanismen bzw. Faltungswege für eine Aminosäuresequenz, um schnell ihre Struktur zu erreichen?

1.1.1 Proteinstabilität

Die Struktur eines Proteins kann durch äußere Einflüsse wie Temperatur, chemische Agenzien oder Druck soweit verändert werden, dass es zur Entfaltung und damit zum Verlust der dreidimensionalen Struktur kommt. Hierbei werden die meisten nicht-kovalenten Wechselwirkungen aufgehoben. Prinzipiell muss zwischen der chemischen Stabilität der kovalenten Bindung und der konformationellen Stabilität des nativen Zustands unterschieden werden. Im Nachfolgenden ist immer die konformationelle Stabilität gemeint. Die Stabilität des nativen Zustandes ist gegenüber dem entfalteten Zustand nur marginal höher (etwa 20-60 kJ/mol)⁴, wobei die freie Stabilisierungsenthalpie unabhängig von der Art der Entfaltung ist. Somit stellen die äußeren Bedingungen immer die Balance zwischen dem nativen und entfalteten Zustand ein. Alle intra- und intermolekularen Wechselwirkungen haben eine sehr geringe Energie und tragen erst in ihrer großen Anzahl die Gesamtstabilität des nativen gegenüber dem entfalteten Zustand. Der entfaltete Zustand ist kein hoch geordneter Zustand wie die native Struktur und zeigt ein Verhalten ähnlich dem eines *random coil*. Somit stellt er ein Ensemble aus Zuständen mit einer ähnlichen Energie dar, die alle in einem schnellen Gleichgewicht vorliegen^{5, 6}. Mit verschiedenen biophysikalischen Methoden, hauptsächlich mit verschiedenen NMR-Methoden, aber auch mit Circular dichroismus bzw. kalorimetrischen Methoden, konnten einige Reststrukturen nachgewiesen werden⁷⁻¹⁰. Trotz der Reststrukturen besitzt der entfaltete Zustand eine hohe Flexibilität und eine große konformationelle Freiheit. Dadurch besitzt der entfaltete Zustand auch eine hohe Konformationsentropie. Der native Zustand ist im Vergleich ein hoch geordneter Zustand und besitzt somit eine niedrige Entropie. Bei der Faltung eines Proteins verliert es erheblich an Entropie, was durch die Enthalpie ausgeglichen werden muss, damit die freie Enthalpie (Gibbs-Enthalpie) negativ ist und ein freiwilliger Faltungsprozess sichergestellt wird. Der Faltungsvorgang besitzt somit hohe negative Enthalpie- und Entropiewerte. Die freie Enthalpie setzt sich aber nicht nur aus Enthalpie- und Entropiewerten der Aminosäurekette zusammen, sondern es müssen auch die Einflüsse zum Lösungsmittel berücksichtigt werden^{11, 12}. Im entfalteten Zustand bilden die Wassermoleküle um die exponierten hydrophoben Reste eine Gitterstruktur, da sie keine Wasserstoffbrückenbindung mit den hydrophoben Resten

ausbilden können. Dies führt zu einer Entropieerniedrigung dieser Wassermoleküle. Exponierte hydrophile Aminosäuren können mit den Wassermolekülen interagieren, da ihre Interaktionspartner aus der Sekundärstruktur fehlen, was zusätzlich zu einer Ordnung der Wassermoleküle und einer damit verbundenen Erniedrigung der Entropie der Wassermoleküle führt¹³. Bei der Faltung gehen ein Großteil diese Wechselwirkungen zwischen den exponierten Aminosäuren und den Wassermolekülen verloren. Dies führt zu einem Entropiegewinn der Wassermoleküle, der den Verlust der Konformationsentropie mit ausgleichen kann. Hierbei ist aber zu beachten, dass diese Prozesse temperaturabhängig sind, da die Enthalpie und Entropie über die Änderung in der spezifischen Wärmekapazität eine Funktion der Temperatur darstellen. Damit ist auch die freie Gibbs-Enthalpie eine Funktion der Temperatur. Das Stabilitätsprofil eines Proteins über die Temperatur ist in aller Regel eine Parabel, in der es zwei Entfaltungsbereiche gibt: einen bei hohen Temperaturen und einen bei niedrigen Temperaturen. Das Stabilitätsmaximum muss hierbei nicht zwangsläufig bei der physiologischen Temperatur liegen. Die experimentell ermittelte thermodynamische Stabilität eines Proteins unter Standardbedingungen muss unabhängig von der Art der Denaturierung sein. Die meisten Faltungsprozesse sind sehr kooperativ. Die Ursache hierfür liegt darin, dass alle nativen Wechselwirkungen gleichzeitig gebildet werden, da nur so der Entropieverlust ausgeglichen werden kann. Die Kooperativität des Faltungsprozesses wird durch den m -Wert zum Ausdruck gebracht. Dieser beschreibt die Oberflächenzugänglichkeit des Lösungsmittels, was bedeutet, dass z.B. ein niedriger m -Wert gleichzusetzen ist, mit einem geringen Unterschied in der Lösungsmittelzugänglichkeit zwischen dem entfalteten und nativen Zustand. Entsprechend bedeutet ein hoher m -Wert einen großen Unterschied in der Lösungsmittelzugänglichkeit beider Zustände. Die Stabilität eines Proteins ist aber nur garantiert, wenn unter physiologischen Bedingungen die Faltung favorisiert ist. Dies führt zu der Frage, ob der native Zustand thermodynamisch oder kinetisch stabil ist¹⁴. Die thermodynamische Stabilität stellt immer den Energieunterschied zwischen dem nativen und entfalteten Zustand dar (wie bereits oben erwähnt). Die kinetische Stabilität basiert auf der Aktivierungsenergie meist der Entfaltungsreaktion. Dies bedeutet, dass eine hohe Aktivierungsenergie eine langsame Geschwindigkeitskonstante zur Folge hat und damit die Geschwindigkeit der Entfaltung gering ist. In diesem Fall wäre der native Zustand kinetisch stabil. Da eine Zelle sehr komplex ist, können an einem Protein immer irreversible Veränderungen (posttranslationale Modifikationen, proteolytischer Abbau, Aggregation) auftreten. Diese stellen eine irreversible Folgereaktion dar, wodurch Moleküle aus dem Gleichgewicht zwischen dem nativen und entfalteten Zustand entzogen werden (Lumry-Eyring Modell)¹⁵. Auf Basis dieses Modells bedeutet dies, dass ein Protein auch einen stabileren nicht-funktionellen Endzustand erreichen kann und in diesem festgesetzt ist. Dadurch kann es auch zu keiner Gleichgewichtseinstellung mehr kommen, was zu einer Abnahme des nativen Zustands führt. Die Energiebarriere zwischen dem nativen und

Einleitung

entfalteten Zustand muss demnach groß genug sein, damit die Entfaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. In diesem Fall ist der native Zustand kinetisch stabil und wird nur durch die Aktivierungsenergie der Entfaltung bestimmt¹⁶. Damit zeigt sich, dass thermodynamische Stabilität allein keine Garantie für eine stabile, native Struktur auf einer biologisch relevanten Zeitskala bildet. Viele Proteine besitzen somit einen gewissen Grad an kinetischer Stabilität, um ihre Funktion aufrecht zu erhalten. Die kinetische Stabilität kann damit auch die Voraussetzung für die evolutionäre Optimierung von Proteinstrukturen sein und auch als *timer* für biologische Prozesse verwendet werden¹⁷.

Die thermodynamischen Parameter lassen sich durch Gleichgewichtsübergänge bestimmen. Die Voraussetzung hierfür ist aber, dass die Faltung und Entfaltung reversibel ist, ein Unterschied in den spektroskopischen Eigenschaften des nativen und entfalteten Zustandes besteht und dass beide Konformationen unter messbaren Denaturationskonzentrationen bzw. Temperaturen vorliegen. Wenn dies der Fall ist, kann die freie Gibbs-Enthalpie bei jeder Denaturationskonzentration bzw. Temperatur aus dem der Gleichgewichtskonstante K_D errechnet werden. Eine lineare Extrapolation von $\ln K_D$ des Gleichgewichtsübergangsbereiches gegen die Denaturationskonzentration liefert die freie Gibbs-Enthalpie in Abwesenheit des Denaturans¹⁸. Die Extrapolation kann graphisch oder mittels nicht-linearer Regression erfolgen¹⁹.

1.1.2 Faltungswege und Energielandschaften

Die entscheidende Voraussetzung aller Faltungsstudien formulierte Anfinsen Anfang der sechziger Jahre, dass ein Protein spontan und reversibel in einen thermodynamisch stabilen Zustand falten kann^{1; 20}. Anfinsen postulierte aus seinen Experimenten, dass allein die Aminosäurekette die notwendigen Informationen für die native Struktur enthält. Mit zunehmender Größe des Proteins steigt auch die Anzahl theoretisch möglicher Konformationen, die die Aminosäurekette einnehmen kann. Dabei ergibt sich folgende Frage: Wie erreicht ein Protein seinen nativen Zustand auf einer biologisch relevanten Zeitskala? Eine zufällige Suche durch alle möglichen Konformationen scheint sehr unwahrscheinlich zu sein, wie Levinthal bereits 1968 formulierte²¹. Eine zufällige Suche der nativen Struktur bei einem Protein mit 100 Aminosäuren, wobei jede Aminosäure nur zwei mögliche Konformationen einnehmen kann, würde bei einer zufälligen Suche etwa 10^{10} Jahre dauern. Ein „reales“ Protein besitzt jedoch noch zusätzlich mehrere Freiheitsgrade, sowohl im Rückgrat als auch in den Seitenketten. Dies führt eher zu einer kinetischen Kontrolle der Faltung und zu einem Faltungsweg, damit das Protein schnell seine native Struktur erreichen kann. Während der Faltung können somit partiell gefaltete Zustände (Intermediate) auftreten, die eine drastische Reduzierung möglicher Konformationen bewirken und energetisch ungünstige Konformationen von vornherein ausschließen²²⁻²⁴. Damit führen sie auch zu einer Beschleunigung der Gesamtreaktion²⁵. Somit erfolgt

die Bildung der nativen Struktur in einer hierarchischen Reihenfolge, vom entfalteten Zustand über intermediäre Zustände zur nativen Struktur²⁶. Intermediate konnten bereits innerhalb vieler Faltungsstudien nachgewiesen werden²⁷⁻³³.

Für die Suche und Analyse von Intermediaten während des Faltungsprozesses stehen thermodynamische und kinetische Untersuchungen im Vordergrund. Die Kinetik einer Proteinfaltungsreaktion läuft in der Regel im Bereich von Millisekunden bis Minuten ab. Meist wird hier eine schnelle Mischtechnik (hauptsächlich *stopped-flow*) mit einer spektroskopischen Methode (Fluoreszenz, Circular dichroismus) kombiniert^{34; 35}. Die Totzeit dieser Technik liegt im Bereich von 1-10 Millisekunden. Intermediate, die während dieser Totzeit entstehen, können zwar nachgewiesen, aber schlecht charakterisiert werden³⁶. Die meisten detektierbaren Intermediate besitzen einen erhöhten Sekundärstrukturanteil, wobei die Kontakte innerhalb der Seitenketten nur schwach ausgebildet sind. Erst anschließend erfolgt die Ausbildung geordneterer Strukturen. In den meisten untersuchten Fällen ist die Bildung des Intermediates sehr schnell im Vergleich zur Bildung der nativen Struktur aus dem Intermediat. Damit kommt es zu einer Akkumulation des Intermediates. Der letzte Faltungsschritt ist dadurch geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion. Nur in wenigen Fällen ist dies auch umgekehrt möglich, bei der die Ausbildung des Intermediates geschwindigkeitsbestimmend ist³⁷. Die Faltung des nativen Zustandes erfolgt dann sehr viel schneller. Die Detektion von Intermediaten ist an verschiedene Voraussetzungen gebunden: erstens, sie müssen einen spektroskopischen Unterschied zu der nativen und entfalteten Konformation aufweisen und zweitens, sie müssen ausreichend populiert werden, was bedeutet, dass sie schneller gebildet werden müssen, als sie durch die Nachfolgereaktion wieder zerfallen. Die beobachteten Phasen werden als makroskopische Faltungsphasen bezeichnet. Diese bestehen meist aus mehreren nicht unterscheidbaren mikroskopischen Faltungsphasen und werden zu dieser einen Reaktion zusammengefasst. Erst wenn sich diese mikroskopischen Faltungsphasen genügend in ihrer Geschwindigkeit und spektroskopischen Eigenschaften unterscheiden, können mehrere Faltungsphasen beobachtet werden. Die Anzahl der beobachteten makroskopischen Phasen gibt demnach wieder, wie viele Zustände während der Faltungsreaktion *unterschieden* werden können und wie viele Zustände insgesamt während des Faltungsprozesses detektiert werden. Das Ziel ist es, hierbei einen eindeutigen Faltungsweg beschreiben zu können, wobei alternative Faltungswege nicht immer ausgeschlossen werden können.

Häufig detektierbare Intermediate liegen auf dem Faltungsweg des Proteins vom entfalteten zum nativen Zustand (*on-pathway* Intermediat). Es kann aber auch möglich sein, dass die intermediäre Struktur einen „unproduktiven“ Zustand darstellt und nicht auf dem Faltungsweg des Proteins liegt (*off-pathway* Intermediat)^{38; 39}. Es existieren aber auch Faltungsstudien, in denen keine Faltungsintermediate nachgewiesen werden konnten^{40; 41}. Demnach sind nur der entfaltete und

Einleitung

native Zustand nachweisbar. In diesen Fällen spricht man vom Zweizustandsmodell. Folgende Bedingungen müssen erfüllt sein, damit ein Protein nach dem Zweizustandsmodell faltet⁴¹: (i) alle beobachtbaren Reaktion für die Rück- und Entfaltung sind monophasisch, (ii) es lassen sich auch keine Intermediate in der Totzeit des *stopped-flow*-Experiments nachweisen und (iii) das Verhalten ist konsistent bei verschiedenen spektroskopischen Methoden. Wenn dies der Fall ist, kann man davon ausgehen, dass es sich um ein wirkliches Zweizustandsmodell handelt. Somit kann man die Frage stellen, ob Intermediate obligatorisch sind oder nicht. Es konnte auch schon gezeigt werden, dass Intermediate durch den Austausch einzelner Aminosäuren bzw. durch die Veränderung in den Faltungsbedingungen stabilisiert werden können^{42; 43}. Das bedeutet, dass ein Zweizustandsmodell in ein Dreizustandsmodell übergeht und umgekehrt. Somit ist die Bildung von Intermediaten sowohl von den äußeren Bedingungen (wie Lösungsmittel, pH-Wert, Temperatur, ferner auch Membranen und Bindungspartner) als auch von der Art der Detektion abhängig. Hierbei ist es aber schwierig festzustellen, ob ein stabilisiertes oder destabilisiertes Intermediat auch wirklich auf dem Faltungsweg liegt oder nicht ein Zustand stabilisiert wurde, der eher auf einem versteckten Faltungsweg liegt und nun den hauptsächlichen Faltungsweg beschreibt. Nicht immer sind intermediäre Zustände reine Faltungsereignisse, sondern können auch durchaus eine biologische Funktion besitzen. In den Studien zum Gen-3-Protein des Phagen fd, welches an der Infektion von *E.coli* beteiligt ist, konnte gezeigt werden, dass eine intermediäre Struktur die Voraussetzung für die Infektion darstellt. Mit zunehmender Rückfaltungszeit nimmt die Infektiosität des Phagen ab^{44; 45}.

Es existieren sehr viele Untersuchungen an monomeren Proteinen, die viele grundlegende Kenntnisse zum Faltungsprozess lieferten. Der prozentuale Anteil an monomeren Proteinen im Organismus ist allerdings sehr viel geringer als dimere bzw. oligomere Proteine⁴⁶. Bei der Faltung eines dimeren Proteins findet neben dem eigentlichen Faltungsprozess ein zusätzlicher Assoziationsschritt der einzelnen Monomere statt. Dieser Assoziationsschritt kann zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Faltung stattfinden: (i) bei einem dimeren Zweizustandsfalter findet die Faltung und Assoziation simultan statt, somit sind nur entfaltete Monomere und native Dimere nachweisbar. Dieses Faltungsverhalten konnte hauptsächlich bei kleinen dimeren Proteinen, wie dem Arc Repressor, ORF56 oder hPyA1 nachgewiesen werden⁴⁷⁻⁴⁹. (ii) Beide Monomere bilden zuerst getrennt voneinander eine intermediäre Struktur. Nur diese intermediäre Struktur ist in der Lage zu assoziieren und ein Dimer zu bilden. Demnach können bei diesem Faltungsverhalten monomere Intermediate nachgewiesen werden. Sowohl die E2-Domäne als auch die Triosephosphatisomerase falten nach diesem Modell^{50; 51}. (iii) Die entfalteten Monomere assoziieren sehr schnell zu einem dimeren Intermediat, welches anschließend zur nativen Struktur weiterfaltet. Dieses Verhalten konnte an FIS bzw. am Histon H2A/H2B nachgewiesen werden^{52; 53}. Die hier erwähnten Studien zeigen alle ein Zwei- bzw. Dreizustandsverhalten. Bei wenigen untersuchten

Proteinen konnten die gemessenen Daten nicht mit diesen Modellen erklärt werden^{54; 55}. Bei den Faltungsstudien zu YibK aus *Haemophilus influenza* wurde ein sehr komplexes Faltungsverhalten nachgewiesen. Das vorgeschlagene Faltungsmodell zeigte zwei verschiedene parallele Wege die abhängig von der Prolylkonformation waren⁵⁶. Ebenso lassen sich bei verschiedenen dimeren Antikörperfragmenten die Kinetiken nicht immer über einfache Faltungswege beschreiben, sondern beinhalten auch oft zusätzlich eine prolinabhängige Assoziation der Monomere^{57; 58}. Dies zeigt auch, dass mit Zunahme der an der Faltungsreaktion beteiligten Moleküle der Gesamtprozess sehr viel komplexer werden kann.

Die Komplexität des Faltungsprozesses und die große Anzahl der sich neu bildenden nichtkovalenten Kontakte führten zu einer neuen Sichtweise auf den Faltungsprozess⁵⁹. Wie bereits oben erwähnt, ist der entfaltet Zustand ein Ensemble verschiedenster Konformationen. Dadurch ist selbst bei einem Zweizustandsfalter der Faltungsweg aus jeder dieser Startkonformationen ein individueller Faltungsweg zu einer homogenen Struktur. Ein monoexponentieller Faltungsverlauf, wie er bei den meisten Proteinen die nach einem Zweizustandsmodell falten zu finden ist, ist demnach eigentlich ein Ensemble vieler paralleler Faltungswege⁶⁰. Diese Sichtweise führte zu dem Modell des Faltungstrichters, welcher eine Energielandschaft verschiedenster Konformationen beschreibt (Abb. 1-1). Diese Energielandschaft ist eine Darstellung, in der die freie Energie über jede mögliche Konformation bzw. Freiheitsgrade dargestellt wird. Somit stellt jede mögliche Konformation einen Punkt auf der Energielandschaft dar. Die vertikale Achse beschreibt hierbei die freie Enthalpie, alle horizontalen Achsen stellen die Konformationskoordinaten aller kovalenten und nichtkovalenten Bindungen dar. Somit stellen Hügel Hochenergiekonformationen und Täler Konformationen dar, die mehr favorisiert sind als andere. Die Form eines Faltungstrichters ist in der Aminosäurekette codiert. Während des eigentlichen Faltungsprozesses verändert das Protein seine Konformation in der Weise, damit die freie Enthalpie schnell und effizient erheblich reduziert werden kann. Faltungsschritte, welche eine Erhöhung der freien Enthalpie erfordern, sind recht selten. Die einzelnen Faltungswege besitzen auch unterschiedliche kinetische und thermodynamische Barrieren. An einzelnen Stellen können somit auch detektierbare Intermediate auftreten. Mit dieser Sichtweise verändert sich auch die Bedeutung von *on-* und *off-pathway* Intermediaten. Außerdem gibt es mit dieser Sichtweise einen grundlegenden Unterscheid zwischen Faltungsweg und Faltungstrichter. Der Faltungsweg ist immer eine eindimensionale Route, wobei jeder Faltungszustand eine genau definierte Konformation aufweist. Der Faltungstrichter ist hingegen ein Ensemble verschiedener Faltungswege.

Trotz vieler Jahre intensiver Untersuchungen ist eine allgemeine Lösung für das Proteinfaltungsproblem weit entfernt⁶¹. Gegenwärtig fokussiert sich die Forschung weniger auf kinetische Untersuchungen, sondern mehr auf ein detailliertes physikalisches Verständnis, wobei hauptsächlich molekulare Simulationen und erweiterte experimentelle Methoden verwendet

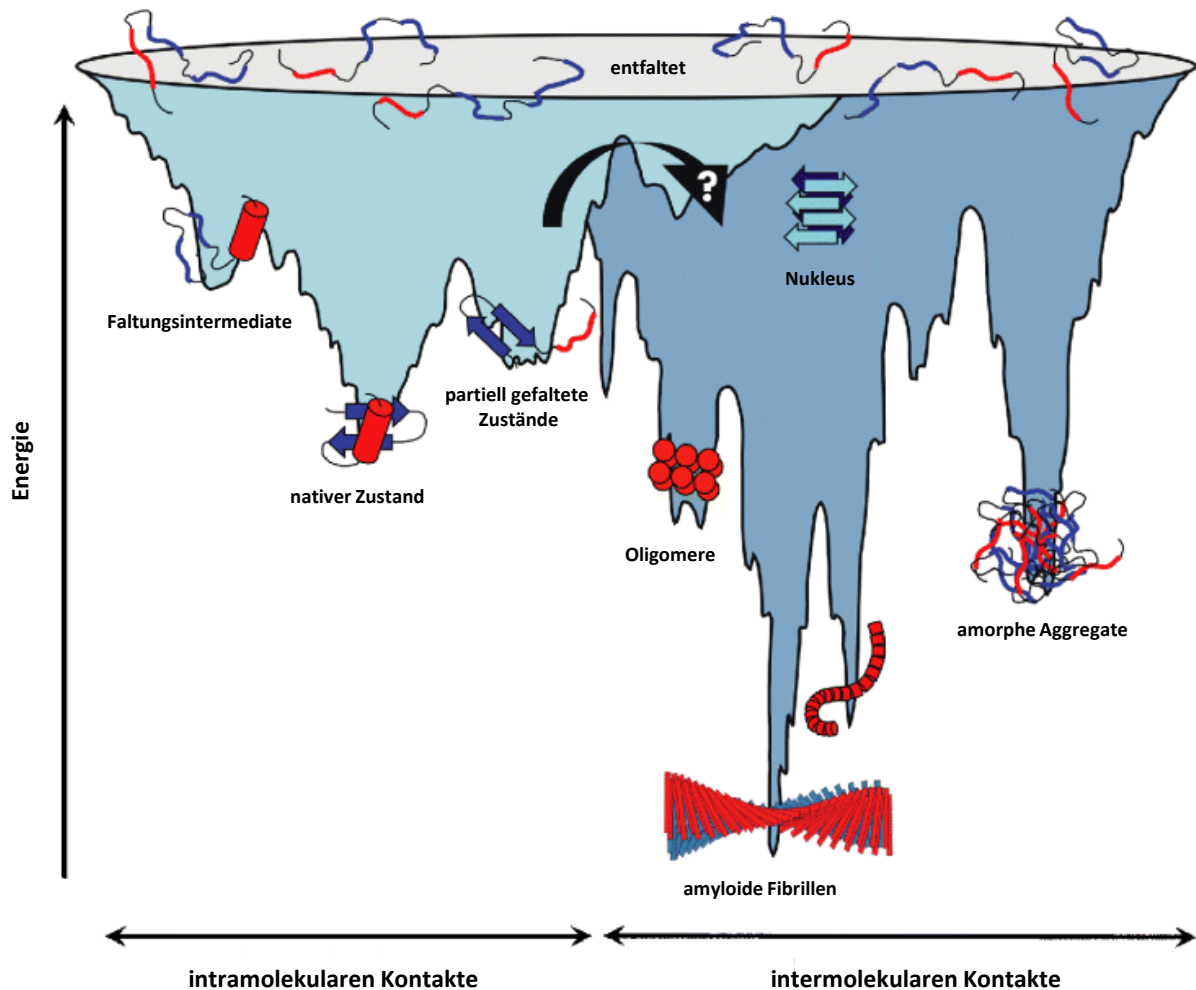


Abb. 1-1: Schematische Darstellung einer Energielandschaft für den Faltungsprozess und den Aggregations- bzw. Fehlfaltungsprozess.

Die Oberflächenbereiche der entfaltenen Polypeptidkette bei hoher Energie sind grau markiert. Der Faltungstrichter, welcher zur nativen und biologisch funktionellen Struktur führt, ist hellblau gekennzeichnet, während der dunkelblaue Bereich in Richtung amyloide Fibrillen geht. Der Ausgangspunkt für Fehlfaltungszustände liegt in partiiell gefalteten Zuständen des hellblauen Faltungstrichters (Abbildung wurde nach Jahn et al. 2005 modifiziert⁶²).

werden⁶³⁻⁶⁵. Das Ziel hierbei ist, das Verständnis des Faltungsprozesses durch eine Kombination verschiedener Methoden auf den Grundlagen der statistischen Physik zu verstehen. Ein weiterer Fokus ist die Etablierung von Einzelmolekülexperimenten, wie Einzelmolekülkraftspektroskopie oder Einzelmolekül-FRET⁶⁶⁻⁶⁸, in der Proteinfaltung in denen ein breites Spektrum unterschiedlicher Zeitskalen zugänglich ist, sowie die Verwendung von Triplett-Triplett-Energietransfer-Experimenten⁶⁹;⁷⁰ zur Untersuchung der Kettendynamik in entfaltenen Proteinen⁷¹ bzw. der Dynamik von Sekundärstrukturelementen auf der ps-ns Zeitskala⁷². Mit Hilfe dieser Methoden können Informationen zur Bildung von Sekundärstrukturelementen gewonnen werden, sowie der Geschwindigkeit zur Bildung der Interaktion einzelner nativer Kontakte bzw. der Fluktuationen im nativen Protein. Mit konventionellen Techniken ist diese Zeitskala zu schnell und schwierig erfassbar.

Neben den Untersuchungen zur Proteinfaltung und Dynamik einzelner Faltungszustände ist in den letzten Jahren das Interesse im Bereich der Proteinaggregation und Fehlfaltung enorm gestiegen. Der Grund hierfür liegt darin, dass viele Krankheiten mit der Ablagerung von Proteinaggregaten oder Fehlfaltungszuständen (Amyloidfibrillen) im Gewebe in Verbindung steht^{22; 73}. Zurzeit sind etwa 50 Krankheiten bekannt, die mit einer extrazellulären Ablagerung oder einem intrazellulären Einschluss von Amyloidfibrillen in Verbindung stehen⁷⁴. Die bekanntesten Beispiele hierfür sind Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Typ-II Diabetes. Eine der auffälligen, gemeinsamen Eigenschaften dieser Krankheiten ist, dass die Fibrillen in ihrer Struktur sehr ähnlich sind. Trotz der unterschiedlichen Herkunft der Proteine, ihrer nativen Struktur und Primärsequenz bilden sie alle eine *cross-β* Struktur in der die β -Faltblätter senkrecht zur Fibrillenachse angeordnet sind^{75; 76}. Der *cross* Aufbau der Fibrillen liefert eine sehr stabile Struktur aufgrund der kontinuierlichen Anordnung von Wasserstoffbrückenbindungen entlang der Fibrillenachse⁷⁷. Es gibt mittlerweile einige Beweise dafür, dass die Amyloidfibrille thermodynamisch stabiler ist als das native Protein⁷⁸. Demnach ist der fibrilläre Zustand im thermodynamischen Gleichgewicht mehr favorisiert als der native Zustand. Durch die schnelle Faltung der Proteine werden Faltungszustände gebildet, die einen Ausgangspunkt für Fehlfaltungsreaktionen und damit auch in der Ausbildung von intermolekularen Interaktionen darstellen. Die Ursache dafür, dass die Bildung des nativen Zustandes trotzdem sehr stark gegenüber der Fibrillierung abgegrenzt ist, ist noch nicht geklärt. Die Evolution scheint jedoch den Faltungstrichter der Faltung und Fibrillierung so geformt zu haben, dass der native Zustand kinetisch eingefangen ist und die Barriere zur Fibrillierung thermodynamisch sehr hoch ist^{79; 80}. Zudem spielen auch Chaperone eine entscheidende Rolle in der Beschleunigung der Faltungsreaktion und einem glätten des Faltungstrichters zur nativen Struktur, damit fibrillierungsanfällige Intermediate zur nativen Struktur geleitet werden^{81; 82}. Zudem gibt es für die Bildung von Fibrillen eine kritische Konzentration, die in aller Regel viel höher ist, als die physiologische Konzentration. Dies erweitert die kinetische Unzugänglichkeit der Bildung von Fibrillen aus dem nativen Zustand bzw. aus intermediären Faltungszuständen.

1.1.3 Die Prolinisomerisierung als spezielle Faltungsreaktion

Die Peptidbindung ist aufgrund ihres Doppelbindungscharakters planar. Demnach können die flankierenden Kohlenstoffatome jeder Peptidbindung in der *cis*- oder *trans*- Konformation vorliegen, wobei aber die *trans*-Konformation gegenüber der *cis*- Konformation energetisch favorisiert ist. Dies trifft sowohl im nativen als auch im entfalteten Zustand zu. Als Folge liegen etwa 99% aller Peptidbindungen im nativen bzw. im entfalteten Zustand in der *trans*-Konformation vor⁸³⁻⁸⁵. Im Gegensatz hierzu ist die Energiedifferenz zwischen beiden Konformationen in Prolinbindungen (Xaa-Pro) sehr viel geringer, da innerhalb beider Konformationen das C α -Atom des N-terminal positio-



Abb.1-2: *cis/trans*-Isomerisierung einer Xaa-Pro-Peptidbindung.

nier Aminosäurerestes zum Prolin in jeder Konformation mit dem C_α- oder C_δ-Atom des Prolins räumlich nahe gelegen ist (Abb. 1-2). Somit ist die *trans*- Konformation nur wenig über der *cis*-Konformation favorisiert. Dies führt dazu, dass in nativen Strukturen eine oder mehrere Peptidylprolyl-Bindungen in der *cis*-Konformation vorhanden sein können (etwa 7%) und dass im entfalteten Zustand ein Gleichgewicht zwischen der *cis*- und *trans*-Konformation vorliegt. Das *cis/trans*-Verhältnis wird hierbei maßgeblich durch die zum Prolin N-terminal positionierten Aminosäure bestimmt⁸⁶. Demnach liegen im entfalteten Zustand etwa 5-35% aller Peptidylprolyl-Bindungen in der *cis*-Konformation vor. Das Vorhandensein eines *cis/trans*-Gleichgewichtes im entfalteten Zustand führt zur Existenz langsamer faltender Spezies^{87; 88}. Die Isomerisierung der nicht nativen Peptidylprolyl-Bindungen in die native Konformation entspricht einer Rotation um eine partielle Doppelbindung und besitzt eine freie Aktivierungsenthalpie von etwa 85 kJ/mol und eine Aktivierungsentropie nahe null, da in aller Regel keine Änderungen oder Neuorientierungen im umgebenden Lösungsmittel stattfindet⁸⁹.

Ursprünglich ging man davon aus, dass die Prolylisomerisierung alle folgenden Faltungsschritte blockiert und damit zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Faltung wird. Es hat sich aber bei vielen Proteinen gezeigt, dass dies nicht der Fall ist und die Faltung mit einer nicht-nativen Prolinkonformation starten kann. In aller Regel entstehen hier Faltungsintermediate, die eine nicht-native Prolinkonformation erlauben⁹⁰. Damit ist der limitierende Faltungsschritt abhängig von der Prolylisomerisierung. Dies zeigt auch, dass die Faltung eines Proteins abhängig ist von der Lage des Prolins in der nativen Struktur. Demnach haben nicht-native Prolylbindungen in flexiblen Regionen keinen Einfluss auf die Strukturbildung. Die Isomerisierung erfolgt hier im nativen Zustand.

Mitte der achtziger Jahre konnte ein Enzym identifiziert werden, welches spezifisch die Prolylisomerisierung katalysiert und somit die Faltung erheblich beschleunigt (Prolylisomerasen)⁹¹. Mittlerweile wurden viele weitere Isomerasen sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten identifiziert; sie lassen sich in drei Familien einteilen: Cyclophiline, FK506-bindende Proteine und Parvuline⁹². Diese Enzyme unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität und sind dadurch in einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie posttranslationale Faltung oder Kontrolle im Zellzyklus, beteiligt⁹³. Außerdem existieren auch homologe Domänen in größeren Proteinen, welche ebenfalls eine geringe Prolylisomeraseaktivität zeigen^{94; 95}. In Proteinfaltungsstudien werden häufig Isomerasen eingesetzt,

um Prolylisomerisierungen zu beschleunigen und dadurch nachzuweisen⁹⁶⁻⁹⁸. Die Richtung der Isomerisierung ob von *cis* → *trans* oder *trans* → *cis* wird gleichermaßen beschleunigt. Außerdem können Prolylisomerasen auch autokatalytisch wirken und während der Faltung ihre eigene Isomerisierung beschleunigen⁹⁹. Der langsamste Faltungsschritt muss aber nicht zwangsweise eine Prolysiomerisierung sein^{100; 101}. Gerade bei großen Proteinen können zusätzlich langsame Konformationsänderungen bzw. Umstrukturierungen auftreten.

1.2 Die AmphiphysinII/Bin1 N-BAR-Domäne und ihre Funktion in der Membrankrümmung

1.2.1 Biologische Membranen und Möglichkeiten der Membrankrümmung

Biologische Membranen dienen als Hülle um eine Zelle und zur Kompartimentierung innerhalb einer Zelle. Die Zellmembran dient hierbei als Abgrenzung nach außen und zur Aufrechterhaltung des inneren Milieus. Die Kompartimentierung schafft zusätzliche Reaktionsräume und damit unterschiedliche Mikroumgebungen, in denen unterschiedliche biologische Prozesse stattfinden können. Sowohl zwischen den verschiedenen Kompartimenten als auch nach außen findet ein reger Stoffaustausch mithilfe von sogenannten Transportvesikeln statt. Die Transportvesikel werden aus der jeweiligen Membran gebildet und verschmelzen anschließend mit der Zielmembran. Die zu transportierenden Biomoleküle befinden sich hierbei innerhalb des Vesikels. Die Bildung eines Transportvesikels ist abhängig von einer lokalen Änderung der Membranstruktur. Die notwendige Membrankrümmung ist hierbei kein passiver Prozess, sondern ein aktiver, hochregulierter Prozess, der durch eine Vielzahl verschiedener Proteine verursacht wird.

Es werden insgesamt fünf verschiedene Mechanismen unterschieden, wie eine Membran gekrümmt werden kann. (i) Über die Änderung in der Lipidzusammensetzung der Membran kann der Krümmungsradius verändert werden. Dies beruht hauptsächlich auf Flippasen und Enzymen, welche die Kopfgruppe eines Lipides verändern und damit Änderungen in der Raumanforderung der Lipidkopfgruppen verursachen und somit auch Veränderungen in der Krümmung hervorrufen¹⁰²⁻¹⁰⁴. (ii) Die Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten können zu einer Änderung der Membranmorphologie führen¹⁰⁵. Diese Prozesse werden hauptsächlich bei der Bewegung von ein- bis wenigzelligen Eukaryoten (Pseudopodien) beobachtet und bei der Phagozytose. Die Ursache für die entstehende Membrankrümmung liegt in einer Änderung der Membranspannung, welche durch Aktin verursacht wird^{106; 107}. (iii) Eine weitere Möglichkeit besitzen Transmembranproteine, welche eine kegelförmige Struktur aufweisen. Diese Struktur wurde bei einigen Acetylcholinrezeptoren gefunden, welche zusätzlich Proteincluster bilden können und somit einen größeren Einfluss auf die lokale Krümmung haben^{108; 109}. Weiterhin kann auch eine Clusterung von nichtkegelförmigen Transmembranproteinen zu einer Krümmung aufgrund veränderter Membranspannung führen. (iv)

Periphere Membranproteine können sich gerüstartig an eine Membran anlagern und eine Membrankrümmung verursachen und stabilisieren¹¹⁰. Eine größere Rolle in dieser Kategorie spielen die BAR-Domänen, auf die weiter unten genauer eingegangen wird¹¹¹. (v) Die Insertion einer amphipathischen Helix kann ebenfalls eine Membrankrümmung erzeugen¹¹². Amphipathische Helices induzieren immer positive Membrankrümmungen und werden auch in BAR-Domänen gefunden.

1.2.2 Die BAR-Domänen-Superfamilie

Die BAR-Domäne (Bin, Amphiphysin, Rvs) wurde zuerst als eine konservierte Region in den Hefeproteinen Rvs161 und Rvs167 sowie in Amphiphysin bei Metazoen beschrieben. Mittlerweile konnten in vielen anderen Proteinen BAR-Domänen gefunden werden, die alle zur BAR-Domänen-Superfamilie zusammengefasst werden. Die meisten Proteine, welche eine BAR-Domäne enthalten, besitzen zusätzlich noch weitere Domänen für Protein-Protein-Interaktionen oder katalytische Funktionen, die notwendig sind für die Kopplung von Prozessen bei der Membrankrümmung (Abb. 1-3)¹¹³. Zurzeit werden hauptsächlich drei Familienmitglieder unterschieden, wobei die Sequenzhomologie zwischen allen Familienmitgliedern sehr gering ist^{114; 115}: klassische BAR-Domänen, F-BAR-Domänen (FCH-BAR) und I-BAR (inverse-BAR)-Domänen. 2010 wurde eine weitere BAR-Domäne, die PinkBAR-Domäne identifiziert¹¹⁶, wobei zur Zeit noch nicht eindeutig geklärt ist, ob diese BAR-Domäne zu den I-BAR-Domänen gezählt werden sollte oder als eigenständiges Familienmitglied. Die gesamte Superfamilie besteht aus dimeren Proteinen mit rein α -helikalen Sekundärstrukturelementen. Das Hauptstrukturgerüst bilden in aller Regel drei lange Helices, wobei zusätzlich kleinere flankierende Helices hinzukommen können. Somit bilden alle Mitglieder ein dimeres sechs-Helix-Bündel. Das Dimer wird hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen gebildet, wobei die Monomere entgegengesetzt orientiert sind. Alle BAR-Domänen sind an der Generierung und/oder Erkennung von Membrankrümmungen beteiligt^{117; 118}. BAR-Domänen, welche aktiv Membranen krümmen können, sind hauptsächlich an der Biogenese von tubulären Organellen und/oder der Generierung von Endozytosevesikeln bzw. anderen Transportvesikeln beteiligt. BAR-Domänen, die Membrankrümmungen nur erkennen können, spielen häufig zu späteren Zeitpunkten der Vesikelbildung eine Rolle und stabilisieren diese. Mutationen an einzelnen Aminosäuren führen häufig zum Funktionsverlust der BAR-Domäne^{111; 119}. Weiterhin besitzen alle BAR-Domänen (mit Ausnahme von PinkBAR) eine intrinsische Krümmung, wobei vermutet wird, dass diese intrinsische Krümmung einen wichtigen Beitrag zur Membrankrümmung und -erkennung liefert¹²⁰. Jedoch besitzen alle drei Familienmitglieder einen unterschiedlichen intrinsischen Krümmungsradius. N-BAR- und F-BAR-Domänen binden Membranen an ihrer konkaven Seite, während die I-BAR-Domäne mit ihrer konvexen Seite bindet. Somit besitzt die I-BAR-Domäne eine entgegengesetzte Geometrie

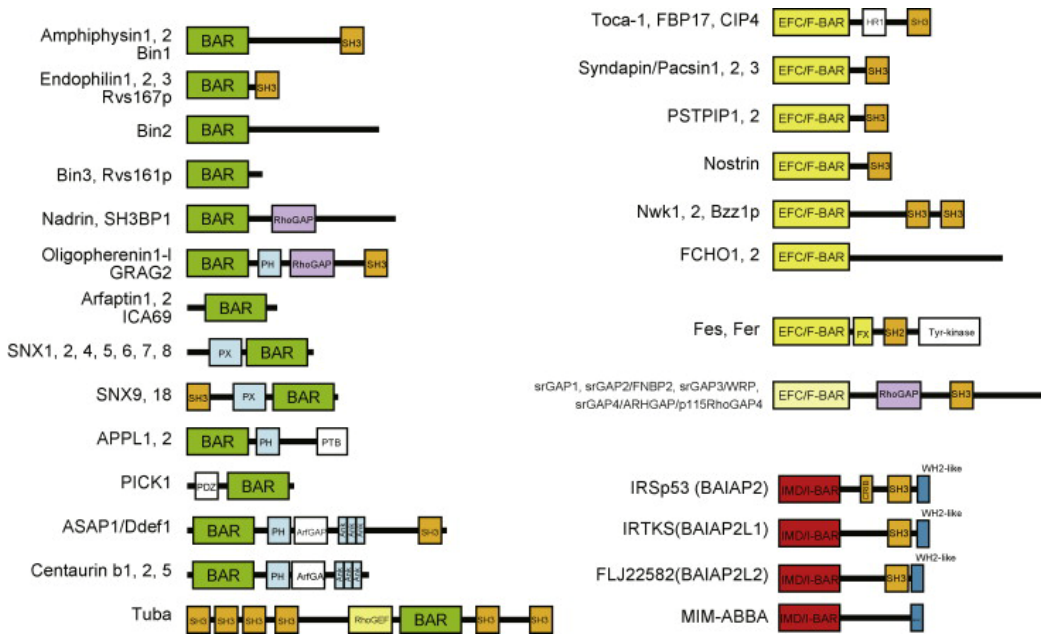


Abb. 1-3: Schematische Darstellung von Proteinen, BAR-Domänen enthaltenen.

Gezeigt ist der schematische Aufbau von verschiedenen Proteinen, welche ein Familienmitglied der BAR-Domänen enthalten. Die Abbildung wurde aus Suettsugu et al, 2010 entnommen¹¹³.

im Vergleich zu den anderen beiden Familienmitgliedern^{121; 122} (Abb. 1-4). Diese Domäne wird häufig in Filopodien und Lammellipodien (beides Formen von Pseudopodien) gefunden, wo ihre Funktion eng an Aktin gekoppelt ist und für Zellmobilität bzw. auch bei der Reifung von Neuronen verantwortlich ist. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Ausbildung von Pseudopodien durch BAR-Domänen eine Rolle bei der Tumorzellinvasion und damit in der Ausbildung von Invadopodien besitzt¹²³.

F-BAR-Domänen zeigen im Gegensatz zu den klassischen BAR-Domänen eine längere und flachere Krümmung¹²⁴. Dies resultiert in Tubuli mit größerem Durchmesser. Klassische BAR-Domänen weisen eine bananenförmige Struktur auf^{111; 125}. Innerhalb der BAR- und F-BAR-Familie besitzen einzelne Vertreter auch unterschiedliche Krümmungsradien, wodurch gewährleistet wird, dass über einen breiten Bereich Membrankrümmungen erzeugt und stabilisiert werden können¹¹⁵. Es gibt drei strukturelle Ursachen innerhalb der BAR-Domänen, welche den Krümmungsradius bestimmen: (i) der Dimerisierungswinkel der Monomere, (ii) die Länge der Armregionen und (iii) der durch Proline verursachten Abknicken der Helices.

Es werden zwei verschiedene Modelle beschrieben, wie eine BAR-Domäne eine Membran krümmen kann¹¹⁴. Der *scaffolding mechanism* beruht auf der intrinsischen Krümmung der BAR-Domäne, mit der die Membran in eine ähnliche Krümmung gezwungen wird^{111; 126}. Dieser Mechanismus ist aber an bestimmte Voraussetzungen gebunden. BAR-Domänen binden eine Membran mit ihrer konkaven Seite, welche aus lipidbindenden Aminosäuren der Armregionen besteht und Aminosäurereste der

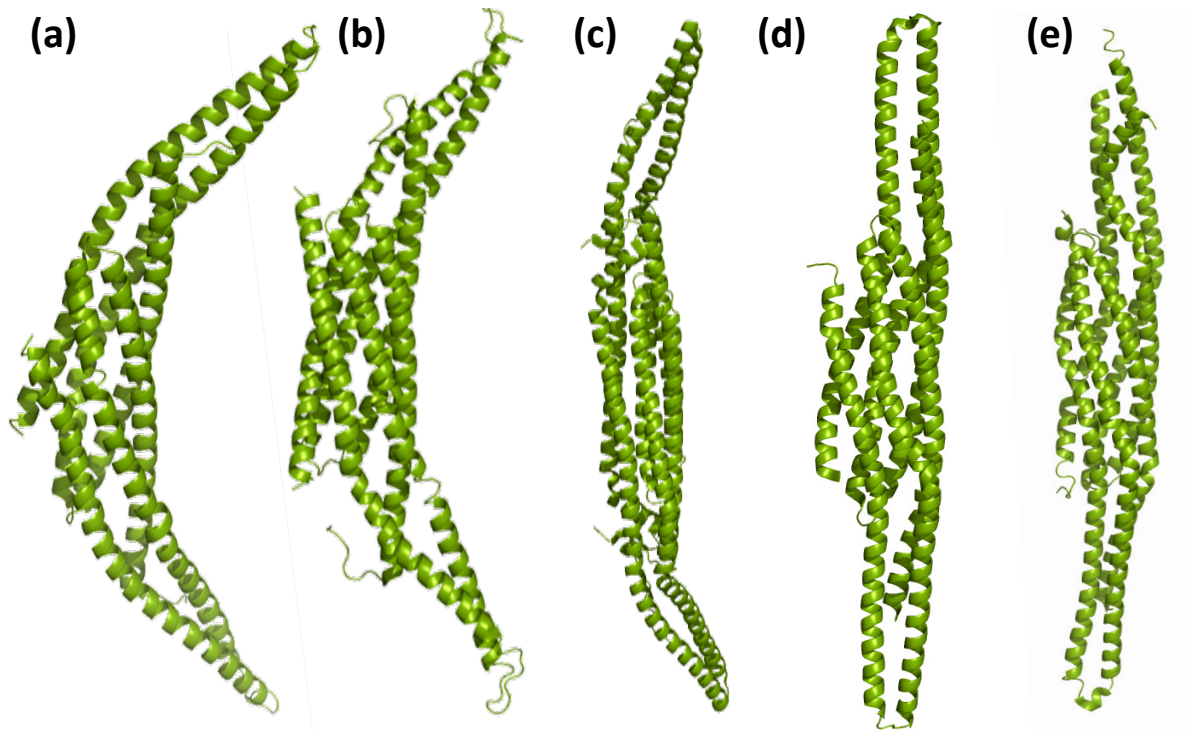


Abb.1-4: Kristallstrukturen ausgewählter Mitglieder der BAR-Domänen-Superfamilie mit unterschiedlichen Krümmungsradien.

Gezeigt ist (a) und (b) klassische BAR-Domänen mit (a) Rac-Arfaptin, (b) Endophilin-A1 N-BAR. In (c) ist FCHO2 F-BAR dargestellt. Weiterhin ist in (d) PinkBAR und (e) MIM IMD I-BAR als Vertreter der zwei weiteren Familienmitgliedern zu sehen. Alle Strukturen wurden mit Pymol erzeugt.

Helix1, welche nicht in die Dimerkontaktfläche orientiert sind. Somit wird eine definierte Membranbindefläche geschaffen, welche auch groß genug ist um eine Krümmung hervorzurufen. Weitere Voraussetzung für die Membrankrümmung sind der Dimerisierungswinkel und die Stabilität des Dimers, um eine definierte, gleichbleibende Form aufrechtzuerhalten^{124; 127}.

Der *hydrophobic insertion mechanism* beruht auf einer Insertion einer amphipathischen Helix in eine Membranhälfte^{128; 129}. Die Helixinsertion verursacht eine lokale Lipidkompression, wonach sich die Lipide neu orientieren müssen. Die energetisch günstigste Anordnung ist eine gekrümmte Membran, welche die Helix enthält. Mit diesem Mechanismus können allerdings nur Membranen mit positiver Krümmung hervorgebracht werden. Eine solche amphipathische Helix zeigt in Abwesenheit von Membranen keine Struktur und bildet in Gegenwart von Membranen oder Membrananaloga eine stabile Helix. Dies konnte durch verschiedene biophysikalische Methoden, wie fern-UV-CD-, NMR- oder EPR-Spektroskopie gezeigt werden^{117; 130}. Amphipathische Helices wurden bisher nur an klassischen BAR-Domänen identifiziert. Diese BAR-Domänen werden dann N-BAR-Domäne genannt. Eine andere Variante des *hydrophobic insertion mechanism* offenbarte die Strukturanalysen von Pacsin (einer F-BAR-Domäne): hierbei wurden von zwei *loops* mit hydrophoben Aminosäuren identifiziert, welche aus der Lipidbinderegion herausragen und dadurch in die Membran wie ein Keil inserieren können. Hierbei wird vermutet, dass diese Regionen die Membranbindung bzw. die Membrankrümmung fördern¹³¹.

Für einige BAR-Domänen konnte mit Cryo-EM gezeigt werden, dass sie auf der Membran oligomerisieren. Dies konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden^{126; 132}. Die Cryo-EM-Aufnahmen zeigen, dass die Domänen in einem helikalen, oligomeren Mantel um die gebildeten *tubes* gelagert angeordnet sind. Diese Anordnung konnte sowohl für die FBP17 F-BAR-Domäne, CIP F-BAR-Domäne als auch für die Endophilin-A1 N-BAR-Domäne gezeigt werden. Basierend auf den Cryo-EM-Aufnahmen konnten strukturelle Informationen zu den BAR-Domänen auf den Tubuli gewonnen werden. Diese zeigten eine verschiedene Anordnung von N-BAR- und F-BAR-Domänen auf der Membran. Die beiden untersuchten F-BAR-Domänen zeigten starke Seitenflächenkontakte zwischen den Dimeren sowie Kontakte zwischen den Armen von benachbarten Dimeren. Dadurch kann der Gesamtdurchmesser des Tubuli kontrolliert werden. Diese Art der Anordnung wurde in Endophilin-A1 N-BAR nicht gefunden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die amphipathische Helix am N-Terminus die notwendigen Kontakte vermittelt, die für die Gerüstbildung notwendig sind.

Aufgrund ihrer biologischen Funktion unterliegen die BAR-Domänen einer strengen Regulation. Die bekannten Regulationsmechanismen sind Autoinhibition, Phosphorylierung/Dephosphorylierung und Interaktionen mit anderen Proteinen. Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung ist ein weit verbreiteter Regulationsmechanismus in der Zelle und wurde bereits bei BAR-Domänen beschrieben¹³³. Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung fördert zusätzlich auch Interaktionen mit anderen Proteinen. Weiterhin ist auch die Interaktion mit kleinen GTPasen beschrieben worden, die für ein genaues *targeting* innerhalb von Organellmembranen verantwortlich ist^{134; 135}. Die Autoinhibition findet nur in Multidomänenproteinen statt, wobei eine zweite Domäne intramolekular die Membrantubulierungsaktivität blockiert. In allen bekannten Fällen ist eine SH3-Domäne für diese Inhibition verantwortlich, welche an die BAR-Domäne bindet und die Membrantubulierungsaktivität blockiert¹³⁶⁻¹³⁹. Erst die Dissoziation der SH3-Domäne durch einen dritten Interaktionspartner führt zur Aktivierung der BAR-Domäne.

1.2.3 Die humane AmphiphysinII/Bin1 N-BAR-Domäne

In dieser Arbeit wurde die humane AmphiphysinII/Bin1 N-BAR-Domäne untersucht (Abb. 1-5)¹⁴⁰. Sie gehört zu den klassischen BAR-Domänen und besitzt an ihrem N-Terminus eine amphipathische Helix (Helix0). Die Struktur der AmphiphysinII/Bin1 N-BAR-Domäne zeigt wie alle BAR-Domänen ein komplett α -helikales, symmetrisches, bananenförmiges Homodimer. Die gleiche Anordnung der Helices sowie der Krümmungsradius wurde auch in der *Drosophila*-Amphiphysin N-BAR-Domäne¹¹¹ und in der Maus- bzw. Humanen-Endophilin-N-BAR-Domäne^{125; 141} gefunden, was auf eine starke evolutionäre Konservierung der Domäne hinweist. Die Krümmung der Domäne kommt durch zwei konservierte Proline zustande (Pro134 und Pro197). Die gesamte Oberfläche der Domäne ist zweiteilig geladen. Die konkave Seite der N-BAR-Domäne besitzt eine große Anzahl positiv geladener

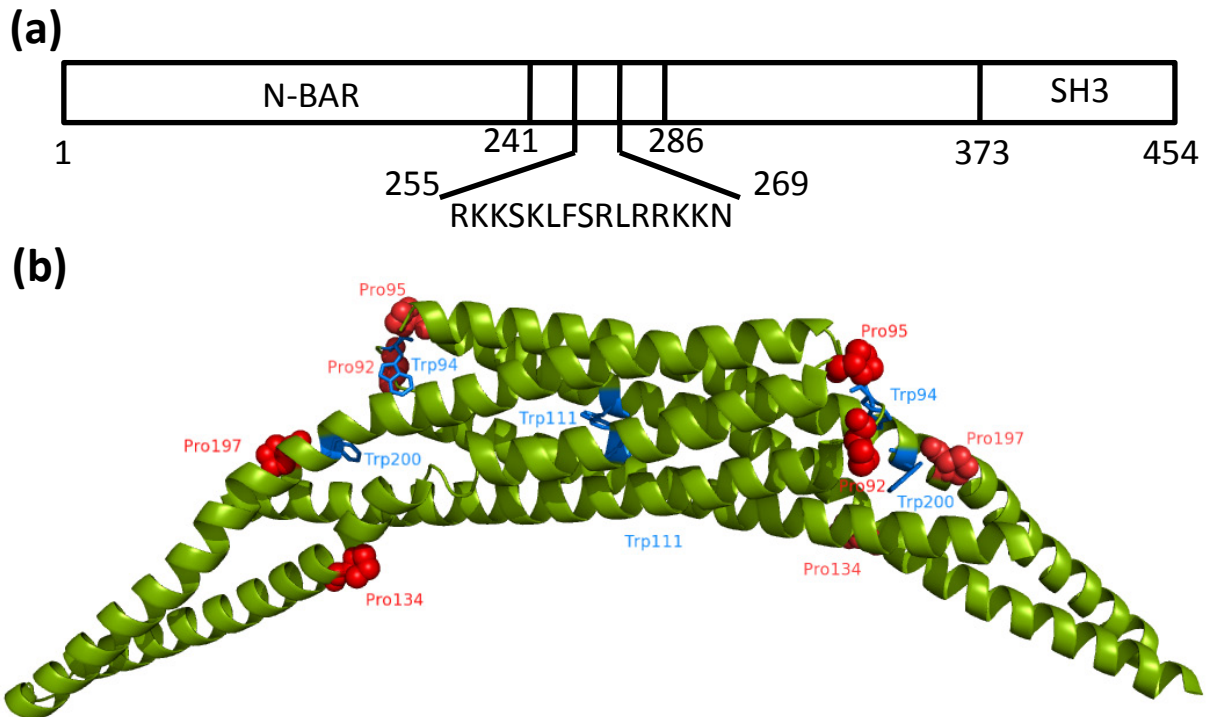


Abb.1-5: AmphiphysinII/Bin1

(a) Schematischer Aufbau des AmphiphysinII/Bin1-Proteins mit Lage der N-BAR-Domäne und der SH3-Domäne. Die Aminosäuren 255-269 stellen die Exon10-Sequenz dar. (b) Dreidimensionale Struktur von N-BAR(1-241) mit markierten Prolin- und Tryptophanresten (pdb: 2FIC).

Aminosäurereste¹⁴⁰. Somit bindet die Domäne nur an Membranen mit negativ geladenen Phospholipiden. Veränderungen dieser Aminosäuren führen auch zu einem Ausbleiben der Membranbindung bzw. Tubulierung. Die membranabgewandte Seite besitzt im Vergleich eine negativ geladene Oberfläche. Dieses entgegengesetzte Ladungsverhältnis bewirkt unter anderem die korrekte Orientierung der Domäne zur Membran. Es wird auch vermutet, dass hierdurch die Anordnung bzw. auch Packung der Domänen auf der Membran begünstigt wird. Da die humanen Amphiphysinproteine in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden, kommen sie in verschiedenen gewebespezifischen Spleißvarianten vor. In den einzelnen Geweben werden unterschiedliche Exons mit exprimiert, wodurch die einzelnen Proteine unterschiedliche Bindungspartner und Eigenschaften zur Membranassoziiierung aufweisen. Sie besitzen jedoch immer die N-BAR-Domäne und die SH3-Domäne. Amphiphysin I und die neuronale Spleißvariante von Amphiphysin II besitzen zusätzlich noch eine Binderegion für Clathrin und AP-2¹⁴². In der muskulären Variante fehlen diese Binderegionen, es wird jedoch das Exon10 mit exprimiert, welches mehrere positiv geladener Aminosäuren enthält und die Membranbindung erheblich erhöht. Dadurch findet man auch das muskuläre Amphiphysin hauptsächlich an der Zelloberfläche und nicht wie die neuronalen Varianten in der gesamten Zelle verbreitet. Durch die starke Lokalisierung des muskulären Amphiphysins an der Zelloberfläche ist es an der Biogenese von T-Tubuli in Muskelzellen

beteiligt. Einige pathogene Erscheinungen im Muskel werden dadurch auch mit Mutationen in dem Amphiphysingen in Verbindung gebracht^{143; 144}.

1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

Monomere Proteine wurden bereits in zahlreichen Studien bezüglich ihres Faltungsverhaltens untersucht und viele grundlegende Erkenntnisse zum kinetischen Verhalten der Proteinfaltung hieraus erworben. Das Proteom z.B. von *E. coli* besteht nur aus einer geringen Anzahl (etwa 19%) aus monomeren Proteinen. Den Rest bilden dimere oder höher oligomere Proteine. Die Anzahl von Proteinfaltungsstudien zu dimeren Proteinen ist im Vergleich zu monomeren Proteinen sehr stark reduziert und ist häufig auf Proteine beschränkt, die ohne detektierbare Intermediate falten. Die AmphiphysinII/Bin1 N-BAR-Domäne sollte diesbezüglich untersucht werden und als Ausgangspunkt für weitere Faltungsstudien homologer N-BAR-Domänen dienen. Die während der Faltungsreaktion beobachteten kinetischen Phasen sollten mit verschiedenen biophysikalischen Methoden (Gesamtfluoreszenz, Fluoreszenzanisotropie und fern-UV CD-Spektroskopie) genau untersucht und Faltungsereignissen zugeordnet werden. Hierfür sollten sowohl Einfachmischexperimente als auch Doppelsprung- und Dreifachsprungexperimente genutzt werden.

Die biologische Aktivität der AmphiphysinII/Bin1 N-BAR-Domäne ist bekannt und hinreichend untersucht worden. Weiterhin gibt es auch Ergebnisse zu einzelnen Struktureinheiten des Proteins. Eine Vergleichbarkeit der einzelnen Studien untereinander ist jedoch sehr schwierig, da die meisten Arbeitsgruppen eine unterschiedliche Lipidmischung verwenden. Bei Einsatz des Folch-Extraktes aus Rinderhirn ist ein Vergleich noch schwieriger, da es sich hier um eine natürliche Mischung handelt und diese natürlichen Schwankungen unterliegt. Deshalb sollte im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, wie verschiedene Lipidzusammensetzungen die Bindung an eine Membran beeinflussen. Hierfür sollten vorrangig Langmuir-Filmwaagemessungen durchgeführt werden. Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie können auch Aussagen zu der Tubulierungsaktivität der einzelnen Lipidmischungen getroffen werden. Weiterhin sollten verschiedene N-BAR Konstrukte verwendet werden, um Informationen zu bekommen, ob der *scaffolding mechanism* oder *hydrophobic insertion mechanism* zur Krümmung der Membran führt, da es experimentelle Beweise für beide Mechanismen gibt.

Das Protein AmphiphysinII/Bin1 besteht aus einer N-BAR-Domäne und einer dazugehörigen SH3-Domäne, die über einen Linker miteinander verbunden sind. Es wird vermutet, dass die SH3 Domäne eine autoinhibitorische Wirkung auf die N-BAR-Domäne besitzt. Die Bindung beider isolierter Domänen sollte durch verschiedene Titrationsexperimente genauer untersucht sowie strukturelle Informationen mittels NMR-Spektroskopie erworben werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Säulenmaterialien

Alle Säulenmaterialien wurden von GE Healthcare (München, D) bezogen, Harnstoff und IPTG von Gerbu (Heidelberg, D), Coomassie Brilliant Blue G und IGEPAL-CA630 von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D), alle Desoxyribonukleotide von Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D), alle isotopenmarkierten Chemikalien ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C -Glukose und D_2O) von Cortecnet (Voisins-Le-Bretonneux, F).

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, D) und VWR (Darmstadt, D) bezogen. Für alle wässrigen Lösungen und Puffer wurde doppelt entionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von $0,55 \mu\text{S}/\text{cm}$ verwendet. Alle Puffer wurden mithilfe eines Membranfilters (Porengröße $0,22 \mu\text{m}$) filtriert und anschließend entgast.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Konzentratoren VivaSpin 15R (5000 MWCO)	Sartorius (Göttingen, D)
Millipore-Filter	Merck Millipore (Darmstadt, D)
NMR-Röhrchen	Cortecnet (Voisins-Le-Bretonneux, F)
PD10-Säulen mit Sephadex G-25	GE Healthcare (Freiburg, D)
Plasmid Mini-Prep Kit, PCR Purification Kit, GelPrep Kit	Qiagen (Hilden, D)
pH-Indikatorstäbchen	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, D)
Spectro/Por-Dialyseschläuche (Ausschlussgrenzen 3,5 kDa und 1 kDa)	Spectrum (Los Angeles, CA, USA)

2.1.3 Geräte

Äkta Purifier, Äkta FPLC	GE-Healthcare (Freiburg, D)
Autoklav VX-95	Systec (Wettenberg, D)
Brutschrank	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)
CD-Spektrometer J-815 mit Peltierelement PTC-823S/15; UV/VIS-Spektralphoto- meter; FP-6500 Fluoreszenzspektrometer	Jasco (Groß-Umstadt, D)

Christ Alpha 1-4 LSC Gefriertrocknungs-anlange mit Drehschieber-Vakuumpumpe	Christ (Osterode, D)
EmulsiFlex-C5	Vacuubrand (Wertheim, D)
Eppendorf-Tischzentrifuge, Eppendorf , Thermomixer, Thermocycler	Avestin (Mannheim, D)
Hoefer Elektrophoreseeinheit SE 250	Eppendorf (Hamburg, D)
Kühlzentrifuge „Sorvall RC5B Plus“	Hoefer (Holliston, MA, USA)
Mini-Extruder	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)
NMR-Spektrometer AvanceIII 600MHz und 800 MHz	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
Präzisionswaage Atilon ATL-4202	Bruker (Karlsruhe, D)
Quarzpräzisionsküvetten	Acculab (Ettlingen, D)
Refraktometer	Hellma (Müllheim, D)
Reinstwasseranlage GenPure (UF)	Krüss (Hamburg, D)
Schüttelinkubatoren Innova 40 und 43	TKA Reinwassersysteme (Niederelbert, D)
SX Stopped-Flow Spectrometer and PiStar CD	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)
Stopped-Flow Spectrometer	Applied Photophysics (Surrey, UK)
Transmissionselektronenmikroskop EM900	Carl Zeiss NTS (Oberkochen, D)
VP-ITC Titrationskalorimeter	Microcal LLC (Northampton, USA)

2.1.4 Nährmedien, Bakterienstämme und Plasmide

Alle verwendeten Nährmedien wurden vor ihrer Benutzung für 21 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Alle hitzelabilen Nährmedienbestandteile wurden mit Hilfe eines Membranfilters (Porengröße 0,22µ m) sterilfiltriert. Für feste Nähmedien wurden 15 g/l Agar-Agar vor dem Autoklavieren in das Medium gegeben. Das jeweilige Antibiotikum (Kanamycin 30 µg/ml, Ampicillin 300 µg/ml, Carbenicillin 100 µg/ml) wurde nach dem Abkühlen hinzugegeben.

dYT-Vollmedium:	16 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl pro 1 l H ₂ O
5xM9:	85 g Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O, 15 g KH ₂ PO ₄ , 2,5 g NaCl, 5 g NH ₄ Cl bzw. ¹⁵ NH ₄ Cl pro 1 l Wasser
TS2:	100 mg ZnSO ₄ · 7H ₂ O, 30 mg MnCl ₂ · 4H ₂ O, 300 mg H ₃ BO ₃ , 200 mg CoCl ₂ · 6H ₂ O, 20 mg NiCl ₂ · 6H ₂ O, 10 mg CuCl ₂ · 2H ₂ O, 900 mg Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O, 20 mg Na ₂ SeO ₃ pro 1l Wasser

Materialien und Methoden

Minimalmedium: 200 ml 5xM9, 2 ml 1 M MgSO₄, 1 ml 0,1 M CaCl₂, 1 ml Fe(III)-citrat, 2 ml TS2, 20 ml 25% Glucose (bei ¹³C-Glucose 10%) pro 1 l Wasser

Die verwendeten Bakterienstämme sind nachfolgend aufgelistet. Der *E. coli*-Stamm TOP10 wurde für die Produktion von Plasmid-DNA verwendet, während *E. coli* BL21 (DE3) für die Proteinexpression verwendet wurde.

<i>Escherichia coli</i> TOP10 ¹⁴⁵	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 deoR araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galk</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) ¹⁴⁶	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Zur Expression der einzelnen Proteine wurden folgende Vektoren verwendet:

pET14b	Das Plasmid enthält das Gen für die jeweilige N-BAR-Varianten bzw. der SH3-Domäne, kloniert als <i>NdeI/BamH1</i> -Fragment. Im Plasmid ist ein N-terminaler His ₆ -Tag enthalten und eine Ampicillin-Resistenz.	
pETSUMOadapt	Der pETSUMO-Vektor der Firma Invitrogen wurde mit einer <i>multiple cloning site</i> versehen. Er enthält eine Kanamycin-Resistenz.	Der Vektor wurde freundlicherweise von Dr. E. Bosse-Dönecke ¹⁴⁷ zur Verfügung gestellt.
pET28b	Das Plasmid enthält die DNA-Sequenz für die SUMO-Protease Ulp1 mit einem C-terminalen His ₆ -Tag und eine Kanamycin-Resistenz.	Das fertige Plasmid wurde freundlicherweise von C. Lima zur Verfügung gestellt. U.S. Patent Nr. 6,872,551

2.1.5 Enzyme, Peptide und Lipide

Restriktionsendonuklease <i>NdeI</i> (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific
<i>BamH1</i> (10 U/μl)	(Schwerte, D)
FastDigest <i>DpnI</i> (10U/μl)	

T4 DNA Ligase (10 U/μl)	
T4 DNA Polynukleotidkinase (10 U/μl)	
DreamTaq DNA Polymerase	
Alkalisiche Phosphatase (1 U/μl)	
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
Pfu-Turbo DNA-Polymerase	Stratagen (Amsterdam, NL)
Exon10-Peptid	JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, D)
DOPC, DOPA, DOPS, DMPG, DHPC,	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
Thrombin, Lysozym, Gehirnextrakt aus Rinderhirn (Typ I)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)

2.1.6 Standards und Kits

Protein-Leiter Roti®-Mark	Carl Roth (Karlsruhe, D)
PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific (Schwerte, D)
Protein-Marker IV; 100 bp DNA-Leiter Plus	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
Plasmid Mini-Prep-Kit, PCR Purification Kit	Jena Bioscience (Jena, D)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, D)

2.1.7 Software

GraFit 5.0.11	Erithacus (Horley, UK)
Origin 7.5	MicroCal (Northampton, MA, USA)
Pro-Data SX und Pro-Data Viewer	Applied Photophysics (Surrey, UK)
ProtParam	http://www.expasy.org
PyMol v0.99	DeLano Scintific (South San Francisco, CA, USA)
SpectraManager	Jasco (Groß-Umstadt, D)
TopSpin 2.1	Bruker (Karlsruhe, D)
UNICORN 5 Control-Software	GE Healthcare (Freiburg, D)

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1 Herstellung und Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Die Fähigkeit einer Zelle Fremd-DNA aufzunehmen wird als Kompetenz bezeichnet. Hierbei werden Plasmide in kompetente Zellen eingeschleust. Für die Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) und in den *E. coli*-Stamm TOP10, welcher zur Vervielfältigung von Plasmiden diente, wurden CaCl_2 -kompetente Zellen verwendet. Die Präparation erfolgt unter sterilen Bedingungen und verläuft nach COHAN¹⁴⁸.

Für die Transformation wurde ein Aliquot von 150 μl kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-10 ng Plasmid-DNA bzw. 30 μl Ligationsansatz (siehe 2.2.8) versetzt. Der Ansatz wurde für 30-60 min auf Eis inkubiert bevor ein kurzer Hitzepuls von 45s bei 42°C erfolgte. Anschließend wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gepackt und mit 750 μl dYT-Medium versetzt. Die Zellen wurden für weitere 30 min bei 37°C geschüttelt, dann bei 2300xg für 3 min pelletiert. Vom Überstand wurden 700 μl verworfen und mit dem verbleibenden Medium das Zellpelett resuspendiert und auf dYT-Agarplatten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin bzw. 300 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerase-Kettenreaktion diente zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Plasmid-DNA. Die Grenze des zu amplifizierenden Bereiches bilden zwei Oligonukleotide, welche komplementär zu den 5'-Enden dieses Bereiches sind. Für die Amplifizierung kurzer DNA-Fragmente wurden *Taq*- oder Phusion-DNA-Polymerase verwendet. Die Reaktionsbedingungen und PCR-Ansätze variierten in Abhängigkeit des verwendeten DNA-*template*, den Primern oder den Polymerasen. Nach einem initialen Denaturierungsschritt erfolgten 30 Zyklen von Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation. Die Primer-Sequenz bestimmt hierbei hauptsächlich die Anlagerungstemperatur. Die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments bestimmt die Elongationszeit. Hierfür wurde eine durchschnittliche Synthesegeschwindigkeit von 1 kbp/min angenommen. Im Wesentlichen bestand das PCR-Programm aus folgenden Parametern:

initiale Denaturierung:	94°C, 2 min
Denaturierung:	94°C, 30 s
Anlagerung der Primer:	58-68°C, 30-45 s
Elongation:	72°C, 45-120 s

Anschließend erfolgte noch eine Auffüllreaktion für 10 min bei 72°C und abschließend die Lagerung bei 4°C. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

2.2.3 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung eines bakteriellen Klon auf erfolgreiche Klonierung wurde eine Kolonie-PCR mit *Taq*-Polymerase und dem T7-Promotor/Terminator-Primerpaar durchgeführt. Die Ansatzgröße pro Klon betrug 10 µl, wobei die Konzentration der jeweiligen PCR-Reagenzien nicht verändert wurden. Pro Ansatz wurde statt *template*-DNA eine Bakterienkolonie von der Agarplatte in den PCR-Ansatz gegeben und mit der gleichen Pipettenspitze ein Reaktionsgefäß mit 100 µl dYT-Medium angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde eine PCR durchgeführt wie unter 2.2.2 beschrieben. Nach dem PCR-Programm wurde die Länge des PCR-Produkts mit Agarose-Gelelektrophorese überprüft und bei positivem Ergebnis die entsprechende Bakterienkultur in 5 ml dYT-Medium gegeben, über Nacht kultiviert und eine Plasmidpräparation nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur vollständigen Überprüfung wurden die Plasmide zur Sequenzierung gegeben.

2.2.4 Sequenzspezifische Mutagenese (QuikChange®)

Das QuikChange®-Verfahren wurde für den Austausch einzelner Aminosäuren verwendet oder das Einführen von Deletionen. Für den Austausch von einzelnen Aminosäuren wurden zwei komplementäre Primer verwendet, welche die Punktmutationen enthielten. Die Primer für Aminosäuredeletionen flankierten den zu deletierenden Bereich. Die Amplifikation der DNA erfolgte unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase, welche eine hohe Prozessivität und eine *proof-reading* Funktion enthält. Das Ursprungsplasmid wurde mit Hilfe der *DpnI*-Endonuclease (Zielsequenz: 5'-G^{m6}ATC-3') verdaut, welches als *template*-DNA nur methylierte und hemimethylierte DNA verwendet. Somit kann eine genaue Trennung von Mutterplasmid und dem mutagenisierten Plasmid erfolgen.

Ein 50 µl- Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 38 µl Nuclease-freies Wasser, 5 µl 10x *Pfu*-Puffer, 1,5 µl dNTPs (je 10 mM), je 2 µl Primer (10 µM), 0,5 µl *template*-DNA, 1 µl *Pfu*-Puffer (5 U/µl). In Abhängigkeit eines Aminosäureaustausches oder einer –deletion wurden 12 bzw. 18 Reaktionszyklen durchgeführt. Das verwendete PCR-Programm setzte sich wie folgt zusammen:

initiale Denaturierung:	94°C, 2 min
Denaturierung:	94°C, 30 s
Anlagerung der Primer:	58-68°C, 30-45 s
Elongation:	72°C, 7 min

Materialien und Methoden

Auch hier erfolgte eine Auffüllreaktion für 10 min bei 72°C. Der anschließende *DpnI*-Verdau erfolgte durch Zugabe von 1 µl FastDigest *DpnI*. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine PCR-Reinigung mit Hilfe des JenaBioscience Kits und eine Ligation (siehe 2.2.8), bevor das erhaltene DNA-Fragment in *E. coli* Top10 transformiert wurde. Die erhaltenen Klone wurden mit einer Kolonie-PCR untersucht und bei positivem Ergebnis in eine 5 ml-dYT-Kultur überführt, hieraus das Plasmid isoliert und zur Sequenzierung gegeben.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wurde zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten eingesetzt. In Abhängigkeit von der Länge des aufzutrennenden DNA-Fragments wurden Agarosekonzentrationen von 0,8% (w/v) bzw. 1,6% (w/v) in 1xTAE verwendet. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer versehen und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 65 mA. Die DNA-Banden wurden anschließend für 30 min in frischer Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml in 1xTAE) gefärbt und unter UV-Licht mit 302 nm analysiert.

2.2.6 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte aus einer 5 ml-Übernachtskultur mit Hilfe des Plasmid-Mini Prep-Kits. Hierfür wurden 3-4 ml der Übernachtskultur pelletiert und nach den Angaben des Herstellers über SpinColumns in einer Mikrozentrifuge gereinigt und mit 30 µl Elutionspuffer oder Nuclease-freiem Wasser eluiert. Die Lagerung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

2.2.7 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA

Das Insertionsfragment wurde mit Hilfe von zwei Primern amplifiziert, wobei der N-terminale Primer eine *NdeI*-Schnittstelle und der C-terminale Primer eine *BamHI*-Schnittstelle enthielt. Das Plasmid und das Insertionsfragment wurden in einem 60 µl-Ansatz mit 2-5 µg DNA in 2xPuffer Tango und jeweils 10 U *NdeI* und *BamHI* bei 37°C für 2-6 Stunden verdaut. Um die Religation des geschnittenen Vektors zu minimieren wurden die 5'-Enden dephosphoryliert. Hierfür wurde in den Ansatz 10 U alkalische Phosphatase gegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die geschnittenen und gereinigten DNA-Fragmente wurden in einem 30 µl-Ansatz mit einer Gesamtmenge von 500 ng eingesetzt. Das molare Verhältnis von Insertionsfragment und Vektor betrug hierbei 1:1 bis 5:1. Weiterhin enthielt ein Ansatz 3 µl 10-fach T4-Ligase-Puffer und 10 U T4-DNA-Ligase. Der Ansatz wurde für 1-2 Stunden bei 22°C inkubiert, alternativ bei 16°C über Nacht.

Anschließend wurde die Ligase bei 65°C für 10 min inaktiviert und der Gesamtansatz in TOP10 Zellen transformiert.

2.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der hier verwendeten Arbeit wurde ausschließlich das SDS-PAGE-Verfahren nach SCHÄGGER und von JAGOW verwendet¹⁴⁹. Es handelt sich hierbei um eine optimierte Variante der Laemmli-Methode, bei der anstatt Glycin Tricin als Folgeion verwendet wird und dadurch für kleinere Proteine eine höhere Auflösung erzielt werden kann. Auch in dieser Methode werden die verwendeten Proteine mit SDS entfaltet und bekommen eine negative Ladung. Ebenso erfolgt die Konzentrierung der Proben durch ein Sammelgel, welches eine niedrigere Acrylamidkonzentration enthält als das folgende Trenngel. In Abhängigkeit der Proteingröße wurden 12,5%ige (15-30 kDa) bzw. 15 %ige (5-15 kDa) Trenngele verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA durchgeführt. Das Gel wurde zur Färbung zuerst einige Minuten fixiert, 30 Minuten gefärbt und solange entfärbt, bis sich eine deutliche Unterscheidung zwischen den Proteinbanden und dem Hintergrund ergab.

Trenngel 15 %:	5 ml Acrylamidlösung, 3,25 ml Gelpuffer, 1,65 ml ddH ₂ O, 6 µl TEMED, 83 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat
Trenngel 12,5%:	4,17 ml Acrylamidlösung, 3,25 ml Gelpuffer, 2,85 ml ddH ₂ O, 6 µl TEMED, 83 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat
Sammelgel:	1,2 ml Acrylamidlösung, 1,5 ml Gelpuffer, 3,25 ml ddH ₂ O, 5 µl TEMED, 50 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat
Gelpuffer:	3 M Tris/HCl, 0,3% (w/v) SDS, pH ^{25°C} 8,45
Anodenpuffer:	0,2 M Tris/HCl, pH ^{25°C} 8,9
Kathodenpuffer:	0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH ^{25°C} 8,23
4 x Ladepuffer:	0,2 M Tris/HCl, 8 % (w/v) SDS, 40% Glycerin, 0,004% (w/v) Bromphenol Blau, 0,1 M DTT, pH ^{25°C} 6,8
Fixierlösung:	10% (v/v) Trichloressigsäure
Färbelösung:	50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G
Entfärbelösung:	10% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Methanol

2.4 Überproduktion und Reinigung von N-BAR und SH3

Alle verwendeten N-BAR-Varianten und die Ampli/Bin1 SH3-Domäne wurden nach demselben Protokoll aufgereinigt. Zur Überexpression wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen verwendet und der pET14b-Vektor, welcher neben der DNA-Sequenz für das zu exprimierende Protein auch ein Ampicillin-Resistenzgen enthält. Zusätzlich wird ein N-terminaler His₆-tag exprimiert und für die spätere Reinigung genutzt. Die Expression steht unter Kontrolle des T7-Promoters. Nach Zugabe von IPTG wird die T7-Polymerase induziert, welche anschließend spezifisch das klonierte Gen exprimiert.

Expression und Zellaufschluss

Für die Expression in dYT-Medium wurden 100 ml (mit 300 µg/ml Ampicillin) mit einigen Mikrolitern aus einem Glycerinstock angeimpft und über Nacht bei 37°C und 300 rpm kultiviert. Aus dieser Vorkultur wurde anschließend die Hauptkultur, bestehend aus 2-4,2 l dYT-Medium und 300 µg/ml Ampicillin, mit einer Start OD₆₀₀ von 0,025-0,05 inokuliert. Zusätzlich wurden 4 g/l frisch hergestellte und sterilfiltrierte Glucose hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 280 rpm. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) gestartet und die Kultur für weitere 4 h geschüttelt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 8000xg für 15 Minuten und 4°C. Das erhaltene Zellpellet wurde in sterile 50 ml-Falcon-Gefäße überführt und in Aufschlusspuffer aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

Für die Expression der SH3-Domäne in M9-Minimalmedium wurde ¹⁵N-NH₄Cl als einzige Stickstoffquelle und ¹³C-Glucose als einzige Kohlenstoffquelle verwendet. Außerdem wurde Ampicillin durch Carbenicillin ersetzt, welches mit 100 µg/ml eingesetzt wurde. Die Induktionszeit wurde um eine Stunde verlängert.

Für den Zellaufschluss wurden die aufgetauten Zellen mit Proteaseinhibitorcocktail und Lysozym (0,5 mg/ml Zellsuspension) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der eigentliche Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe eines Mikrofluidizers bei 4°C und einem eingestellten Druck von 1000 bar. Zur Vervollständigung des Zellaufschlusses wurde der Vorgang dreimal wiederholt. Das erhaltene Zelllysate wurde anschließend zur Abtrennung von größeren Zellbestandteilen und Zelltrümmern bei 47810xg für eine Stunde bei 4°C zentrifugiert.

Metallaффinitätschromatographie und Thrombinspaltung

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte, die Chromatographien und die Dialyse wurden bei 4°C durchgeführt.

Der erhaltene Überstand wurde anschließend auf eine Ni-Sepharose-Säule, welche mit 50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 20 mM Imidazol, pH 8,0 zuvor äquibriert wurde, bei

einem Fluss von 1 ml/min aufgetragen. Im Anschluss wurde die Säule solange gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm etwa 0,1 A.U. betrug. Die Elution des Proteins erfolgt mit einem linearen Gradienten 0-70% 50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 500 mM Imidazol, pH 8,0. Die N-BAR- bzw. SH3-haltigen Fraktionen wurden in einem Dialyseschlauch vereinigt, mit 50 U Thrombin über Nacht gegen 20mM Tris/HCl, 150mM NaCl, pH^{4°C} 8,0 dialysiert. Anschließend wurde der gesamte Inhalt des Dialyseschlauchs zuerst auf eine Benzamidinsäule zur Entfernung des Thrombins und danach auf eine Ni-Sepharose-Säule zur Trennung von gespaltenem und ungespaltenem Protein aufgetragen. Alle Fraktionen mit dem Zielprotein wurden vereinigt.

Bei der Reinigung der SH3-Domäne enthielten alle in diesem Schritt verwendeten Puffer zusätzlich 2 mM DTT.

Größenausschlusschromatographie

Die vereinigten Proteinfractionen wurden anschließend auf eine HiLoad Superdex 75 prep grade (Größe 16/60), welche mit 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, pH 7,4 in 5 ml Portionen aufgetragen. Nach dem Ausschlussvolumen der Säule wurden 1,5 ml Fraktionen gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft und alle sauberen Fraktionen vereinigt. Die N-BAR-Varianten wurden alle mit Vivaspin Aufkonzentrierungsröhrchen aufkonzentriert und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert. Die SH3-Domäne wurde hingegen salzfrei dialysiert und anschließend lyophilisiert.

2.5 Überproduktion und Reinigung von SUMO-Fusionsprodukten

Die SUMO-Fusions-Technologie wurde zur Herstellung von Proteinfragmenten genutzt und diente zur Herstellung des BAR-Peptides, welches die Helix0 enthält. Das Peptid besitzt folgende Proteinsequenz: MAEMGSKGVT AGKIASNVQK KLTRAQEKVL QKLGKADETK DEQY. Die DNA-Sequenz befand sich im petSUMO-Vektor, welcher unter Kontrolle des T7-Promotors steht und mit IPTG induziert wird. Es dienten jeweils *E.coli* BL21(DE3) Zellen zur Expression.

Expression und Zellaufschluss

Die Anzucht der Zellen erfolgte in dYT-Medium bzw. zur Isotopenmarkierung in M9-Minimalmedium. In allen verwendeten Medien wurde Kanamycin zu einer Endkonzentration von 30 µg/ml hinzugegeben. Aus einer Übernachtskultur wurde die Hauptkultur mit einer Start OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert und bei 37°C und 280 rpm kultiviert. Bei einer optischen Dichte von 0,7 wurde mit 1 mM IPTG Endkonzentration induziert und die Zellen für weitere drei Stunden kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (8000xg, 4°C) geerntet, in 50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid,

20 mM Imidazol, pH 8,0 resuspendiert und bei -80°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte analog zu den N-BAR-Varianten bzw. der SH3-Domäne.

Metallaffinitätschromatographie und SUMO-Spaltung

Der erhaltene Überstand wurde auf eine mit 50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 20 mM Imidazol, pH 8,0 äquilibrierten Ni-Sepharose-Säule aufgetragen und anschließend bis zu einer Absorption bei 280 nm von 0,1 A.U. gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit einem Stufengradienten auf 250 mM Imidazol. Alle SUMO-haltigen Fraktionen wurden in einem Dialyseschlauch vereinigt, mit 10 x SUMO-Spaltpuffer (500 mM Tris/HCl, 10 mM DTT, 0,2% IGEPAL, pH^{4°C} 8,0) und 0,5 mg/ml der SUMO-Protease Ulp1 versehen und gegen 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH^{4°C} 8,0 bei 4°C für zwei Stunden dialysiert. Anschließend wurde der Ansatz wieder auf die Ni-Sepharose-Säule gegeben, um das gespaltene Peptid von nicht gespaltenem SUMO-Fusionsprodukt und Ulp1 zu trennen. Alle Fraktionen, die eine deutlich höhere Absorption als der Puffer aufwiesen, wurden vereinigt und für die Größenausschlusschromatographie verwendet.

Größenausschlusschromatographie

Die peptidhaltigen Fraktionen wurden in 5 ml-Portionen auf eine HiLoad S75 prep grade Säule (Größe 16/60), welche zuvor mit 50 mM Natriumphosphat, 50 mM Natriumchlorid, pH 7,5 äquilibriert wurde, aufgetragen und in 2 ml-Fraktionen eluiert. Der Verlauf der Chromatographie wurde sowohl bei 280 nm als auch 220 nm verfolgt. Da die aufgetragenen Fraktionen IGEPAL enthielten, musste die Säule nach jeder Injektion mit 180 ml Puffer nachgewaschen werden, bevor die nächste Injektion erfolgen konnte. Alle peptidhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, mehrfach gegen 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert und anschließend lyophilisiert.

2.6 Präparation der SUMO-Protease Ulp1

Die Verwendung von einfach aufgereinigter Ulp1-Protease ist für die meisten Spaltungen ausreichend. Die Expression der SUMO-Protease Ulp1 erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) pLysS Zellen. Hierfür wurden 2 l dYT-Medium mit den Zellen inokuliert und bei einer OD₆₀₀ von 2,0 mit 0,75 mM IPTG induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Das erhaltene Zellpelett wurde in 50 mM Tris/HCl, 350 mM Natriumchlorid, 20 mM Imidazol, 20% Saccharose, pH^{4°C} 8,0 resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte analog wie oben beschrieben. Der erhaltene Überstand wurde auf eine Ni-Sepharose-Säule geladen, gewaschen und anschließend mit 250 mM Imidazol eluiert. Das Imidazol wurde im Folgenden durch Dialyse wieder entfernt. Anschließend wurde zum gereinigten Ulp1 50% Glycerin gegeben und bei -80°C eingelagert.

2.7 Spektroskopische Methoden

2.7.1 Theoretische Grundlagen der optischen Spektroskopie

Die Voraussetzung aller Spektroskopiearten ist die Wechselwirkung von Licht als elektromagnetische Welle mit einem Molekül. Die Absorption von Licht führt zu einer Ladungsverschiebung in einem Molekül durch eine elektromagnetische Welle. Die einzelnen Energiezustände (bei optischer Spektroskopie hauptsächlich die der Elektronen) sind quantisiert, was bedeutet, dass die Elektronen nur diskrete Energieniveaus, beschrieben über bestimmte Wellenfunktionen, besetzen. Damit können sie auch nur bestimmte Elektronendichteverteilungen einnehmen. Absorption tritt genau dann auf, wenn das auftreffende Photon genau der Energiedifferenz zwischen zwei dieser Energieniveaus entspricht. Das Elektron wird dadurch in das höhere Energieniveau überführt und die absorbierten Photonen führen zu einer Abschwächung des Lichtes. Die Besetzung der einzelnen Energieniveaus ist vor der Absorption im Gleichgewicht und durch die BOLTZMANN-Verteilung gegeben, welche temperaturabhängig ist. Die Wahrscheinlichkeit eines elektronischen Übergangs wird durch das Übergangsdipolmoment bestimmt, welches über das Integral der Wellenfunktion des Grund- und angeregten Zustands und dem elektrischen Dipolmoment festgelegt ist. Die einzelnen Energieniveaus sind Molekülorbitale, die nach dem PAULI-Prinzip mit zwei Elektronen unterschiedlichen Spins besetzt sind. Bei der Absorption wird nun ein Elektron aus dem bindenden Orbital (Grundzustand) in ein antibindendes Orbital (angeregter Zustand) angehoben. Je besser beide Funktionen überlappen, desto größer ist das Überlappungsintegral und desto stärker ist auch die Absorption (Abb. 2-1). Die Wahrscheinlichkeit der Überlappung beider Integrale ist abhängig von dem Kern-Kern-Abstand des Grund- und angeregten Zustands. Der elektronische Übergang erfolgt sehr viel rascher ($k_A = 10^{15} \text{ s}^{-1}$) die Schwingungen der Kerne zueinander ($k = 10^{13} \text{ s}^{-1}$). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Kern-Kern-Abstand während der Absorption konstant ist. Somit kommt es zu einer Überlappung mehrerer elektronischer Zustände mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit des Kernabstandes. Eigentlich würde man recht schmale Linien in einem Absorptionsspektrum erwarten, da nur diskrete Energieniveaus angeregt werden. Dies tritt aber nur in der Gasphase ein. Die Ursache für die Unauflösbarkeit liegt in der Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel, wodurch diese zu Absorptionsbanden verbreitert werden.

Aus dem angeregten Zustand gibt es nun verschiedene Desaktivierungsprozesse (Abb. 2-2): Alle elektronischen Relaxationsprozesse gehen vom niedrigsten Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustandes S_1 ($v'=0$) aus, da höhere Schwingungszustände vorher durch Abgabe der überschüssigen Energie durch Lösungsmittelstöße strahlungslos nach $v' = 0$ relaxieren. Diesen Prozess bezeichnet man innere Umwandlung (*internal conversion*, IC). Durch denselben Prozess kann ein angeregtes Elektron strahlungslos in den Grundzustand zurückrelaxieren. Im Gegensatz dazu ist

die Fluoreszenz ein Relaxationsprozess, bei dem elektromagnetische Strahlung emittiert wird. Die Wahrscheinlichkeit hängt von dem entsprechenden FRANK-CONDON-Faktor ab. Die Elektronen landen meist in einem höheren Schwingungsniveau des Grundzustandes. Dies ist auch der Grund für die bathochrome Verschiebung des emittierten Lichtes gegenüber der Anregungswellenlänge (STOKES'sche-Verschiebung). Die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz liegt im Bereich von 10^8 s^{-1} . Eine weitere Möglichkeit der Relaxation ist die Fluoreszenzlöschung (*quenchen*) durch ein benachbartes Molekül oder das Lösungsmittel. Hier wird kurzzeitig ein Stoßkomplex gebildet, der seine Energie jedoch strahlungslos wieder abgibt. Der Abstand zwischen dem Chromophor und dem *quencher* darf einen gewissen Abstand nicht überschreiten, da ansonsten kein Komplex innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer gebildet werden kann. Prinzipiell wird zwischen statischer und dynamischer Fluoreszenzlöschung unterschieden, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll. Die Ausnutzung des angeregten Zustands kann auch für chemische Reaktionen genutzt werden. Eine weitere Möglichkeit ist der FÖRSTER-Transfer (FRET), bei dem strahlungslos die Energie des angeregten Chromophores auf ein anderes Teilchen erfolgt. Im Gegensatz zur Fluoreszenzlöschung muss hier kein Stoßkomplex gebildet werden, sondern es reicht die räumliche Nähe beider Teilchen. Der letzte mögliche Relaxationsprozess ist der Interkombinationsübergang, bei dem der angeregte Chromophor durch Spiumkehr in den Triplettzustand gelangt. Die Relaxation in den S_0 -Grundzustand bezeichnet man als Phosphoreszenz und ist im Gegensatz zur Fluoreszenz deutlich

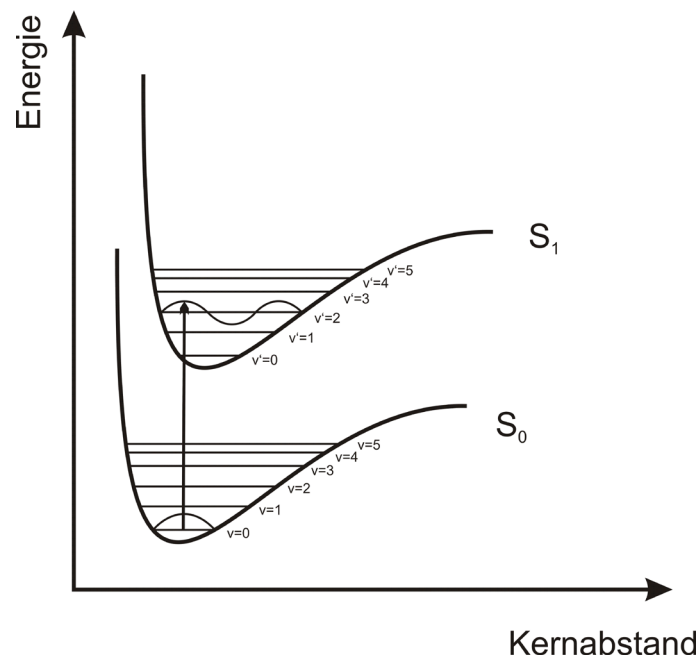


Abb. 2-1: Potenzialkurven des Grund- und angeregten Zustandes mit einigen Schwingungsniveaus.

Gezeigt sind die Potenzialkurven von zwei elektronischen Zuständen für ein zweiatomiges Molekül. Bei einigen Schwingungsniveaus sind die Wellenfunktionen visualisiert. Eingezeichnet ist der wahrscheinlichste Übergang von $S_0(v=0)$ nach $S_1(v=3)$, da hier die beiden Maxima der Wellenfunktionen genau überlappen.

langsamer, mit einer Geschwindigkeitskonstante von kleiner als 10^2 s^{-1} und deutlich bathochrom verschoben. Während eines Faltungs- bzw. Entfaltungsprozesses verändert sich das Fluoreszenzspektrum eines Proteins stark. Dies beruht im Wesentlichen auf zwei Effekten die im folgenden beschrieben werden sollen. Der erste Effekt beruht auf einer Verschiebung des Emissionsmaximums aufgrund der Änderung in der Polarität der aromatischen Aminosäuren. In aller Regel gelangen hierbei durch den Entfaltungsprozess die aromatischen Aminosäuren aus dem hydrophoben Inneren des Proteins in ein stark hydrophiles Milieu. Die Chromophore besitzen ein größeres Dipolmoment in dem angeregten Zustand als im Grundzustand. Demnach ist auch die Wechselwirkung mit dem umgebenden Lösungsmittelmolekülen unterschiedlich. Durch die Änderung des Dipolmomentes nach der Absorption müssen sich auch die Lösungsmittelmoleküle an diese neue Lage anpassen und ein neues Gleichgewicht einstellen. Diese neue Gleichgewichtseinstellung senkt energetisch den S_1 -Zustand ein wenig. Die Neuausrichtung der Lösungsmittelmoleküle besitzt eine Geschwindigkeitskonstante von 10^{10} s^{-1} und ist damit schneller als die der Fluoreszenz. Der anschließend erreichte Grundzustand ist wieder energetisch ungünstiger, da das Dipolmoment der Lösungsmittelmoleküle erst wieder in diesen Zustand relaxieren muss und erst dann den Gleichgewichtsgrundzustand erreicht. Auf Grundlage dieser Energieverschiebungen erfährt das Fluoreszenzlicht eine Rotverschiebung. Dieser Effekt ist umso stärker, je polarer das Lösungsmittel ist. Der zweite Effekt ist die Veränderung der Fluoreszenzintensität durch Lösungsmittelstöße, Löscheffekte durch nichtfluoreszierende Aminosäuren (geladene Aminosäuren, Disulfidbrücken, Peptidbindung) und Energietransfer zwischen den aromatischen Aminosäuren. Diese Effekte verändern hauptsächlich die Fluoreszenzlebensdauer und die Quantenausbeute. Weiterhin sind diese Einflüsse stark entfernungsabhängig.

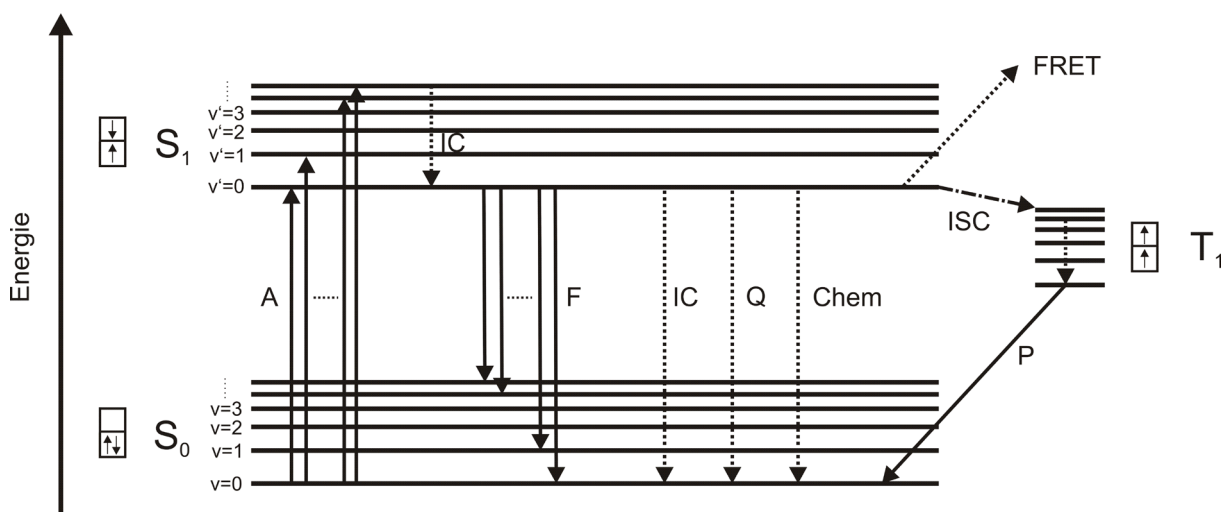


Abb. 2-2: Relaxationsprozesse nach Anregung eines Elektrons (JABŁOŃSKI-Diagramm).

2.7.2 Grundlagen der Fluoreszenzanisotropie

Die Fluoreszenzanisotropie ist eine spezielle Methode in der Fluoreszenzspektroskopie. Sie verwendet die Eigenschaften von Chromophoren, dass sie bei Anregung mit linear polarisiertem Licht auch wieder linear polarisiertes Licht emittieren. Somit lassen sich Molekülgröße und Änderungen in der Beweglichkeit der Chromophore messen. Für Messungen bei Proteinfaltungsreaktionen spielt somit nur die Änderung in der Beweglichkeit eine Rolle. Wobei aber nur solche Änderungen beobachtbar sind, die eine Änderung in der Orientierung des Übergangsdipolmoments erfahren. Zur maximalen Absorption des linear polarisierten Lichtes kommt es, wenn das Übergangsdipolmoment parallel zum elektrischen Feldvektor ausgerichtet ist. Da dies meist nicht der Fall ist, schließen beide einen Winkel α ein, welcher für das Ausmaß der Absorption entscheidend ist und eine Abhängigkeit von $\cos^2\alpha$ besitzt. Wenn es zur Fluoreszenz kommt, müssen die einzelnen Bestandteile (I_{\parallel} und I_{\perp}) mit Hilfe eines Polarisationsfilters getrennt gemessen werden. Die Anisotropie A bei einem Ensemble-Experiment und permanenter Anregung wird aus den Messgrößen wie folgt berechnet:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1)$$

Die Anisotropie ist somit abhängig von den einzelnen Lichtintensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} die wiederum in Abhängigkeit von $\cos^2\alpha$ sind. Somit ist entscheidend, welche Vorgänge den Winkel α beeinflussen. Hierbei ist vor allem die Rotation des Fluorophores während der Fluoreszenzlebensdauer entscheidend. Eine ungehinderte Rotation führt auch zu einer Depolarisation. Die Perrin-Gleichung beschreibt hierbei den Zusammenhang zwischen der Rotationskorrelationszeit θ , der Fluoreszenzlebensdauer τ und der gemessenen Anisotropie A wie folgt:

$$\frac{A_0}{A} = 1 + \frac{\tau}{\theta} \quad (2)$$

Die Rotationskorrelationszeit ist somit die entscheidende Größe, welche die Anisotropie verändert. Bei einer Proteinfaltungsreaktion ist somit entscheidend, wie sich die Rotationskorrelationszeit des Chromophors (hauptsächlich Tryptophan) mit der Faltungs- bzw. Entfaltungszeit verändert. Im entfaltenen Zustand können die Tryptophane frei rotieren und besitzen dadurch eine sehr kleine Rotationskorrelationszeit. Im nativen Zustand sind diese in der Struktur fixiert, besitzen eine geringe Flexibilität und nehmen die Beweglichkeit des Gesamtproteins an. Demnach weisen sie hier eine größere Rotationskorrelationszeit auf. Bei einem Faltungsprozess verlangsamt sich somit die Rotationskorrelationszeit, dadurch steigt der Quotient A_0/A und damit auch die gemessene

Anisotropie. Bei einem Entfaltungsprozess tritt genau der umgekehrte Fall ein. Die Translationsbewegung des Gesamtmoleküls (sowohl das native als auch das entfaltete Protein) findet hierbei keine Berücksichtigung, da während der gesamten Zeit hier eine ungehinderte Bewegung möglich ist und sie keinen Beitrag zur Änderung der Anisotropie liefert.

2.7.3 Absorptionsspektroskopie

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden UV-Spektren an einem Jasco V-650 Absorptionsspektrometer im Bereich von 240-340 nm gemessen. Die Spektren wurden in einer 1 cm Hellma Quarzküvette mit einer Geschwindigkeit von 100 nm/min bei einer Bandbreite von 2 nm aufgenommen. Die Auflösung betrug 0,2 nm. Unter den gleichen Bedingungen wurde als Referenz das reine Pufferspektrum gemessen, welches zur Korrektur des Proteinspektrums verwendet wurde. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden:

$$E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (3)$$

mit E_{λ} , der Extinktion bei der Wellenlänge λ , ε_{λ} , dem Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ , c , der Proteinkonzentration und d , der optischen Weglänge. Die Extinktionskoeffizienten der hier verwendeten Proteine betragen $27055 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für alle N-BAR-Varianten und $12490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für die SH3-Domäne.

2.7.4 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie stellt eine spezielle Form der Absorptionsspektroskopie dar, bei der die Probe mit zirkular polarisiertem Licht angeregt wird und die Chiralität von Molekülen ausgenutzt wird. Die Voraussetzung für die CD-Spektroskopie ist das Vorhandensein von optisch aktiven Verbindungen, d.h. das Vorhandensein von unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten für links (ε_L) und rechts (ε_R) zirkular polarisiertem Licht. Die eigentliche Messgröße ist der Unterschied $\Delta\varepsilon$ mit $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$. In der praktischen Spektroskopie ist die Elliptizität Θ die gemessene Größe.

Die Messungen der CD-Spektren erfolgten an einem Jasco J-815 CD-Spektrometer. Die Messungen erfolgten bei 15°C in einem temperierbaren Küvettenhalter. Es wurden Spektren im Bereich 195 – 260 nm bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 50 nm/min und einer Bandbreite von 1 nm aufgenommen. Als Küvetten wurden Hellma-Küvetten verwendet, die Schichtdicke betrug 1 mm bzw. 10 mm. Nach der Messung wurde die mittlere Elliptizität Θ in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure wie folgt umgerechnet:

$$\Theta_{\text{MRW}} = \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}} \cdot 10} \quad (4)$$

- Θ_{MRW} mittlere molare Elliptizität je Aminosäure in
(Grad·cm²/dmol)
- c Proteinkonzentration
- d Schichtdicke in cm
- N_{AS} Anzahl Aminosäuren

2.7.5 Fluoreszenzspektroskopie

Die Messung von Fluoreszenzemissionsspektren erfolgte an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer. Die Konzentration an Protein betrug 0,1-25 μM . Die Aufnahme­geschwindigkeit betrug 50 nm/min bei einer Auflösung von 0,2 nm. Die Anregung erfolgte bei 280 nm bzw. 295 nm bei einer Bandbreite von 1-5 nm. Es wurden Spektren im Bereich 310-420 nm aufgenommen bei einer Bandbreite von 3-5 nm. Die Messungen erfolgten entweder in einer Rundküvette mit 8 mm Durchmesser (Gesamtvolumen 800 μl), in einer Hellma Makro- (Gesamtvolumen 3200 μl), in einer Mikroküvette (Gesamtvolumen 500 μl) oder in einer Ultra-Mikroküvette (Gesamtvolumen 30 μl).

2.7.6 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante durch Fluoreszenzspektroskopie

Die Änderung der Fluoreszenz durch die Interaktion zweier Moleküle konnte verwendet werden, um die Bindung beider nachzuweisen, sowie durch Titration des einen Bindungspartners die Gleichgewichtsdissoziationskonstante und die Stöchiometrie zu bestimmen. Hierfür wurden für jeden Titrationspunkt einzelne Proben hergestellt und für eine Stunde bei 20°C inkubiert. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass keine Volumenänderungen während der Titration erfolgen und dadurch keine folgenden Korrekturen der Proteinkonzentration bzw. Konzentration des Bindungspartners durchgeführt werden müssen. Als Grundlage der Auswertung diene ein Modell mit nur einer Bindestelle, wobei also nur freie Bindungspartner bzw. der Komplex aus beiden vorliegen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ist demnach wie folgt definiert:

$$K_{\text{D}} = \frac{[P] \cdot [L]^n}{[PL]} \quad (5)$$

wobei K_{D} die Gleichgewichtsdissoziationskonstante, n die Stöchiometrie, $[P]$ die Proteinkonzentration im Gleichgewicht, $[L]$ die Konzentration des Bindungspartners im Gleichgewicht und

[PL] die Konzentration des Komplexes aus beiden im Gleichgewicht darstellen. Die relative Fluoreszenzänderung ΔF wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta F = \frac{F_0 - F}{F_0} \quad (6)$$

F_0 stellt hierbei die Fluoreszenzintensität des Proteins ohne Bindungspartner dar und F die Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Bindungspartners. Die daraus erhaltene Kurve wird mit folgender Gleichung angepasst¹⁵⁰:

$$\Delta F = F_{\max} \cdot \frac{[P_0] + n \cdot [L_0] + K_D - \sqrt{([P_0] + n \cdot [L_0] + K_D)^2 - 4n[P_0][L_0]}}{2[P_0]} \quad (7)$$

wobei F_{\max} die maximale Änderung darstellt, $[P_0]$ und $[L_0]$ die Ausgangskonzentrationen von Protein und Bindungspartner und n die Stöchiometrie.

2.7.7 Messung der Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid zur Bestimmung der Oberflächenzugänglichkeit von Tryptophan

Die Fluoreszenzlöschung beruht auf der Wechselwirkung eines Fremdmoleküls (*quencher*) in der Lösung mit dem Chromophor. Hierbei wird hauptsächlich ein S1→T1-Übergang induziert (Abb. 2-2), wobei Energie an das Fremdmolekül abgegeben wird, welches nicht in der Lage ist zu fluoreszieren. Die Voraussetzung für die Energieübertragung ist, dass beide Moleküle in Kontakt miteinander kommen. Eine räumliche Nähe ist dabei nicht ausreichend. Die Fluoreszenzlöschung kann verwendet werden, um lokale Änderungen von oberflächenexponierten Tryptophanen zu untersuchen. Hierfür wurden Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen an Acrylamid mit 1 μ M N-BAR bzw. 2 μ M Tryptophan vorbereitet und wie oben beschrieben spektroskopisch gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm. Die Auswertung erfolgt durch Auftragung von F_0/F , wobei F_0 die Emissionswerte von 345 nm bei Abwesenheit des Quenchers darstellt und F die Emissionswerte in Anwesenheit des Quenchers, gegen die Acrylamidkonzentration c_Q . Hierbei ergibt sich im Normalfall eine lineare Abhängigkeit (Stern-Volmer-Gleichung), die wie folgt definiert ist:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_Q \cdot \tau^0 \cdot c_Q \quad (8)$$

das Produkt aus k_Q und τ^0 wird als Stern-Volmer-Konstante (K_{SV}) bezeichnet.

2.8 Messung und Auswertung konformationeller Übergänge

Jedes Protein liegt in einem Gleichgewicht zwischen dem nativen und entfalteten Zustand vor. Durch Änderung der äußeren Bedingen (Temperatur, Druck, chemische Umgebung) kann das Gleichgewicht verschoben werden. In der hier verwendeten Arbeit wurde ausschließlich Harnstoff als Denaturierungsmittel verwendet. Die verwendeten Harnstofflösungen wurden immer frisch hergestellt, um den Einfluss von reaktiven Cyanaten zu unterbinden¹⁵¹. Die genaue Konzentration von Harnstoff in den Stammlösungen und jeder Probe in den Entfaltungsexperimenten konnte über die Differenz des Brechungsindex (Δn) der Lösung in Anwesenheit und Abwesenheit von Harnstoff berechnet werden¹⁵². Folgende Gleichung liegt der Berechnung zu Grunde:

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot \Delta n^2 + 185,56 \cdot \Delta n^3 \quad (10)$$

Für die Messung der Entfaltungsübergänge wurden Lösungen mit 1000 μl 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, pH 7,4 mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen (0 M - 8,5 M) hergestellt. Die Messungen erfolgten bei 15 °C. Die Proteinkonzentration betrug zwischen 0,1 μM und 25 μM . Die Proben wurden über Nacht bei 15 °C equilibriert und am nächsten Tag mit Fluoreszenzspektroskopie bzw. fern-UV CD-Spektroskopie gemessen. Die Auswertung der Übergangskurven erfolgte für die SH3-Domäne nach einem Zweizustandsmodell für monomere Proteine und nach einem Zweizustandsmodell für dimere Proteine für die N-BAR-Domäne.

2.8.1 Auswertung von Entfaltungsübergängen für monomere Proteine

Für die Auswertung der Entfaltungsübergängen wird von einem Zweizustandsmodell ausgegangen¹⁵³, d.h. es erfolgt kein Auftreten von intermediären Zuständen während des Faltungs- bzw. Entfaltungsvorganges.



Die Gleichgewichtskonstante K_U setzt sich nur zusammen aus den Konzentrationen an nativem und entfaltetem Protein, wobei der Messwert y_{obs} immer eine Mischung beider Komponenten beinhaltet. Die spektroskopischen Eigenschaften von N und U werden mit y_N und y_U bezeichnet und besitzen eine lineare Abhängigkeit mit der eingesetzten Harnstoffkonzentration, wobei $m_{U,N}$ die Steigung der jeweiligen Basisline beschreibt.

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{y_N - y_{\text{obs}}}{y_{\text{obs}} - y_U} \quad (11)$$

$$y_{U,N} = y_{U,N}^0 + m_{U,N} \cdot [\text{Harnstoff}] \quad (12)$$

Ferner bestimmt die Gleichgewichtskonstante K_U auch die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_U . Die freie Enthalpie besitzt ebenfalls eine lineare Abhängigkeit mit der eingesetzten Harnstoffkonzentration, wobei ΔG_U^0 die freie Enthalpie in Abwesenheit von Harnstoff beschreibt und m der Kooperativitätsfaktor ist.

$$\Delta G_U = -RT \ln K_U \quad (13)$$

$$\Delta G_U = \Delta G_U^0 + m \cdot [\text{Harnstoff}] \quad (14)$$

Durch die Kombination von Gleichung 11, 13 und 14 ergibt sich folgende Formel für die Auswertung des Entfaltungsüberganges¹⁹.

$$y_{\text{obs}} = \frac{y_N^0 + m_N \cdot [\text{Harnstoff}] + (y_U^0 + m_U \cdot [\text{Harnstoff}]) \cdot \exp\left(\frac{\Delta G_U^0 + m \cdot [\text{Harnstoff}]}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G_U^0 + m \cdot [\text{Harnstoff}]}{RT}\right)} \quad (15)$$

2.8.2 Auswertung von Entfaltungsübergängen für dimere Proteine

Die Auswertung der Entfaltungsübergänge von dimeren Proteinen erfolgt auf Grundlage des Zweizustandsmodelles für dimere Proteine, welches nur natives Dimer oder entfaltete Monomere enthält.



Im Gegensatz zu Schema 1 spielt bei der Faltungsreaktion die Dimerisierung der Monomere eine Rolle und eine damit verbundene Veränderung der Gleichgewichtskonstanten.

$$K_U = \frac{[U]^2}{[N_2]} \quad (16)$$

Auch in dieser Auswertung wird eine lineare Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften mit zunehmender Harnstoffkonzentration angenommen. Auf der Grundlage von Schema 2 kann mit Hilfe der Grundlinien eine Normierung der experimentellen Daten erfolgen:

$$f_U = \frac{y_{\text{obs}} - y_N}{y_U - y_N} \quad (17)$$

Die Gleichgewichtskonstante kann durch Einsetzen folgender Beziehung $[N_2] = f_U \cdot [P_0]$ in Gleichung 16 mit der eingesetzten Proteinkonzentration P_0 und dem Anteil entfaltetem Protein f_U folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$K_U = \frac{2[P_0] \cdot f_U^2}{1 - f_U} \quad (18)$$

Die Anpassung der normierten Daten erfolgt durch nicht lineare Regression mit Gleichung 19, welche aus der Verknüpfung von Gleichung 13, 14 und 18 hervorgeht¹⁵⁴.

$$f_U = \frac{\sqrt{K_U^2 + 8[P_0]K_U} - K_U}{4[P_0]} \quad (19)$$

$$K_U = \exp\left(-\frac{\Delta G^0 - m \cdot [\text{urea}]}{RT}\right) \quad (20)$$

Mit Hilfe dieser Gleichung ergibt sich ein Stabilitätswert welcher sich auf 1 M Protein bezieht. Auf Grund der Dimerisierungsreaktion ist der Übergangsmittelpunkt abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration, d.h. mit zunehmender Proteinkonzentration verschiebt er sich zu höheren Harnstoffwerten. Für jede gemessene Proteinkonzentration lässt sich der jeweilige Übergangsmittelpunkt nach folgender Formel berechnen.

$$[\text{Harnstoff}]_{0,5} = \frac{\Delta G^0 + RT \ln[P_0]}{m} \quad (21)$$

Der Fehler des Übergangsmittelpunktes wurde durch Fehlerfortpflanzung nach folgender Formel ermittelt:

$$\Delta[\text{Harnstoff}]_{0,5} = \frac{1}{m} \cdot \Delta\Delta G^0 + \frac{\Delta G^0 + RT \ln[P_0]}{m^2} \cdot \Delta\Delta m \quad (22)$$

2.9 Messung und Auswertung von Faltungskinetiken

Die Messungen von schnellen Rückfaltungs- und Entfaltungskinetiken erfolgten an einem Applied Photophysics SX20 Stopped-Flow Spectrometer für schnelle Fluoreszenz-basierte Kinetiken, an einem Applied Photophysics PiStar CD Stopped-Flow Spectrometer für schnelle fern-UV CD-Kinetiken und an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer für langsame Kinetiken. Die Beobachtungszellen der beiden *stopped-flow* Geräte betragen $10 \times 2 \times 1 \text{ mm}^3$, während bei manuellen Mischungen eine $10 \times 10 \times 20 \text{ mm}^3$ Fluoreszenzküvette mit Magnetührstab verwendet wurde. Die Totzeit der Kinetiken lag bei *stopped-flow*-Messungen zwischen 2-20 ms in Abhängigkeit ob mit oder ohne Druck halten gemessen wurde. Bei manuellen Mischungen lag sie bei $< 5 \text{ s}$.

Rückfaltungs- bzw. Entfaltungsexperimente wurden durch eine 11-fache Verdünnung nativen oder entfalteten Proteins gestartet. Für Rückfaltungskinetiken wurde N-BAR in 4 M Harnstoff bzw. die SH3-Domäne in 7 M Harnstoff für 30 min equilibriert und anschließend durch Verdünnung die Rückfaltung in der jeweiligen Harnstoffkonzentration gestartet. Entfaltungskinetiken wurden für N-BAR in Harnstoffkonzentrationen größer als 2,2 M aufgenommen bzw. größer als 3,5 M für die SH3-Domäne. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm (bei einer Bandbreite von 10 nm). Durch Verwendung eines entsprechenden *cutoff* Filters setzt sich das Emissionssignal aus der Summe aller Fluoreszenzintensitäten oberhalb von 320 nm zusammen. Alle Experimente wurden bei 15°C durchgeführt, wobei die Vorschubspritzen, die Schlauchverbindungen und die Messzelle vortempertiert wurden. Die Proteinkonzentration lag bei der SH3-Domäne bei $2 \mu\text{M}$ und zwischen $0,25$ und $5 \mu\text{M}$ für die N-BAR-Domäne. Es wurden in der Regel zwischen fünf bis zehn Kinetiken gemessen, einzeln analysiert und die erhaltenen Werte gemittelt.

Zusätzlich zur totalen Fluoreszenz wurde auch die Änderung der Fluoreszenzanisotropie kinetisch verfolgt. Der Unterschied zur totalen Fluoreszenz besteht darin, dass die Tryptophane mit linear polarisiertem Licht angeregt werden und dadurch auch wieder linear polarisiertes Licht emittieren. Die emittierte Fluoreszenz wird parallel und senkrecht zur Ebene des Anregungslichtes gemessen. Dabei ist die Anisotropie des emittierten Fluoreszenzlichtes mit der Rotations-Diffusion aller Fluorophore verknüpft, d.h. bei einer ungehinderten Rotation des Fluorophors (im entfalteten Zustand) kommt es zu einer Depolarisation und damit zu einer Abnahme der Anisotropie. Für den nativen Zustand tritt das Gegenteil ein. Die Anisotropiemessung ermittelt demnach die durchschnittliche Winkelbewegung des Fluorophors, welche zwischen der Anregung und Emission auftritt. Dadurch ist die Änderung des Anisotropiesignales mit einer veränderten Beweglichkeit der

Materialien und Methoden

Fluorophore während des Faltungs- bzw. Entfaltungsprozesses verknüpft und nicht mit einer Änderung in der chemischen Umgebung wie bei der totalen Fluoreszenz. Die Messungen erfolgten an einem Applied Photophysics SX20 Stopped-Flow Spectrometer mit dualer Fluoreszenzdetektion im T-Format. Für die Anisotropiemessungen wurde eine Xenon-Quecksilber-Lampe verwendet, die Anregungswellenlänge lag deshalb bei 297 nm. Auch wurden für die Emission ein 320 nm *cutoff*-Filter verwendet. Die Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken wurden unter den gleichen Bedingungen gemessen wie oben beschrieben.

Fern-UV CD-Kinetiken wurden ebenfalls analog wie oben beschrieben gemessen. Die Änderung des CD-Signals wurde bei 225 nm (Bandbreite 8 nm) in einer 1 cm-Küvette gemessen.

Die Rückfaltungs- und Entfaltungskinetiken der SH3-Domäne bzw. die Entfaltung der N-BAR-Domäne sind Reaktionen 1. Ordnung und wurden durch eine nicht-lineare Regression der Datenpunkte mit einer Summe von Exponentialfunktionen entsprechend der Anzahl beobachteter Phasen ausgewertet.

$$Y(t) = Y_0 + \sum_{i=1}^N Y_i \cdot \exp(-k_i t) \quad (23)$$

Y_0 beschreibt hierbei den experimentellen *offset* der Gesamtreaktion, Y_i und k_i die Amplitude und Geschwindigkeitskonstante der jeweiligen Phase. Die Rückfaltung von N-BAR ist eine bimolekulare Reaktion und demnach eine Reaktion 2. Ordnung. Die experimentellen Geschwindigkeitskonstanten werden mit einer hyperbolischen Funktion angepasst. Die apparente Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktion ist wiederum eine Funktion der Proteinkonzentration. Die tatsächliche Reaktionsrate 2. Ordnung kann mit Gleichung 25 genau bestimmt werden. Da bei der Rückfaltung von N-BAR weitere Phasen beobachtet werden, die nicht von der Proteinkonzentration abhängen, müssen weitere Reaktionen 1. Ordnung zur Gesamtgleichung hinzugefügt werden. Die Rückfaltungskinetiken wurden demnach mit Gleichung 24 angepasst.

$$Y(t) = Y_0 + Y_1 \frac{k_{\text{app}} t}{1 + k_{\text{app}} t} + \sum_{i=2}^N Y_i \exp(-k_i t) \quad (24)$$

$$k_{\text{app}} = [P_0] k_{2\text{nd}} \quad (25)$$

Die Bestimmung der Aktivierungsenergie einzelner Rückfaltungsphasen erfolgte über die Messung der Rückfaltungskinetik bei verschiedenen Temperaturen. Die erhaltenen, logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden gegen die inverse Temperatur T aufgetragen und nach folgender Gleichung angepasst:

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln A - \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (26)$$

Hierbei entspricht A dem präexponentiellen Faktor, E_A der Aktivierungsenergie und R der allgemeinen Gaskonstante.

Bestimmung der intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten

Bei der SH3-Domäne wurden alle ermittelten Rück- und Entfaltungskonstanten mit einem einfachen Zweizustandsmodell angepasst. In Gleichung (27) ist die analytische Lösung des Zweizustandsmodells angegeben. Es kann eine exponentielle Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten mit der Harnstoffkonzentration angenommen werden. Dabei stellt $k_{f,u}(H_2O)$ die Geschwindigkeitskonstante der Faltung bzw. Entfaltung in Abwesenheit von Harnstoff dar und die Steigung der Geraden den kinetischen m -Wert $m_{f,u}$.

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln(k_f^0(H_2O) \cdot \exp(-m_f[Harnstoff]) + k_u^0(H_2O) \cdot \exp(m_u[Harnstoff])) \quad (27)$$

Doppelsprungexperimente zur Detektion von Faltungsintermediaten

Die genaue Charakterisierung der Bildung von Faltungsintermediaten und des nativen bzw. entfalteten Zustands im Verlauf einer Faltungs- bzw. Entfaltungsreaktion wird durch Doppelsprungexperimente untersucht. Hier erfolgen im Gegensatz zu Einfachsprungexperimenten zwei sequentielle Mischphasen. Diese Methode erlaubt die selektive Bestimmung von einzelnen Faltungszuständen während des Faltungsprozesses. Es können Reaktionen sichtbar gemacht werden, welche in Einfachsprungexperimenten nicht sichtbar sind und man kann die sequentielle Abfolge von Reaktionsschritten zuordnen. Die beiden hauptsächlich durchgeführten Experimente sind der N-Test und der U-Test. Beim erstgenannten wird entfaltetes Protein vorgelegt und durch Verdünnung des Denaturierungsmittels die Rückfaltung initiiert. Nach verschiedenen Rückfaltungszeiten erfolgt die zweite Mischphase mit einer hochmolaren Denaturierungskonzentration um die Entfaltung zu starten. Diese Reaktion wird spektroskopisch verfolgt. Die Amplituden der einzelnen Phasen der beobachteten Entfaltungskinetik ist ein Maß für die Anzahl gebildeter Faltungszustände zum Zeitpunkt des Abbruchs der Rückfaltungsreaktion^{89; 155; 156}.

Für den N-Test wurden Proteinkonzentrationen zwischen 6-30 μM in 4 M Harnstoff entfaltet und für 30 Minuten equilibriert. Die Rückfaltung wurde durch eine 6-fache Verdünnung gestartet (1-5 μM N-BAR in 0,66 M Harnstoff) und nach 0,1-300 s Rückfaltungszeit die Entfaltung durch eine Einfachmischung mit 8,3 M Harnstoff initiiert. Die entsprechende Entfaltungskinetik wurde mit der

gleichen Anregungswellenlänge, Bandbreite, *cutoff*-Filter und Temperatur wie für Einfachsprungexperimente aufgenommen und mit Gleichung 23 ausgewertet.

Der U-Test beinhaltet ein analoges Vorgehen, nur für den entgegengesetzten Fall. Natives Protein wird im ersten Mischschritt entfaltet und nach bestimmten Zeitpunkten der Entfaltung durch Verdünnung die Rückfaltung gestartet. Hierfür wurden 12 μM N-BAR in einer Einfachmischung mit 9 M Harnstoff entfaltet. Nach verschiedenen Entfaltungszeiten wurde durch eine 6-fache Verdünnung mit Rückfaltungspuffer die Entfaltung gestoppt und die Rückfaltung initiiert. Die entsprechende Rückfaltungskinetik wurde wie oben beschrieben verfolgt und mit Gleichung 24 ausgewertet.

Um den Effekt von Isomerisierungen im entfalteten Zustand zu unterbinden, wurde ein Dreifachsprungexperiment durchgeführt. Hierfür wurde natives Protein in einem manuellen Mischungsschritt mit vortemperiertem Harnstoff (4 M Endkonzentration) entfaltet. Die Verweildauer für diesen ersten Schritt muss sicherstellen, dass alle native Struktur schnell aufgelöst wird, bevor die anschließende Isomerisierungsreaktion beginnen kann. Die Entfaltungszeit für diesen ersten Schritt lag für das gesamte Experiment konstant bei 15 s. Anschließend wurde das entfaltete Protein in die *stopped-flow*-Apparatur gegeben, bis zum ersten Mixer vorgeschoben und mit dem nächsten Mischschritt innerhalb der *stopped-flow*-Apparatur in 0,66 M Harnstoff rückgefaltet. Nach verschiedenen Rückfaltungszeiten wurde das Protein wieder in Harnstoff (Endkonzentration 4,5 M) entfaltet und diese Entfaltungsreaktion spektroskopisch verfolgt. Die Auswertung der erhaltenen Entfaltungskinetik erfolgte mit Gleichung 23.

2.10 Langmuir-Filmwaagemessungen

Zur Charakterisierung des Assoziationsverhaltens von N-BAR an Lipidschichten wurden Untersuchungen an einer Lipid-Monoschicht mit Hilfe der Langmuir-Filmwaage durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Untersuchungen an der Luft-Wasser-Grenzfläche, in der sich ein Lipidfilm befindet. Die Lipide bilden hier infolge ihres amphiphilen Charakters eine Monoschicht an der Grenzfläche aus, in der die polaren Kopfgruppen zur wässrigen Subphase orientiert und die hydrophoben Acylketten in die Luft gerichtet sind. Aufgrund des experimentellen Aufbaus können Effekte wie Lipidaggregation weitgehend ausgeschlossen werden. Die Parameter der Monoschicht und der Subphase, wie Lipidzusammensetzung, Temperatur und Ionenstärke, können gut eingestellt und gegebenenfalls variiert werden. Ebenso kann der Einfluss verschiedener Proteinvarianten auf die Lipid-Monoschicht durch Injektion in die Subphase untersucht werden.

Die Filmwaage erlaubt, die verfügbare Fläche pro Molekül auf der Subphase zu messen bzw. zu verändern. Die Messgröße in der Filmwaage ist der Oberflächendruck π , der als Differenz aus den Oberflächenspannungen des reinen Wassers bzw. Puffers (σ_0) und des Lipidfilms (σ) definiert ist:

$$\pi = \sigma_0 - \sigma \quad (28)$$

Über die an einem Filterpapierblättchen angreifende Kraft wurde durch ein Wilhelmy-Messsystem der Oberflächendruck aufgenommen. Das Filterpapierblättchen wurde vor jeder Messreihe ausgetauscht.

Die Lipid-Monoschicht kann in Abhängigkeit der Lipidkonzentration bzw. der zur Verfügung stehenden Fläche pro Molekül verschiedene Phasenzustände einnehmen (Abb. 2-3). Dies ist zu berücksichtigen, da während einer Adsorption von Protein in die Monoschicht kein Phasenübergang stattfinden sollte. Die Nomenklatur der Phasenzustände werden nach ADAMSON benannt¹⁵⁷.

Bei sehr kleinen Oberflächenkonzentrationen ist das Verhalten der Moleküle dem eines zweidimensionalen idealen Gases (G) vergleichbar, d.h. die Moleküle können sich in zwei Dimensionen frei bewegen und es finden keine Wechselwirkungen zwischen den Molekülen statt. Durch Kompression der Monoschicht, also durch die Verringerung der Fläche pro Molekül, treten die Moleküle stärker in Wechselwirkung zueinander, sind aber noch ungeordnet. Diese Phase wird als flüssig-expandierte Phase (LE) bezeichnet. Außerdem kommt es in dieser Phase zu einem starken Druckanstieg, bis bei konstantem Oberflächendruck ein Phasenübergang in die flüssig-kondensierte (LC) Phase stattfindet. Diese Phase ist vergleichbar mit der kristallinen Packung von Paraffinketten, in der die Acylketten nur noch gegen die Flächennormale neigbar sind. Eine weitere Verringerung der Fläche führt zu einem kontinuierlichen Übergang in die festanaloge Phase (S), in der die Lipide nur noch senkrecht zur Flächennormale orientiert sein können. Bei einer weiteren Kompression würde es zu einem Kollaps und damit zu einer irreversiblen Zerstörung der Monoschicht kommen. Es wurden

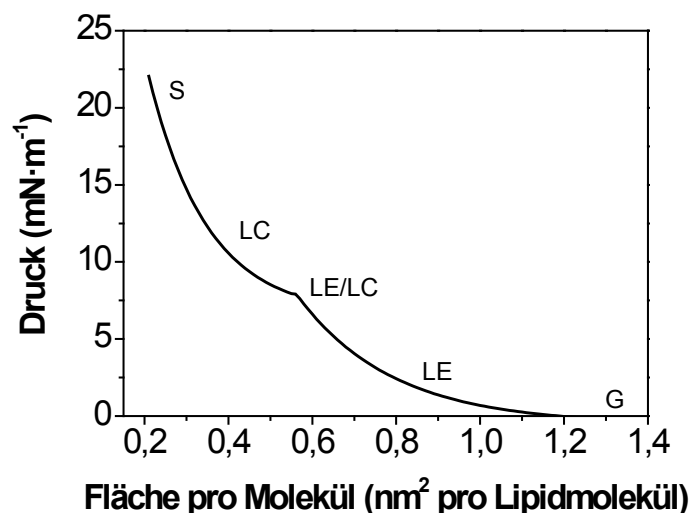


Abb. 2-3: π/A -Isotherme eines gesättigten bzw. *all-trans* Lipids mit Bezeichnung und Lage der einzelnen Phasen. (Die Abkürzungen der einzelnen Phasen sind im Text erklärt)

insgesamt zwei verschiedene Filmwaagetypen benutzt: für die Messung der π/A -Isothermen wurde eine große Filmwaage (783,0 x 68,4 x 3,0 mm³) mit beweglichen Barrieren verwendet. Für die zeitabhängigen Adsorptionsmessungen wurde eine runde Variante (\varnothing 30,0 mm x 13,9 mm) ohne Barrieren verwendet. Beide Tröge und die Barrieren waren mit Teflon beschichtet, Messung wurden mit einem Thermostat auf 20°C temperierbar und mit einer Plexiglashaube abgedeckt. Nach jeder die Tröge mit Hellmanexlösung gereinigt, mit Reinstwasser gründlich gewaschen und mit Puffer (20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, pH 7,4) bis zur entsprechenden Füllhöhe befüllt. Mit einer Dosierspritze wurde tropfenweise die Lipidlösung (gelöst in Chloroform) auf die Subphase gespreitet. Durch den geringen Dampfdruck des Chloroforms verdampft dieses und es bildet sich eine Lipidmonoschicht.

Zur Aufzeichnung von π/A -Isothermen wurde die Konzentration an Lipid so gewählt, dass es sich vor der Kompression in der gasanalogen Phase befindet. Nach einer halbstündigen Equilibrierungszeit wurde der Film bei einer konstanten Geschwindigkeit bis zum Kollaps komprimiert.

Für die zeitabhängigen Adsorptionsmessungen wurden durch Variation des Spreitvolumens verschiedene Ausgangsdrücke gewählt. Bevor die Proteinlösung anschließend in die Subphase injiziert wurde, gab es auch eine Equilibrierungszeit von circa einer halben Stunde. Die Protein- bzw. Peptidkonzentration betrug 100 nM in der Subphase. Die Druckänderung wurde nach Injektion der Protein- bzw. Peptidlösung verfolgt. Während der Messung wurde die Subphase leicht gerührt, um eine homogene Mischung zu gewährleisten. Es musste allerdings beachtet werden, dass dadurch eine beschleunigte Adsorption stattfand.

Die zeitabhängigen Adsorptionsmessungen können dafür verwendet werden, um den maximalen Insertionsdruck zu ermitteln. Der maximale Insertionsdruck entspricht hierbei dem Oberflächendruck, bis zu dem ein Einbau der Protein- bzw. Peptidlösung in die Monoschicht erfolgt. Dafür wird die Druckdifferenz zwischen dem Startdruck, also dem Druck kurz vor Injektion der Proteinlösung in die Subphase und dem Enddruck ($\Delta\pi$ -Werte) gegen den Startdruck (π_0) aufgetragen. Anschließend wurde mit diesen Werten eine lineare Regression durchgeführt und der Schnittpunkt mit der x-Achse bestimmt, der den maximalen Insertionsdruck anzeigte. Lag dieser Wert bei $\geq 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (entspricht dem Monolayer-Bilayer Äquivalenzdruck) konnte davon ausgegangen werden, dass ein spontaner Einbau des Proteins bzw. Peptids in eine Doppelschicht erfolgt.

2.11 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Messung der Interaktion von N-BAR und SH3 konnte mit Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) verfolgt werden. Die Methode basiert hauptsächlich darauf, dass während der Bildung des Komplexes Wärme entsteht oder verbraucht wird. Diese Wärmeänderung kann sehr genau

gemessen werden. Hierbei befinden sich eine Messzelle und eine Referenzzelle in einer adiabatischen Ummantelung. Die Messzelle wird mit einem Bindungspartner gefüllt, in der eine Spritze mit dem zweiten Bindungspartner geführt wird. Die Referenzzelle ist mit Wasser bzw. Puffer gefüllt. Über die eingeführte Spritze wird automatisch der zweite Bindungspartner in die Messzelle in kleinen Volumina hinzutitriert. Gleichzeitig dient das Endstück der Spritze als Rührer, um eine konstante homogene Durchmischung der Lösung zu gewährleisten. Das Messsignal ist die Änderung der Heizleistung in der Messzelle nach Zugabe des zweiten Bindungspartners gegenüber der Referenzzelle, um die gleiche Temperatur in beiden Messzellen aufrecht zu erhalten. Diese Differenzheizleistung wird als Funktion der Zeit aufgetragen. Durch mehrere aufeinanderfolgende Injektionen wird schrittweise der vorgelegte Bindungspartner in den sich bildenden Komplex überführt bis eine Sättigung erreicht ist. Die Sättigung zeigt sich durch eine sehr viel schwächere Wärmebildung, die meist nur noch durch die Verdünnung des hinzutitrierten Bindungspartners resultiert. Dieser Verdünnungseffekt ist unabhängig der Komplexbildung und muss von dieser abgezogen werden. Deshalb wurde immer eine Referenzmessung durchgeführt, in der der zweite Bindungspartner aus der Spritze in Puffer titriert wurde und die entstandene Wärme von der Komplexbildungswärme abgezogen. Der umgekehrte Fall, in der Puffer zu dem ersten Bindungspartner in der Messzelle titriert wurde, wurde aufgrund der sehr geringen Verdünnung und der damit geringen Wärmeänderung vernachlässigt.

Die Messungen erfolgten an einem VP-ITC bei 20°C. Alle verwendeten Proben wurden vor ihrer Verwendung über Nacht im Exsikkator im gleichen Puffer (20 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumphosphat, pH 7,4) dialysiert und entgast. In die Messzelle wurde N-BAR bzw. SH3 mit 100 µM (bezogen auf die Monomerkonzentration) vorgelegt und anschließend 30 Injektionen mit 5 µl bei der ersten Injektion und 10 µl Bindungspartner bei den nachfolgenden Injektionen hinzutitriert. Die Konzentration an Bindungspartner betrug 1,5 mM. Die genau eingesetzten Konzentrationen wurden nach der Messung spektroskopisch bestimmt. Die Rührgeschwindigkeit betrug 307 Umdrehungen pro Minute. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der zum Gerät gehörenden Software. Als Modell für die Auswertung diente auch hier ein einfaches Bindemodell mit einer Bindestelle, d.h. ein Monomer von N-BAR bindet eine SH3-Domäne.

2.12 Liposomen- und Bicellpräparation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Liposomen verschiedener Zusammensetzung hergestellt. Die verwendeten Lipide hierfür waren in Chloroform gelöst. Entsprechende Volumina wurden für die verwendete Lipidmischung gemischt und anschließend das Chloroform abgedampft um einen Lipidfilm zu erhalten. Zur Rehydratisierung wurde ein entsprechendes Volumen Puffer (20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, pH 7,4) hinzugegeben, um eine Lipidkonzentration von 5

mg/ml bzw. 10 mg/ml zu erreichen. Die Suspension wurde eine Stunde auf Eis stehen gelassen und anschließend extrudiert. Hierfür wurde die Suspension durch eine Polycarbonat-Membran mit 200 nm Porengröße gedrückt, welche zuvor mit Puffer equilibriert wurde. Die Lagerung der Liposomen erfolgte bei 4 °C.

Bicellen bestehen aus einer Mischung von Detergens (DHPC) und Lipid (DMPC bzw. DMPG). Für die Präparation wurden die lyophilisierten Substanzen eingewogen und getrennt für eine Stunde bei 42°C mit Puffer (10 mM Natriumphosphat, pH 6,0) hydratisiert. Anschließend wurden die Suspensionen von DHPC mit DMPC bzw. DMPG im Verhältnis 5:1 gemischt¹⁵⁸.

2.13 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie eignet sich sehr gut, um Morphologieänderungen an Liposomen zu untersuchen. Die Messtechnik basiert darauf, dass beschleunigte Elektronen beim Auftreffen auf das Objekt in Abhängigkeit der Coulomb-Kraft zwischen Elektron und Atomkern unterschiedlich stark gestreut oder gebeugt werden. Die Coulomb-Kraft hängt hierbei vom Abstand des Elektrons und Atomkernes ab, sowie von der Ordnungszahl des Kerns und der Beschleunigungsspannung der Elektronen. Stark gestreute oder gebeugte Elektronen gelangen somit nicht in die Bildebene und diese Stellen erscheinen im Endbild dunkel. Je geringer die Materie, desto weniger werden die Elektronen gestreut und desto heller ist der entstehende Ausschnitt. Die hier verwendeten Proben wurden bei der Präparation mit Uranylacetat kontrastiert, da Atome mit höherer Ordnungszahl zu einer stärkeren Streuung und stärkerem Kontrast führen.

Alle verwendeten Proben enthielten, sofern nicht anders angegeben, 0,5 mg/ml Liposomen und 5 µM Protein, welche zuvor für zwei Stunden bei Raumtemperatur zusammen inkubiert wurden. Anschließend wurden die jeweiligen Proben auf ein Formvar-beschichtetes Kupfernetzchen gebracht und für eine Minute inkubiert. Nach dem *blotten* wurde mit Wasser gewaschen und mit einer 1 %igen (w/v) Uranylacetat-Lösung für 30 Sekunden gefärbt. Überschüssige Lösung wurde entfernt und die Netzchen für mindestens 12 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die Aufnahmen erfolgten an einem EM 900 mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV und einer *slow scan* Kamera. Die Präparation und Aufnahme der Proben wurden freundlicherweise von Andrea Auerswald und PD Dr. Annette Meister durchgeführt.

2.14 Analytische Ultrazentrifugation

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation kann auf Grundlage der Bewegung von Proteinen während der Zentrifugation das Molekulargewicht bestimmt werden. Die Messgröße ist die Absorption des Proteins während der Zentrifugation. Es werden zwei Typen von Experimenten unterschieden. Bei den Experimenten zur Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit bewegt

sich das Protein mit einer bestimmten Geschwindigkeit durch die Lösung, die durch den Einfluss der Zentrifugal-, Auftriebs- und Reibungskraft zustande kommt. Große Moleküle wandern hierbei schneller durch die Lösung, kleine Moleküle hingegen langsamer. Der Sedimentationskoeffizient kann aus der Geschwindigkeit ermittelt werden und ist von der Masse, dem Reibungskoeffizienten und dem partiellen spezifischen Volumen des Proteins sowie von der Dichte der Lösung abhängig. Der zweite Typ von Experimenten sind die Sedimentationsgleichgewichtsläufe. Hier wird mit niedriger Drehzahl gearbeitet, bei der sich ein Gleichgewicht zwischen der Sedimentation und der Diffusion einstellt. Aus der Svedberg-Gleichung kann hieraus das apparente Molekulargewicht bestimmt werden.

Bei allen Messungen wurden Doppelsektorzellen verwendet, die ein gleichzeitiges Messen von Puffer und Probe erlauben und somit das Messsignal gleich um das Puffersignal korrigiert werden kann. Die Zentrifugation erfolgte in einer Optima XL-A Zentrifuge mit einem An50Ti Rotor bei 20°C. Für Gleichgewichtsläufe wurde bei 12000 rpm für 40 h zentrifugiert. Geschwindigkeitsläufe erfolgten bei 40000 rpm für 4 h. Bei allen Messungen erfolgte die Detektion bei 230 nm. Die Messung und Auswertung der Experimente wurde freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie durchgeführt.

2.15 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie erlaubt eine individuelle Auflösung von einzelnen Atomen bzw. Atomgruppen und damit eine strukturelle Charakterisierung von Biomolekülen in Lösung, ebenso wie dynamische Prozesse einzelner Atome bzw. Aminosäuren. Aufgrund einer starken Signalüberlagerung der Protonen in den NMR-Spektren werden die Protonenresonanzen durch ein Heteroatom (^{13}C und/oder ^{15}N) über die indirekte Dimension entzerrt. Dies führt somit zu einer besseren Auflösung aller Signale.

Alle NMR-Messungen wurden an Spektrometern des Typs AvanceIII600 mit einem Raumtemperaturprobenkopf und an einem AvanceIII800 mit einem Kryoprobenkopf aufgenommen. Die spektralen Daten wurden mit NMRPipe prozessiert und mit NMRView ausgewertet. Für die meisten Experimente wurde sowohl ^{13}C als auch ^{15}N als NMR-aktiver Heterokern verwendet. Die Peptid- bzw. Proteinkonzentration betrug wenn nicht anders angegeben 1 mM in 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, 10% D₂O (v/v), pH 7,4. Alle Spektren wurden bei 20°C aufgenommen.

Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Das HSQC-Experiment (*H*eteronuclear *S*ingle-*Q*uantum *C*orrelation) bietet eine gute aminosäurespezifische Auflösung im Hinblick auf Faltung oder konformationelle Änderungen im

Protein. Hier wurde nur die Korrelation zwischen dem am Stickstoff gebundenen Proton und dem Stickstoff in der Peptidbindung verwendet. Somit bestehen die detektierten Kreuzsignale hauptsächlich aus dem Proteinerückgrat und einigen stickstoffenthaltenen Seitenketten. Die hier verwendete Pulssequenz ist das fHSQC¹⁵⁹, welches eine Weiterentwicklung der konventionellen Pulssequenz darstellt. Zusätzlich enthält die Pulssequenz die WATERGATE-Sequenz zur besseren Wasserunterdrückung¹⁶⁰. Die Spektren wurden mit je 8 bzw. 16 Scans, 1024 x 256 komplexen Datenpunkten aufgenommen und durch einfaches *zero filling* prozessiert. Als Fensterfunktion diente in beiden Dimensionen eine \cos^2 -Funktion. Die spektrale Breite wurde auf 13 ppm (¹H) und 30 ppm (¹⁵N) festgelegt. Für die Auswertung wurde nur die Tieffeldregion der Protonendimension zwischen 4,7 ppm und 11 ppm verwendet, da hier alle Amidprotonen zu finden sind.

Dreidimensionale NMR-Spektroskopie zur Rückgratzuordnung

Für die Zuordnung der Kreuzsignale aus den HSQC-Spektren wurden dreidimensionale NMR-Experimente durchgeführt¹⁶¹⁻¹⁶³. Hierfür wurden doppelmarkierte Proben (¹³C/¹⁵N) verwendet. Somit können verschiedene Kopplungen innerhalb der Kette ausgenutzt werden, um Informationen zu erhalten, die eine sequenzspezifische Zuordnung erlauben. Bei allen verwendeten Pulssequenzen zeigt der Name den Weg der Magnetisierung an. Im HNCA-Experiment wird die Magnetisierung vom Amidproton über den Stickstoff zum C_α und wieder zurück transferiert und auf den Protonen detektiert. In allen Experimenten wird ausgenutzt, dass eine ähnliche skalare Kopplung zwischen dem Stickstoff und dem C_α der eigenen Aminosäure ¹J(N,C_α) von etwa 15 Hz und zwischen dem Stickstoff und dem C_α der Vorgängeraminosäure ²J(N,C_{α-1}) von etwa 7 Hz vorliegt. Somit gelangt über ein Amidproton und dem Stickstoff die Magnetisierung zu dem C_α der eigenen Aminosäure und der Vorgänger-Aminosäure. Durch die sequenzielle Zuordnung aller erhaltenen Resonanzen kann jedes Kreuzsignal im HSQC zugeordnet werden. Weiterhin wurde noch das HNCACB verwendet, welches zusätzlich noch Informationen zum C_β der Seitenkette der eigenen und Vorgänger-Aminosäuren enthält. Die HN(CO)CA- und HN(CO)CACB-Experimente transferieren zusätzlich noch die Magnetisierung über den Carbonylkohlenstoff, wobei nur die Resonanzen der Vorgänger-Aminosäure detektiert werden. Somit können die Resonanzen der eigenen und Vorgänger-Aminosäuren voneinander unterschieden werden. Im Anhang sind die genauen Pulssequenzen aufgelistet. Für alle Experimente wurde eine Datenmatrix von 1024(¹H) x 64(¹⁵N) x 96(¹³C) komplexen Punkten aufgenommen. Auch hier wurden sie mit einfachem *zero filling* und \cos^2 -Fensterfunktionen prozessiert. Ein weiteres dreidimensionales Zuordnungsexperiment war das ¹⁵N-editierte NOESY-HSQC Experiment, welches aus dem NOESY und fHSQC besteht und für jedes Kreuzsignal aus dem HSQC, sowohl Signale der eigenen Protonen als auch Signale räumlich benachbarter Protonen enthält. Hier wurde eine Datenmatrix von 1024(¹H) x 64(¹⁵N) x 256(¹H) komplexen Punkten

aufgenommen. Die Spektren wurden mit einfachem *zero filling* und \cos^2 -Fensterfunktionen prozessiert.

NMR-Titration zur Lokalisierung von Bindestellen

Eine NMR-Titration erlaubt auf Grundlage eines HSQC-Spektrums eine Aminosäure-spezifische Aussage zur Bindung eines Liganden. Die Titration wurde für die Bindung von SH3 an das Exon10-Peptid durchgeführt. Hierfür wurden 16 einzelne Titrationspunkte pipettiert und anschließend ein HSQC-Spektrum mit 16 *scans* und 1024 x 128 komplexen Punkten gemessen. Die Prozessierung erfolgte wie bereits beschrieben. Alle Proben enthielten d_6 -DSS und wurden vor ihrer Auswertung hierauf referenziert. Eine Verschiebung der betroffenen Kreuzsignale kann beobachtet werden, wenn sich beide Bindungspartner im schnellen Austausch befinden. Die mittlere chemische Verschiebung $\Delta\delta$ kann dann durch folgende Formel berechnet werden¹⁶⁴:

$$\Delta\delta(\text{ppm}) = \sqrt{\frac{\Delta\delta(^1\text{H})^2 + \frac{1}{25}\Delta\delta(^{15}\text{N})^2}{2}} \quad (29)$$

mit $\Delta\delta(^1\text{H})$ und $\Delta\delta(^{15}\text{N})$ der Veränderung in der chemischen Verschiebung der Protonen- bzw. Stickstoffdimension. Als Modell für die Bindung diente auch hier, dass nur eine Bindestelle für den Liganden vorhanden ist. Dadurch konnte die erhaltene Titrationskurve mit folgender Formel angepasst werden¹⁶⁵:

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{\text{max}} \cdot \frac{[P_0] + n \cdot [L_0] + K_D - \sqrt{([P_0] + n \cdot [L_0] + K_D)^2 - 4n[P_0][L_0]}}{2[P_0]} \quad (30)$$

mit K_D der Dissoziationskonstanten, n der Stöchiometrie, $[P_0]$ und $[L_0]$ die Ausgangskonzentration von Protein und Ligand. Die Konzentration von SH3 betrug 45,7 μM und die Exon10-Konzentration wurde zwischen 0-400 μM variiert.

Heteronuklearer NOE zur Detektion der Beweglichkeit

Mit Hilfe des heteronukleare NOE (hNOE) können Aussagen bezüglich Dynamik von individuellen Amidgruppen des Proteinrückgrats auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala getroffen werden^{166; 167}. Hierbei wird mit Hilfe einer Abfolge von 120° -Pulsen in einem Abstand von 5 ms über einen Zeitraum von 3 s die Sättigung des Amidprotons induziert und die Auswirkung der dipolaren Kopplung auf den direkt gebundenen Stickstoff genutzt. Dies geschieht durch den Vergleich von zwei Spektren: eines

Materialien und Methoden

mit Sättigung und eines ohne Sättigung. Die Intensität des hNOEs ergibt sich aus dem Verhältnis des jeweiligen Kreuzsignals aus dem gesättigten Spektrum (S_{sat}) und dem Spektrum ohne Sättigung (S_{unsat}).

$$hNOE = \frac{S_{\text{sat}}}{S_{\text{unsat}}} \quad (31)$$

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Faltung von N-BAR

3.1.1 Thermodynamische Stabilität von N-BAR

Die thermodynamische Stabilität von N-BAR wurde mit Hilfe der spektroskopischen Eigenschaften, der intrinsischen Fluoreszenz von drei Tryptophan- und sieben Tyrosinresten pro Monomer sowie der für α -helikale Strukturen charakteristischen Elliptizität ermittelt. Der Entfaltungsvorgang ist durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität und eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums gekennzeichnet, während die Elliptizität während der Entfaltung zunimmt.

Die thermodynamische Stabilität von N-BAR wurde über Harnstoff-induzierte Gleichgewichts-

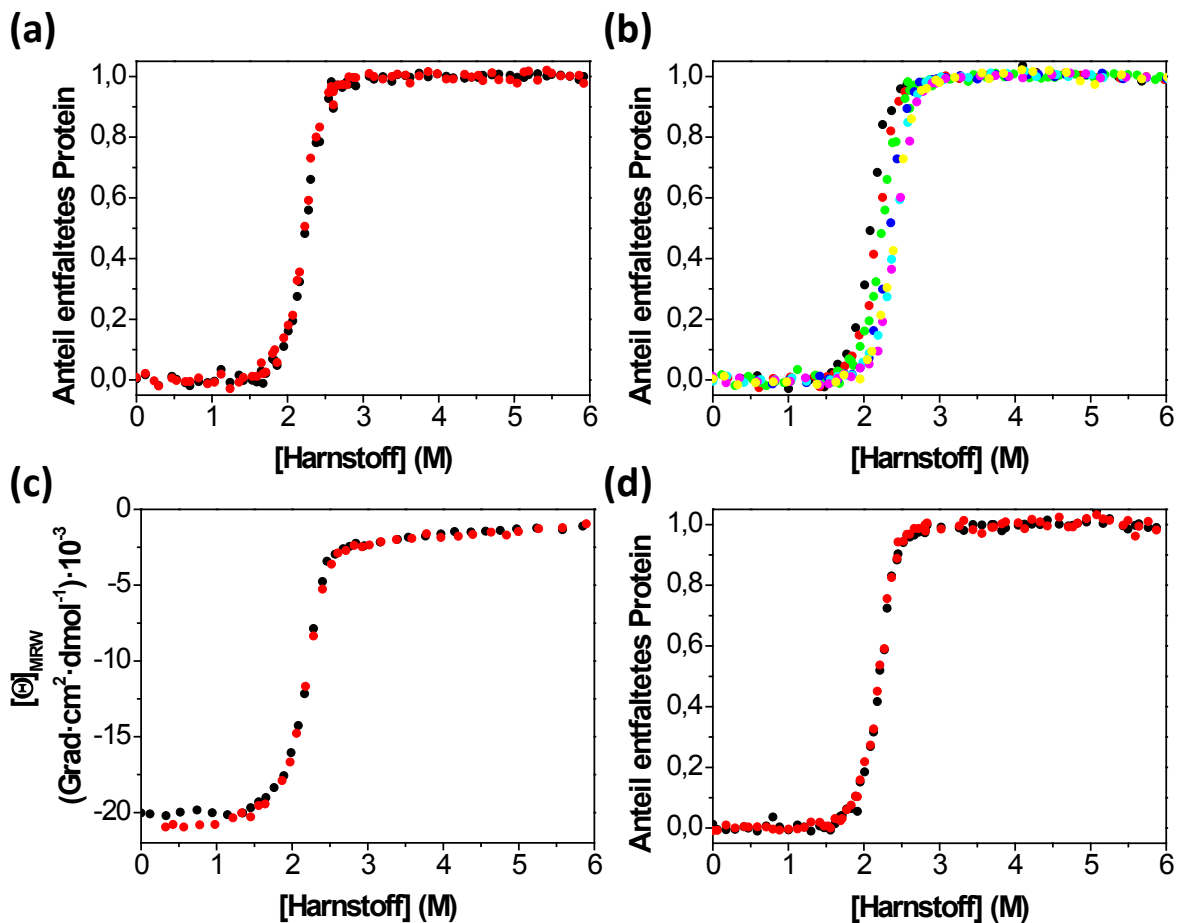


Abb. 3-1: Harnstoff induzierte Gleichgewichtsübergänge von N-BAR.

Alle Übergangskurven wurden bei 15°C gemessen und mit Gleichung (19) ausgewertet. (a) Gezeigt sind die normierten Übergangskurven gemessen mit Fluoreszenz (schwarze Punkte) und fern-UV-CD-Spektroskopie (rote Punkte). (b) Übergangskurven bei verschiedenen Proteinkonzentrationen: ● 0,1 μM, ● 0,5 μM, ● 1 μM, ● 2,5 μM, ● 5 μM, ● 10 μM und ● 25 μM. (c) Übergangskurven von nativem Protein aus gemessen (schwarze Punkte) und von entfaltetem Protein aus 7 M Harnstoff gemessen (rote Punkte). (d) Vergleich der Übergangskurven von N-BAR (schwarze Punkte) und $\Delta(1-32)$ N-BAR (rote Punkte) gemessen mit Fluoreszenz.

Ergebnisse

übergang ermittelt. Die Harnstoff-induzierte Entfaltung wurde über das Fluoreszenzsignal bei 327 nm und über das fern-UV-CD-Signal bei 225 nm verfolgt (Abb- 3-1). Beide Übergangskurven zeigen eine hochkooperative einstufige Übergangskurve. Beide Sonden ergeben einen homologen Verlauf, was auf einen simultanen Verlust von Sekundär- und Tertiärstruktur hinweist. Dies lässt erkennen, dass keine hochpopulierten Intermediate im Gleichgewicht nachgewiesen werden können und nur zwei Zustände vorliegen. Zum Nachweis der Reversibilität des Entfaltungsüberganges wurde das gleiche Experiment wiederholt, wobei diesmal entfaltetes Protein aus 7 M Harnstoff in niedrigere Harnstoffkonzentrationen gegeben wurde. Der Vergleich dieser gemessenen Rückfaltungskurve mit der bereits zuvor gemessenen Entfaltungskurve zeigte zwei identische Gleichgewichtsübergänge mit dem gleichen Übergangsmittelpunkt und einer homologen Kooperativität. Der Übergangsmittelpunkt ist aufgrund des Dimers eine Funktion der Proteinkonzentration, wobei eine Erhöhung der Proteinkonzentration zu einer Verschiebung des Mittelpunktes zu höheren

Tab. 3-1 Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter aus Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergänge

N-BAR Variante	Proteinkonzentration (μM)	ΔG _U (kJ·mol ⁻¹)	m-Wert (kJ·mol ⁻¹ ·M ⁻¹)	[Harnstoff] _{0,5} (M)	
WT	Fluoreszenz	0,1	85,6±0,1	23,2±0,1	2,10±0,01
	Fluoreszenz	0,5	85,7±0,1	24,1±0,1	2,18±0,01
	fern-UV-CD		85,6±0,1	23,9±0,1	2,19±0,01
	Fluoreszenz	1,0	86,5 ±2,1	24,5±0,9	2,25±0,10
	fern-UV-CD		85,5±0,8	24,3±0,3	2,23±0,05
	Fluoreszenz	2,5	86,3±0,1	24,3±0,1	2,35±0,01
	fern-UV-CD		85,9±0,1	24,2±0,1	2,33±0,01
	Fluoreszenz	5,0	85,8±0,1	24,0±0,1	2,42±0,01
	fern-UV-CD		85,3±0,1	24,0±0,1	2,41±0,01
	Fluoreszenz	10,0	84,5±0,2	24,0±0,1	2,45±0,02
	fern-UV-CD		84,9±0,1	24,1±0,1	2,43±0,01
	Fluoreszenz	25,0	84,0±0,1	24,8±0,1	2,42±0,01
	Fluoreszenz ^a	1,0	82,3±0,1	22,9±0,1	2,22±0,01
	fern-UV-CD ^a		81,6±0,1	22,7±0,1	2,20±0,01
ΔBAR	Fluoreszenz	1,0	84,5 ±0,7	24,2±0,1	2,19±0,03
	fern-UV-CD		85,2±0,6	24,4±0,1	2,20±0,02
WT	Fluoreszenz ^b	1,0	93,8±0,1	25,7±0,1	2,42±0,01
	fern-UV-CD ^b		92,8±0,8	25,7±0,3	2,39±0,05

Alle Übergänge wurden bei 15°C gemessen und mit Gleichung (19) ausgewertet. Die angegebenen Fehler resultieren aus der jeweiligen Anpassung. Die Proteinkonzentration bezieht sich auf die Dimerkonzentration.

^a Gleichgewichtsübergang von entfaltetem Protein aus 7 M Harnstoff

^b Gleichgewichtsübergang zusätzlich mit 100 mM Na₂SO₄

Harnstoffkonzentrationen führte. Der Übergangsmittelpunkt verschob sich bei einer Erhöhung der Proteinkonzentration von 0,1 μM auf 25 μM von 2,1 M auf 2,42 M Harnstoff. Demnach konnten die Übergangskurven nach einem dimeren Zweizustandsmodell mit Gleichung (19) ausgewertet werden. Die freie Gibbs-Enthalpie der Entfaltung für 1 μM Proteinkonzentration betrug $86,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, der Kooperativitätsfaktor (m -Wert) lag bei $24,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ und der Übergangsmittelpunkt bei 2,25 M Harnstoff. Die ermittelten Stabilitätsparameter sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Zur Überprüfung welchen Einfluss die Helix0 auf die Gesamtstabilität des Proteins besitzt, wurde eine Proteinvariante hergestellt, wobei die ersten 32 Aminosäuren deletiert wurden ($\Delta(1-32)\text{N-BAR}$). Diese Proteinvariante zeigte einen identischen Kurvenverlauf zum Wildtypprotein. Daraus lässt sich ableiten, dass die Helix 0 keinen Einfluss auf die Gesamtstabilität des Proteins besitzt.

3.1.2 Kinetische Faltungsphasen von N-BAR

3.1.2.1 Beobachtbare Rück- und Entfaltungsphasen von N-BAR

Die gemessenen Gleichgewichtsübergänge zeigten einen einfachen Faltungsmechanismus von N-BAR. Zur Detektion des zeitlichen Verlaufs der Faltung wurden Rückfaltungs- und Entfaltungskinetiken bei verschiedenen Harnstoff- und Proteinkonzentrationen mit verschiedenen spektroskopischen Methoden gemessen.

Für Rückfaltungskinetiken wurde N-BAR zuerst in 4 M Harnstoff entfaltet, bevor die Rückfaltung in die entsprechende Harnstoffkonzentration initiiert wurde. Entfaltungskinetiken wurden durch die Mischung von nativem Protein mit Harnstoffkonzentrationen größer als 2,2 M initiiert. In Abb. 3-2 ist exemplarisch eine Rückfaltungskinetik in 0,4 M Harnstoff und eine Entfaltungskinetik in 5 M Harnstoff gezeigt. Die gemessenen Rückfaltungskinetiken zeigten ein komplexes Verhalten und beinhalten insgesamt vier Rückfaltungsphasen, während die Entfaltungskinetiken durch eine biphasische Reaktion angepasst werden konnten. Zur besseren Beschreibung werden die einzelnen Rückfaltungsphasen von der schnellsten zur langsamsten mit λ_{1-4} und die Entfaltungsphasen mit $\lambda_{5,6}$ bezeichnet.

Bei der Rückfaltungsreaktion war zu erkennen, dass sich in Abhängigkeit der eingesetzten Harnstoffkonzentration mehrere kinetische Phasen voneinander unterscheiden ließen. Die Kinetik begann mit der Bildung eines hypofluoreszenten Zustands in den ersten Millisekunden (Abb. 3-2a), welcher eine niedrigere Fluoreszenz besaß als der native und entfaltete Zustand. Die anschließende Fluoreszenzzunahme ließ sich nicht allein durch ein einzelnes Rückfaltungsereignis beschreiben, sondern beinhaltete zwei verschiedene Rückfaltungsereignisse, welche im gleichen Zeitbereich abliefen und eine ähnliche Geschwindigkeitskonstante aufwiesen. Zusätzlich zeigte eine dieser Rückfaltungsphasen eine Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration und ist damit eine Reaktion 2. Ordnung (Abb.8-1). Damit zeigte diese Phase die Bildung eines dimeren Zustandes. Bei

Ergebnisse

einer Harnstoffkonzentration von 0,4 M ergaben sich Geschwindigkeitskonstanten von $\lambda_1 = 25 \text{ s}^{-1}$, $\lambda_2 = 5,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $\lambda_3 = 0,6 \text{ s}^{-1}$, wobei λ_2 von der eingesetzten Proteinkonzentration abhing und somit die Dimerisierungsreaktion zeigte. Die verschiedenen nachgewiesenen Rückfaltungsphasen deuten auf das Vorhandensein verschiedener Faltungszustände hin. Zusätzlich konnte eine vierte, langsame Rückfaltungsphase nach einer längeren Entfaltung in 4 M Harnstoff beobachtet werden. Diese Reaktion wurde separat durch manuelle Mischung gemessen und ergab eine Geschwindigkeitskonstante von $\lambda_4 = 0,01 \text{ s}^{-1}$. Die Entfaltungskinetiken zeigten einen biphasischen Verlauf mit der Bildung eines hyperfluoreszenten Zustands, welcher eine höhere Fluoreszenz aufwies als der entfaltete bzw. native Zustand (Abb. 3-2b). Bei 5,5 M Harnstoff ließen sich Konstanten von $\lambda_5 = 24,2 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda_6 = 7,5 \text{ s}^{-1}$ messen. Die Entfaltungskinetiken unterhalb von 4,4 M Harnstoff zeigten nur noch die langsame Entfaltungsphase, während die schnelle Entfaltungsphase nur noch durch Doppelsprungexperimente sichtbar gemacht werden konnte. Zur Vereinfachung der gemessenen Fluoreszenzkinetiken wurden Fluoreszenzanisotropiekinetiken gemessen. Die Rückfaltungskinetik zeigte einen einphasigen Verlauf (Abb. 3-2c) und die beobachtete Geschwindigkeitskonstante war abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration. Damit zeigt die Rückfaltungsreaktion nur den Dimerisierungsschritt der Rückfaltung an. Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante konnte verwendet werden, um die Anzahl der freien Parameter bei der Anpassung von Gleichung (24) an die Gesamtfluoreszenz basierten Rückfaltungskinetiken zu reduzieren. Alle anderen Rückfaltungsereignisse, die mit Fluoreszenz detektiert wurden, zeigten keine Änderung in der Anisotropie. Die gemessene Entfaltungskinetik (Abb.3-2d) zeigte einen biphasischen Verlauf mit den gleichen Geschwindigkeitskonstanten, wie sie bereits bei der Fluoreszenz gemessen wurden. Um unterscheiden zu können, in welchen der beobachteten Phasen Sekundärstrukturelemente gebildet bzw. aufgelöst werden, wurden außerdem fern-UV-CD detektierte Kinetiken gemessen. Sowohl in den Rückfaltungs- als auch in den Entfaltungsexperimenten (Abb. 3-2e-f) zeigte sich jeweils nur eine Phase. Die Rückfaltung zeigte eine Abnahme der Elliptizität und damit eine Zunahme des α -helikalen Anteils im Protein. Diese Rückfaltungskinetik zeigte ebenfalls eine Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration und ist damit auch eine Reaktion 2. Ordnung. Da die Dimerisierungsreaktion mit allen drei verwendeten Sonden detektierbar war, handelt es sich hierbei um ein globales Faltungsereignis. Weiterhin ist in den Rückfaltungskinetiken ein *burst* zu sehen, welcher auf die Bildung von Sekundärstrukturelementen in der Totzeit des *stopped-flow*-Experiments hinweist. Um nachzuweisen, ob ein dimerer Zustand während der Totzeit entsteht, wurde das Verhältnis aus Start- und Endwert gegen die Proteinkonzentration aufgetragen (Abb. 8-2). Hierbei zeigte sich jedoch keine Änderung. Auch in den fern-UV CD-Kinetiken ist keine Signaländerung für die langsamste Rückfaltungsphase (λ_4) zu sehen. Die Entfaltungskinetik zeigte eine Zunahme der

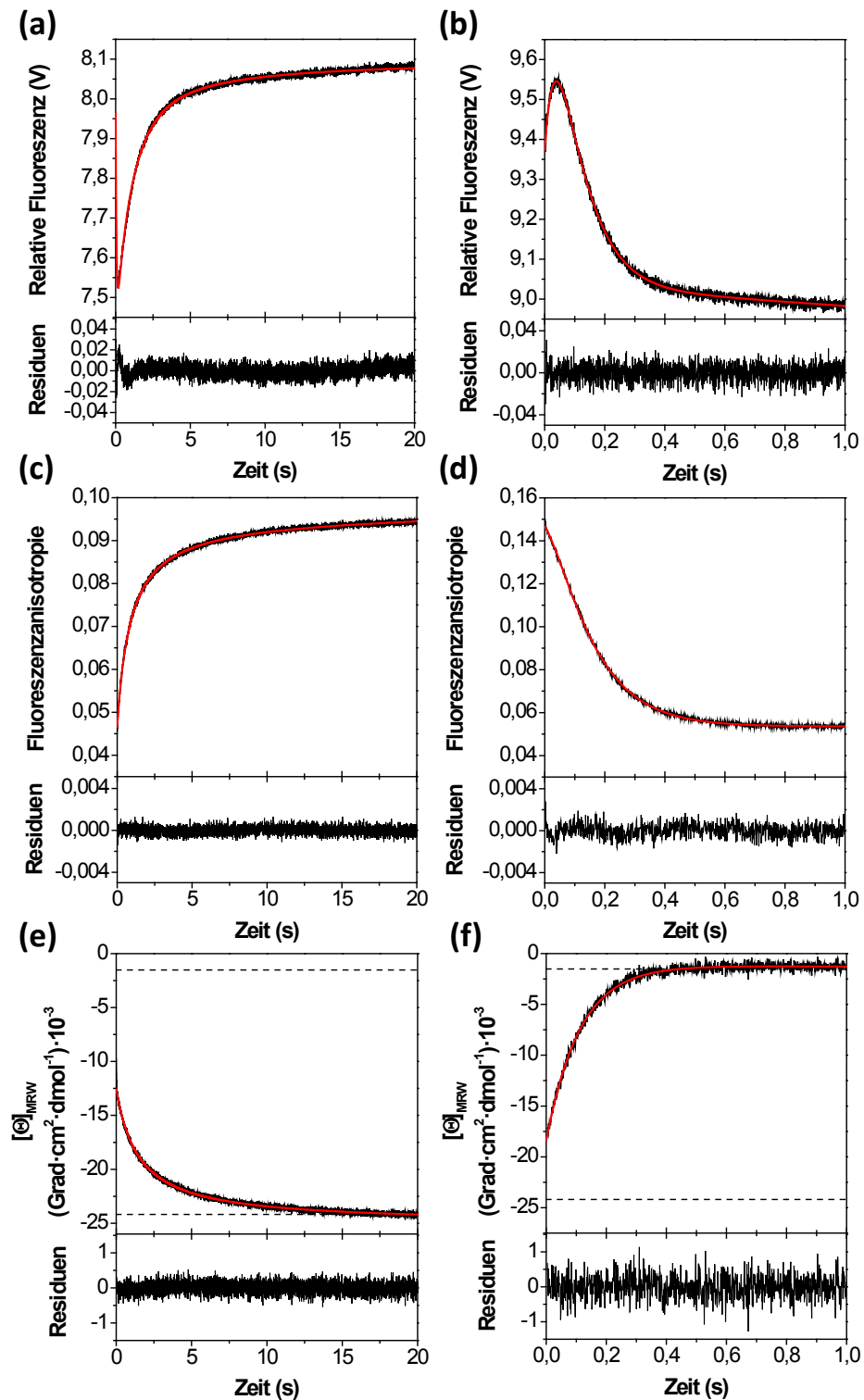


Abb. 3-2: Rück- und Entfaltungskinetiken von N-BAR mit verschiedenen Detektionsmethoden.

Die Rück- und Entfaltungskinetiken wurden mit totaler Fluoreszenz (a) und (b), mit Fluoreszenzanisotropie (c) und (d) und fern-UV CD (e) und (f) detektiert. Die Anpassung der jeweiligen Kinetik erfolgte mit (a) einer Kombination aus zweifach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung und einer Reaktion 2. Ordnung, (b) einer zweifachen exponentiellen Reaktion 1. Ordnung, (c) und (e) mit einer Reaktion 2. Ordnung und (d) und (f) mit einer einfachen Reaktion 1. Ordnung. Die Residuen zeigen die jeweilige Abweichung von der angepassten Funktion an die Messwerte. Die gestrichelten Linien zeigen die theoretischen Werte des nativen bzw. entfaltetes Zustands.

Ergebnisse

Elliptizität. Es handelt sich hierbei um eine einphasige Reaktion mit einer Geschwindigkeitskonstante von $6,4 \text{ s}^{-1}$ und ist demnach vergleichbar mit der langsamsten Entfaltungsphase (λ_6) in den fluoreszenz-basierten Messungen.

3.1.2.2 Harnstoffabhängigkeit der CD-basierten Faltungsphasen

In Abb. 3-3a sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der CD-detektierten Rück- und Entfaltung im Chevron-Plot zusammengefasst. Die Entfaltungsphase zeigte über einen großen Bereich eine lineare Harnstoffabhängigkeit. Erst über 5 M Harnstoff zeigte sich eine kleine Abweichung von dem linearen Verhalten. Der Rückfaltungsbereich wies im Bereich niedriger Harnstoffkonzentrationen eine starke Abweichung vom linearen Verhalten. Dieser Effekt wird als 'rollover' bezeichnet und zeigt meist einen vorgelagerten schnelleren Faltungsschritt an. Beide beobachtbaren Phasen liefen im Übergangsbereich zusammen, was die Reversibilität des Faltungsprozesses verdeutlicht. Die Amplituden der detektierten Rück- und Entfaltungsreaktion sind in Abb. 3-3b dargestellt. Die Rückfaltungsamplitude zeigte eine starke Harnstoffabhängigkeit, während die Entfaltungsamplitude nahezu unverändert blieb. Im Übergangsbereich näherten sich beide Amplituden einem Minimalwert an. Zum Nachweis eines möglichen *burst-phase*-Intermediates wurden die Start- und Endwerte der jeweiligen Messung gegen die entsprechende Harnstoffkonzentration aufgetragen. Der Verlauf der Endwerte zeigt eine Kurve, welche dem Gleichgewichtsübergang aus 3.1.1 entspricht. Die Startwerte der Rückfaltung zeigten eine deutliche Abweichung von der entfalteten Basislinie (gestrichelte Linie in Abb.3-3c). Dieser Effekt war bei den Startwerten der Rückfaltungsphase sehr stark ausgeprägt und zeigte einen Signalverlust während der Totzeit des *stopped-flow*-Experiments. Dieses Verhalten begründet auch die starke Harnstoffabhängigkeit der Rückfaltungsamplitude. Da sich die Startwerte der Rückfaltung mit zunehmender Harnstoffkonzentration mehr der entfalteten Basislinie annäherten, was eine Erhöhung des Messsignales bedeutete und gleichzeitig die Endwerte nahezu konstant bleiben, nahm die Amplitude der beobachteten Reaktion zu. Erst mit dem Beginn des Übergangsbereiches ab 1,5 M Harnstoff nahm die Amplitude der beobachteten Reaktion ab, da in diesem Bereich der Übergangsbereich beginnt und die Endwerte der Rückfaltungsreaktion abnehmen. Die Startwerte der Entfaltungsreaktion hatten einen ähnlichen Verlauf wie die Endwerte dieser Reaktion und waren dadurch über einen großen Harnstoffbereich konstant. Außerdem zeigten sie auch eine gute Übereinstimmung mit der nativen Basislinie. Erst im Übergangsbereich nahmen auch sie ab und erreichten einen ähnlichen Wert wie die Amplituden der Rückfaltung.

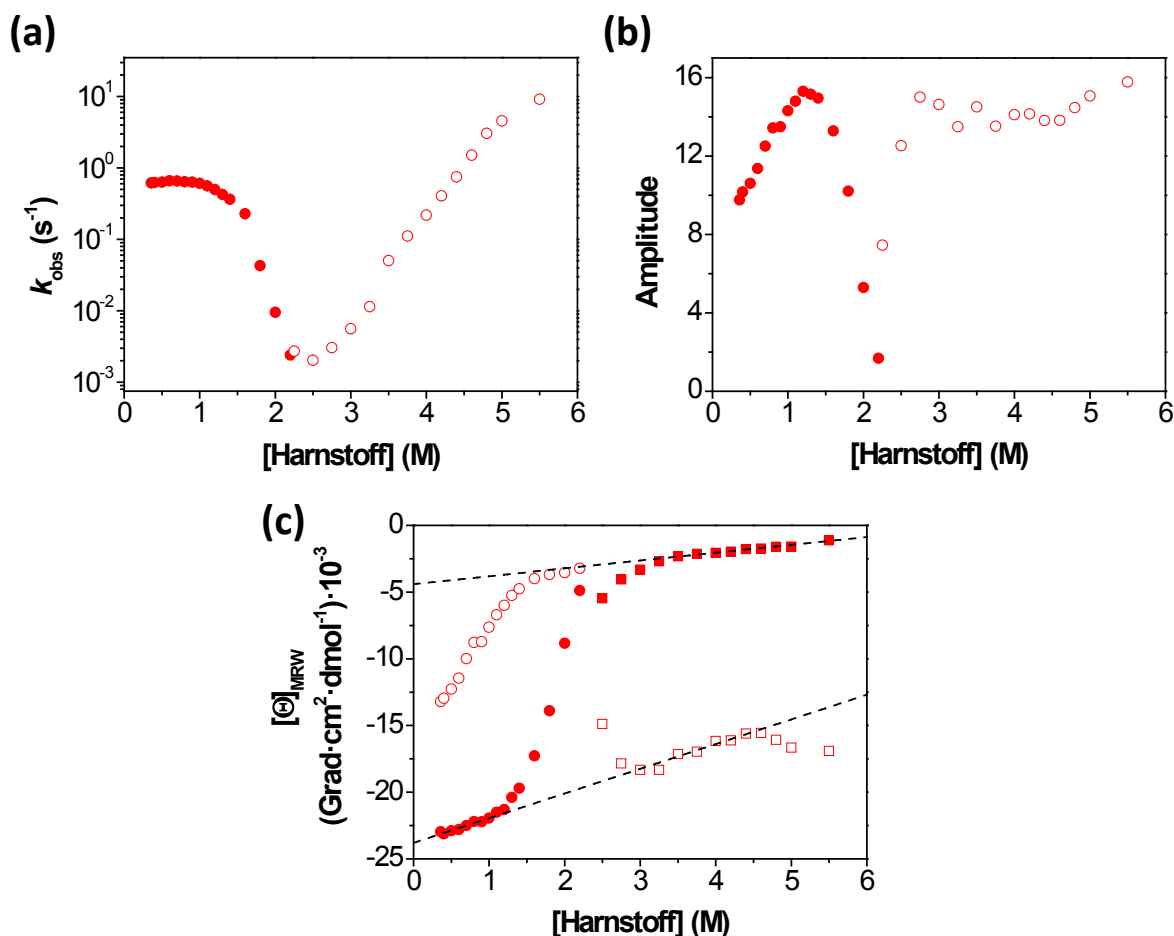


Abb. 3-3: Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden der fern-UV CD-detektierten Rück- und Entfaltung von N-BAR als Funktion der Harnstoffkonzentration.

Dargestellt sind (a) die Geschwindigkeitskonstanten und (b) die Amplituden der Rückfaltung (geschlossene Symbole) und der Entfaltung (offene Symbole). (c) Start/Endwertanalyse der Rückfaltung (Kreise) und der Entfaltung (Quadrate). Die offenen Symbole repräsentieren den Startwert der Reaktion und die geschlossenen Symbole den entsprechenden Endwert. Die gestrichelten Linien repräsentieren die native und entfaltete Basislinie.

3.1.2.3 Harnstoffabhängigkeit der fluoreszenz-basierten Faltungsphasen

Der Chevron-Plot der fluoreszenz-basierten Messungen zeigt ein sehr viel komplexeres Verhalten, da hier mehr Rückfaltungs- bzw. Entfaltungsphasen aufgelöst werden können (Abb. 3-4). Die beiden Entfaltungsphasen zeigten eine lineare Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration über den gesamten Entfaltungsbereich. Jedoch war der Anstieg bei beiden Phasen stark unterschiedlich. Die schnelle Entfaltungsphase zeigte nur eine geringe Abhängigkeit, während die langsame Phase eine starke Abhängigkeit über mehrere Größenordnungen aufwies. Der Verlauf der langsamen Entfaltungsphase war identisch zu den CD-basierten Messungen. Der Rückfaltungsbereich erstreckte sich zwischen 0,4 M und 2,4 M Harnstoff. Unterhalb von 1 M Harnstoff ließen sich insgesamt vier Rückfaltungsphasen nachweisen. Die schnellste Rückfaltungsphase ließ sich nur bis 1 M Harnstoff nachweisen und zeigt in diesem Konzentrationsbereich keine Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Die langsamste beobachtbare Rückfaltungsreaktion besaß über den

gesamten Rückfaltungsbereich nahezu keine Harnstoffabhängigkeit. Ursache für diese Phase kann eine Prolylisomerisierung sein. Die Amplitude der Reaktion betrug etwa 15% der Gesamtamplitude der Rückfaltungsreaktion. Der genaue Nachweis einer Prolylisomerisierung kann mit einer Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase, einer spezifischen Klasse von Enzymen, welche diese Reaktion katalysieren, erfolgen. Es wurden verschiedene Vertreter aus allen bekannten Isomerasenfamilien verwendet, wobei mit keiner getesteten Isomerase eine Beschleunigung und damit ein Einfluss auf diese Rückfaltungsreaktion beobachtet werden konnte. Dies bedeutet, dass ein direkter Nachweis nicht möglich ist. Die Dimerisierungsreaktion zeigte die stärksten Änderungen im Rückfaltungsbereich. Im Bereich zwischen 0,4 M und 1,0 M Harnstoff zeigte sich keine Abhängigkeit mit der Harnstoffkonzentration (*rollover*-Effekt). Anschließend fiel diese Phase ab und lief im Übergangsbereich mit der langsamsten Entfaltungsphase zusammen. Der Verlauf dieser Phase war identisch mit dem Verlauf aus den CD-basierten Messungen und zeigte dementsprechend die gleiche Faltungsphase an. λ_3 war nur bis etwa 1,2 M Harnstoff aufzulösen, bevor diese Phase mit λ_2 zusammenlief. Ab dieser Konzentration waren beide Phasen nicht mehr voneinander zu unterscheiden. Im Bereich von 0,4 M bis 1,2 M Harnstoff zeigte λ_3 zunächst eine Zunahme der Geschwindigkeitskonstante mit steigender Harnstoffkonzentration. Ob dieser Verlauf auf eine weitere nicht detektierbare Phase hinweist, kann nicht ausgeschlossen werden. Da diese Phase jedoch keine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zeigte, konnte ein Assoziations-Dissoziationsverhalten von Dimeren oder höheren Oligomeren ausgeschlossen werden.

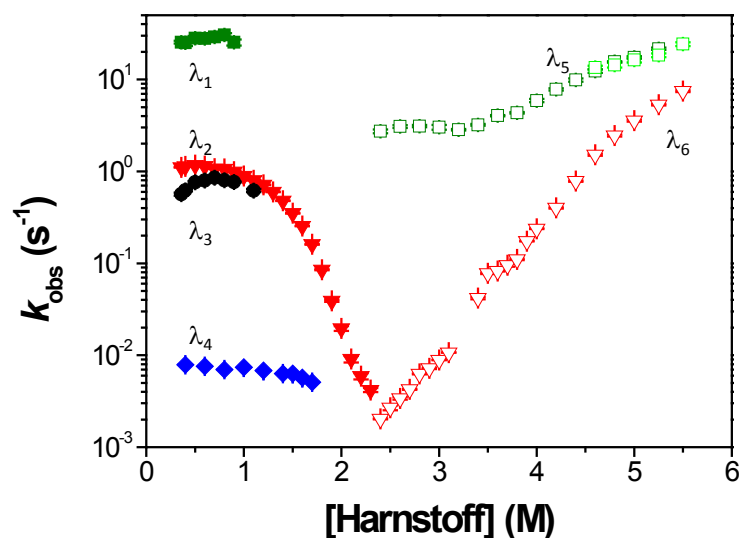


Abb. 3-4: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltung von N-BAR als Funktion der Harnstoffkonzentration.

Aufgetragen sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltung gegen die Harnstoffkonzentration. Die geschlossenen Symbole zeigen hierbei die Rückfaltungsphasen, die offenen Symbole die Entfaltungsphase. Die Symbole zeigen die Phasen λ_{1-4} , die Symbole zeigen die Phasen λ_{5-6} . Die hellgrünen und dunkelgrünen Symbole in λ_5 entsprechen den Geschwindigkeitskonstanten aus Einzelsprungexperimenten (hellgrün) und Doppelsprungexperimenten (dunkelgrün).

3.1.2.4 Untersuchung der Natriumchloridkonzentrations- und Temperaturabhängigkeit der langsamsten Rückfaltungsphase

Zur genaueren Untersuchung der langsamsten Rückfaltungsreaktion wurde diese einmal bei verschiedenen Konzentrationen an Natriumchlorid gemessen sowie bei verschiedenen Temperaturen. In Abb. 3-5a ist die Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstante gegen die eingesetzte Konzentration an Natriumchlorid zu sehen. Hierbei ist zu erkennen, dass keine Abhängigkeit dieser Faltungsphase mit zunehmender Ionenstärke besteht. Dieses Verhalten deutet auf eine Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung hin, da diese von der Ionenstärke unabhängig ist.

In Abb. 3-5b und c ist die Temperaturabhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante als Arrhenius-Auftragung gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine deutliche Temperaturabhängigkeit besteht, aber kein linearer Verlauf existiert. Es zeigt sich ein konvexer Verlauf, mit einer Änderung der Steigung zwischen 20°C und 22°C. Demnach lassen sich zwei verschiedene Ereignisse detektieren. Nach der Arrhenius-Gleichung ergaben sich zwei Aktivierungsenergien von 54,4 kJ·mol⁻¹ und

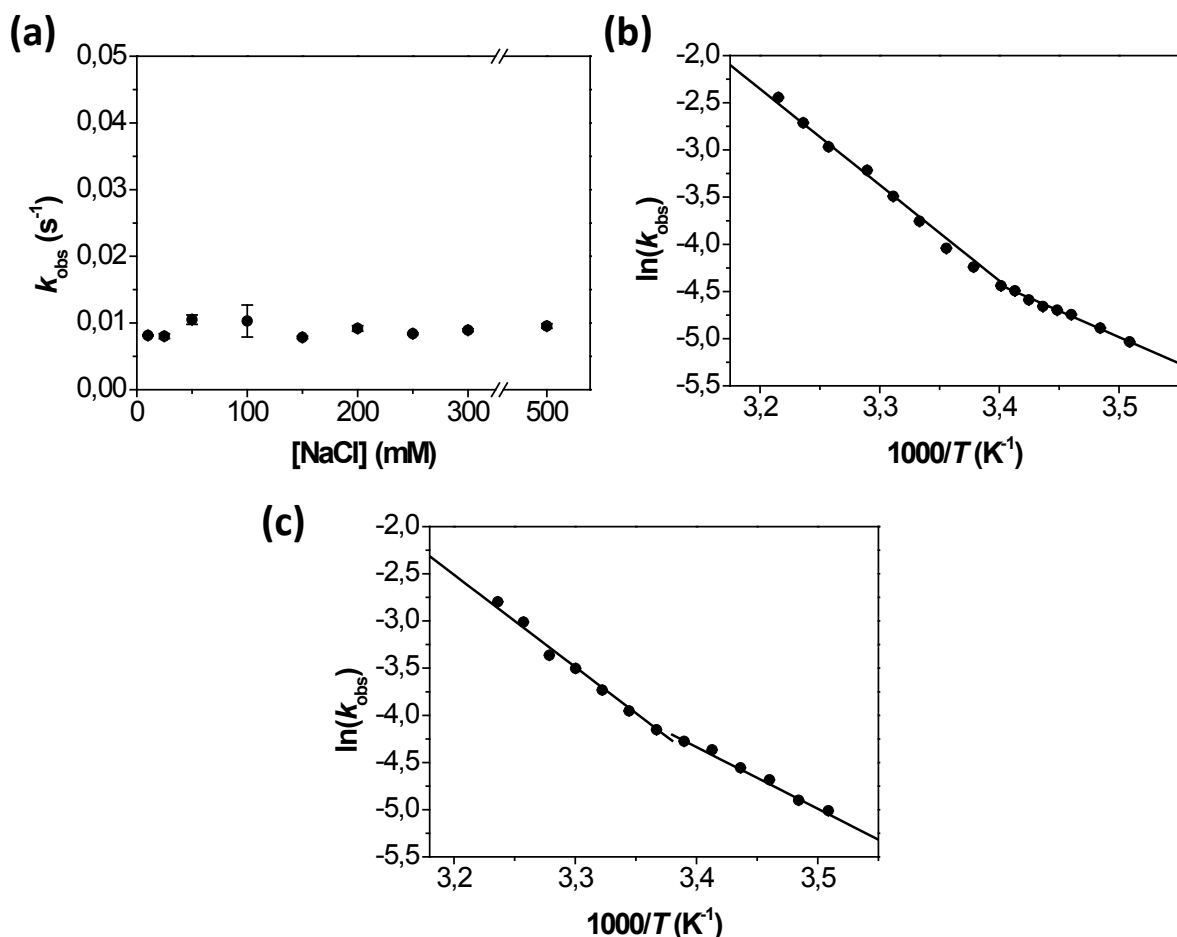


Abb. 3-5: Abhängigkeit der langsamsten Rückfaltungsphase (λ_4) von der Ionenstärke und Temperatur.

Gezeigt ist die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der langsamsten Rückfaltungsphase bei verschiedenen Konzentrationen an Natriumchlorid. (b) und (c) zeigen die Arrhenius-Auftragung der Geschwindigkeitskonstante der langsamsten Rückfaltungsphase bei (b) 100 mM NaCl und (c) 300 mM NaCl. Die durchgezogene Linie zeigt die jeweilige Anpassung mit der Arrhenius-Gleichung (26) für den jeweiligen Bereich.

Ergebnisse

84,5 kJ·mol⁻¹. Die Aktivierungsenergie von 84,5 kJ·mol⁻¹ entspricht dem Wert für eine Peptidyl-prolyl *cis/trans*-Isomerisierung. Die Abweichung vom linearen Verhalten im Niedrigtemperaturbereich kann nicht erklärt werden. Um zu untersuchen, ob eine Erhöhung der Konzentration an Natriumchlorid einen Einfluss auf den konvexen Verlauf hat, wurde ein weiterer Arrhenius-Plot bei 300 mM Natriumchlorid gemessen. Hier ist zu erkennen, dass wieder eine starke Temperaturabhängigkeit bestand, aber der konvexe Verlauf über den gesamten Messbereich erhalten bleibt und der detektierte Arrhenius-Plot identisch zu dem Arrhenius-Plot bei 100 mM Natriumchlorid ist. Die Anpassung mit Gleichung (26) ergibt hier Aktivierungsenergien von 56,5 kJ·mol⁻¹ und 81,3 kJ·mol⁻¹. Die höhere Aktivierungsenergie liegt auch im Bereich der erwarteten Aktivierungsenergie für eine Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung.

3.1.2.5 Thermodynamische und kinetische Charakterisierung der N-BAR- Prolinmutante P95S

Um nachzuweisen, dass es sich bei der langsamsten Rückfaltungsphase um eine Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung handelt, wurde Prolin95 gegen Serin ausgetauscht. Dieses Prolin wurde gewählt, da es direkt auf ein Tryptophan folgt und bei allen anderen Prolinen kein Tryptophan bzw. Tyrosin in räumlicher Nähe haben.

Der Einfluss des Aminosäureaustausches auf die thermodynamische Stabilität wurde mit Harnstoff-induzierten Übergangskurven bestimmt (Abb. 3-6). Hier lässt sich ein hochkooperativer Übergang erkennen ohne detektierbare Intermediate im Gleichgewicht. Der Vergleich der fluoreszenz-basierten und fern-UV-CD-basierten Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergänge zeigte einen identischen Kurvenverlauf an, wie auch schon beim Wildtypprotein zu sehen war. Die Kurven wurden mit Gleichung (19) analysiert und zeigten eine leichte Destabilisierung des Proteins. Die ermittelten Werte sind in Tab. 3-2 zusammengefasst. Die fluoreszenz-basierten Kinetiken zeigten eine sehr starke Abweichung zum Wildtypprotein. Sowohl in den Rückfaltungs- als auch in Entfaltungskinetiken war jeweils nur die schnellste Phase sichtbar. Alle anderen Phasen des Wildtypproteins waren nicht beobachtbar. Dies bedeutet, dass nicht nur die langsamste Rückfaltungsphase nicht mehr beobachtbar ist, sondern auch $\lambda_{2,3}$ und λ_6 und damit unter anderem die Dimerisierungsphase. Durch analytische Ultrazentrifugation konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich hierbei immer noch um ein Dimer handelte (Abb. 8-3) und keine Monomere vorlagen. Die Harnstoffabhängigkeit der beiden beobachteten Phasen ist in Abb. 3-6c dargestellt. Hierbei sieht man, dass die schnellste Rückfaltungsphase nur bis etwa 1 M Harnstoff detektierbar und vergleichbar zum Wildtypprotein ist. Anschließend ist jedoch keine weitere Rückfaltungskinetik zu sehen. Der Verlauf des Entfaltungssastes ähnelt mehr dem der langsamen Entfaltungsphase des Wildtypproteins. Dieses Verhalten zeigt eine starke spektroskopische Veränderung der Prolinvariante an. Dadurch ist diese Variante keine gute Möglichkeit zum Nachweis einer Prolylisomerisierung in der langsamsten Rückfaltungsphase. Über

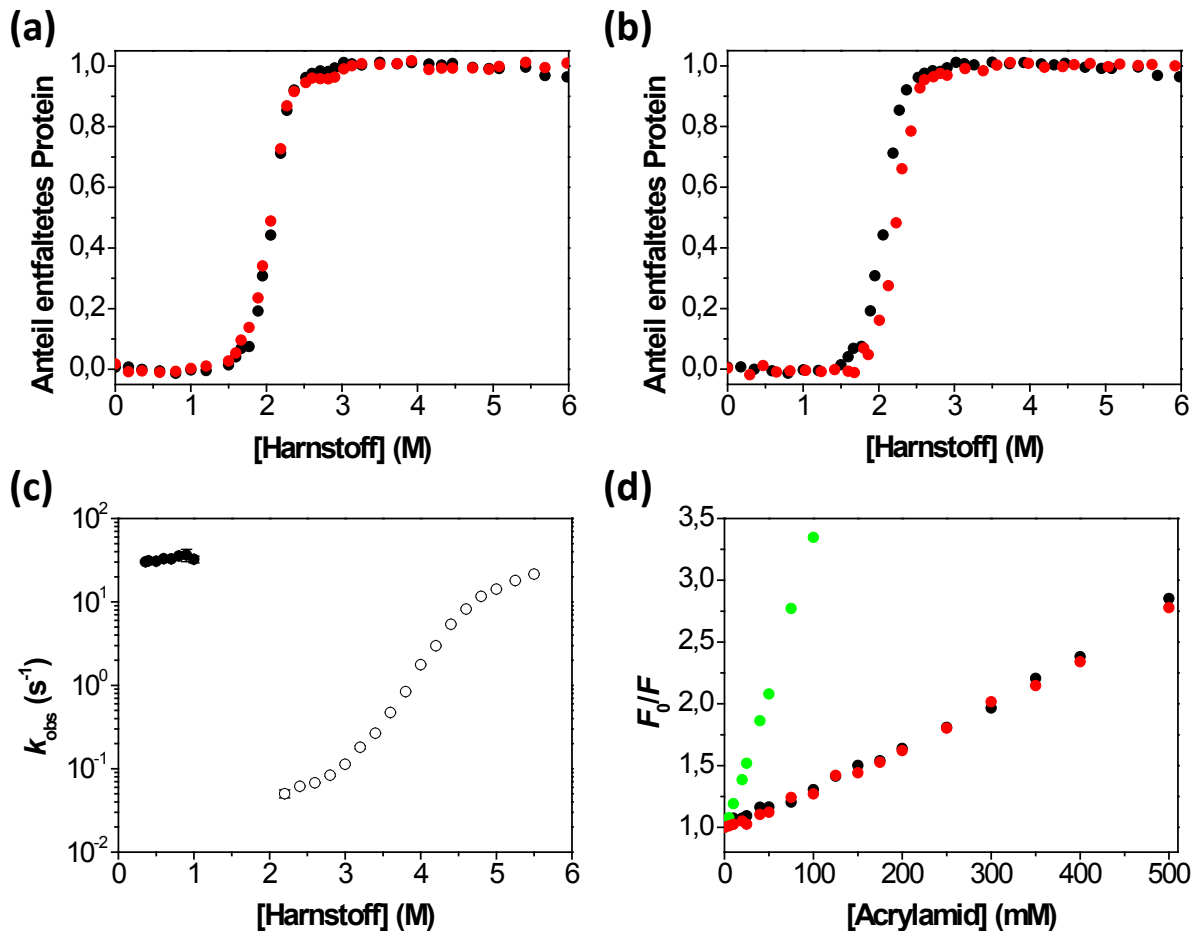


Abb. 3-6: Thermodynamische und kinetische Analyse der N-BAR-Variante P95S und Untersuchungen zur Oberflächenzugänglichkeit der Tryptophane.

(a) Gezeigt ist der Harnstoff-induzierte Gleichgewichtsübergang von N-BAR-P95S gemessen mit Fluoreszenzspektroskopie (schwarze Kreise) und fern-UV CD-Spektroskopie (rote Kreise). Der Übergang wurde bei 15°C gemessen und mit Gleichung (19) ausgewertet. (b) Vergleich der Übergangskurven der N-BAR-Variante P95S (schwarze Kreise) mit dem Wildtypprotein (rote Kreise). (c) Chevron-Plot aller beobachtbaren Rück- und Entfaltungskinetiken von N-BAR-P95S. (d) Stern-Vollmer-Plot der Fluoreszenzlöschung durch Acrylamid. Gezeigt ist der Verlauf der N-BAR-Variante P95S (schwarze Kreise), des Wildtypproteins (rote Kreise) und freiem Tryptophans (grüne Kreise). Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Die Proteinkonzentration betrug 1 μM und die des Tryptophans 2 μM .

die Ursache der starken spektroskopischen Veränderung kann keine Aussage gemacht werden. Die fern-UV-CD-Spektren und Fluoreszenzspektren zeigten keinen detektierbaren Unterschied. Es kann zwar davon ausgegangen werden, dass eine lokale strukturelle Änderung stattfindet, aber eine genaue Interpretation ist nicht möglich. Eine mögliche Änderung der Oberflächenzugänglichkeit und eine damit verbundene Änderung der chemischen Umgebung des Tryptophans kann durch *quenchen* mit Acrylamid erfolgen. In Abb. 3-6d ist der entsprechende Stern-Vollmer-Plot für N-BAR-P95S im Vergleich zum Wildtypprotein und freiem Tryptophan gezeigt. Die ermittelte Stern-Vollmer-Konstante für das Wildtypprotein ($K_{SV} = 3,25 \text{ M}^{-1}$) und die Variante ($K_{SV} = 3,33 \text{ M}^{-1}$) stimmen gut überein und zeigen, dass die Mutation keine Änderung für die Zugänglichkeit des Fluoreszenzquenchers zeigt.

Tab. 3-2 Thermodynamischen Parameter aus Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergängen von N-BAR P95S

Methode	Proteinkonzentration (μM)	ΔG_U ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	m -Wert in ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$)	$[\text{Harnstoff}]_{0,5}$ (M)
Fluoreszenz	1,0	80,1 \pm 0,1	23,4 \pm 0,03	2,08 \pm 0,01
fern-UV CD		79,3 \pm 0,1	23,2 \pm 0,02	2,06 \pm 0,01

Alle Übergänge wurden bei 15°C gemessen und mit Gleichung (19) ausgewertet. Die angegebenen Fehler resultieren aus der jeweiligen Anpassung.

3.1.3 Doppelsprungexperimente zur Charakterisierung der kinetischen Faltungsphasen und Zuordnung zu Faltungsereignissen

3.1.3.1 Bildung von nativem Protein während der Rückfaltung

In den Einfachsprungexperimenten konnten verschiedene Rückfaltungsphasen identifiziert werden. Um auszusagen, welche dieser Rückfaltungsphasen natives Protein bildet, kann mit Hilfe des N-Testes erfolgen.

Die fern-UV-CD-basierten Entfaltungskinetiken zeigen im Gegensatz zu den fluoreszenz-basierten Kinetiken einen monoexponentiellen Verlauf. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Phase die Entfaltungsreaktion von nativem Protein darstellt. Basierend auf dieser Messung wurde der N-Test ausgehend von entfaltetem N-BAR durchgeführt. Hierfür wurde N-BAR im ersten Mischschritt in 0,66 M Harnstoff zurückgefaltet, nach unterschiedlichen Rückfaltungszeiten die Entfaltung in einem zweiten Mischschritt in 4,5 M Harnstoff initiiert und diese Entfaltungsreaktion detektiert. Die fern-UV-CD-basierte Entfaltungskinetik zeigte nach dem Doppelsprung ebenfalls einen biphasischen Verlauf an und musste mit zwei exponentiellen Funktionen 1. Ordnung angepasst werden (Abb. 8-4). Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten ergaben $\lambda_5 = 7,4 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda_6 = 0,76 \text{ s}^{-1}$ und stimmen gut mit den fluoreszenz-basierten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung unter den gleichen Bedingungen überein. Mit längeren Rückfaltungszeiten wurden die Entfaltungskinetiken zunehmend monophasisch und zeigten das gleiche Verhalten wie in den Einfachsprungexperimenten. Dies bestätigt die Vermutung, dass die langsame Entfaltungsreaktion die Entfaltung von nativem Protein darstellt. In Abb. 3-7 ist der Verlauf beider Amplituden als Funktion der Rückfaltungszeit gezeigt. Der Amplitudenverlauf der langsamen Entfaltungsreaktion zeigt einen biphasischen Verlauf und wurde dadurch mit einer zweifachen exponentiellen Funktion 1. Ordnung angepasst. Die Bildung des nativen Proteins erfolgt somit mit zwei verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten von $\lambda_3 = 0,48 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda_4 = 0,01 \text{ s}^{-1}$. Beide Geschwindigkeitskonstanten waren nicht über Einzelsprung-CD-Messungen detektierbar. Sie stimmen jedoch mit den Geschwindigkeitskonstanten aus den Ensemblemessungen der Fluoreszenz überein. Dies zeigt, dass mit λ_3 und λ_4 natives Protein gebildet wird. Der Amplituden-

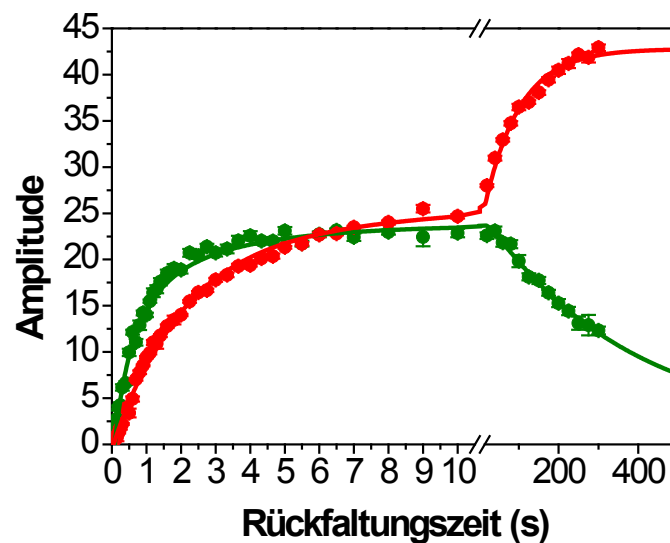


Abb. 3-7: Amplitudenverlauf der Entfaltungsphasen als Funktion der Rückfaltungszeit (N-Test), detektiert mit fern-UV-CD-Spektroskopie.

Die Amplituden der beiden Entfaltungsreaktionen sind als Funktion der Rückfaltungszeit zwischen dem ersten und zweiten Mischschritt dargestellt. Die grünen Symbole repräsentieren die Amplituden der schnellen Entfaltungsphase (λ_5), die roten Symbole die Amplituden der langsamen Phase (λ_6). Die Linien entsprechen der jeweiligen Anpassung: die grüne Linie ist die Summe einer Reaktion 2. Ordnung und einer einfach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung und die rote Linie entspricht der Summe aus einer zweifach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung.

verlauf der schnellen Entfaltungsphase zeigte ebenfalls einen biphasischen Verlauf. Jedoch erfolgte hier mit längerer Rückfaltungszeit ein Abfall der Amplituden (Abb. 3-7). Bei langen Rückfaltungszeiten fällt die grüne Linie auf nahezu null ab, so dass diese Reaktion nicht mehr messbar und damit wieder eine einphasige Entfaltungsreaktion zu erwarten ist. Somit ist über diesen Amplitudenverlauf die Bildung eines intermediären Zustands zu sehen. Zur weiteren Charakterisierung der Bildung des nativen Proteins wurde der N-Test auch mit Fluoreszenz gemessen. In Abb. 3-8 sind exemplarisch zwei Entfaltungskinetiken dargestellt. Die beiden ermittelten Geschwindigkeitskonstanten betragen $\lambda_5 = 6,4 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda_6 = 0,5 \text{ s}^{-1}$ und waren unabhängig von der Rückfaltungszeit. Hierbei ist zu vermerken, dass nach allen Rückfaltungszeiten immer eine biphasische Entfaltungsreaktion detektiert wurde. Weiterhin stimmen beide Konstanten mit den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus den doppelsprungbasierten fern-UV-CD-Entfaltungsreaktionen und den Geschwindigkeitskonstanten aus Einzelsprungexperimenten überein. Der Verlauf der Amplituden von beiden Entfaltungsreaktionen ist in Abb.3-9 als Funktion der Rückfaltungszeit dargestellt. Beide Amplitudenverläufe haben ein analoges Verhalten zu den fern-UV-CD-basierten Amplitudenverläufen. Die Amplituden beider Entfaltungsphasen stiegen in den ersten 10 Sekunden mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstante. Anschließend erfolgte ein entgegengesetzter Verlauf, wobei die Amplituden der schnellen Entfaltungsphase sanken und die der langsamen Entfaltungsphase stiegen. Die Geschwindigkeitskonstante war in beiden Fällen identisch und deutet auf einen abhängigen

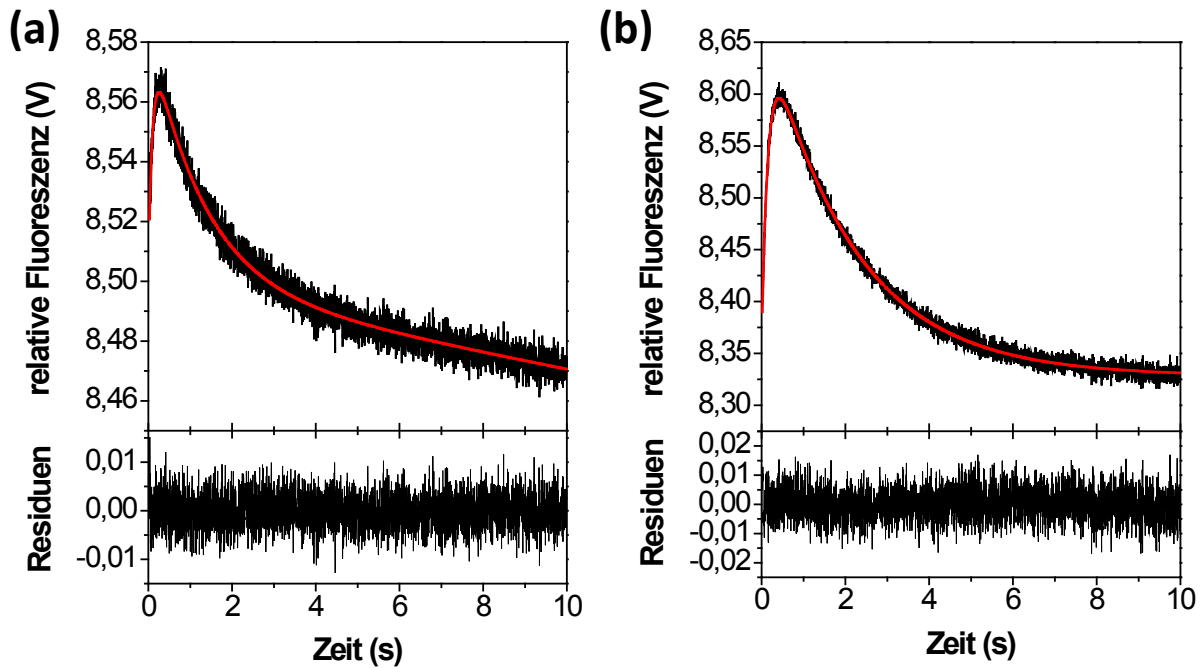


Abb. 3-8: Über Doppelsprungexperiment detektierte Entfaltungskinetiken nach verschiedenen Rückfaltungszeiten.

Dargestellt sind zwei Entfaltungsreaktionen nach einer Rückfaltungszeit von (a) 0,25 Sekunden und (b) 10 Sekunden. Die rote Linie zeigt die Anpassung mit einer zweifach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung. Die Residuen der Anpassung sind darunter dargestellt.

Prozess hin. Im Gegensatz zu den CD-basierten Messungen blieben die Amplituden der schnellen Entfaltungsphase auch nach langen Rückfaltungszeiten erhalten und gingen nicht auf Null zurück. Somit ließen sich insgesamt drei verschiedene Rückfaltungsereignisse nachweisen. Zum Nachweis, in welcher dieser drei Rückfaltungsphasen die Dimerisierung stattfindet, wurde der N-Test bei verschiedenen N-BAR Konzentrationen durchgeführt (in Abb. 3-9 wurden die absoluten Amplituden dargestellt und in Abb. 8-5 die relativen Amplituden). Nur der Amplitudenverlauf der schnellen Entfaltungsreaktion zeigte in den ersten 10 Sekunden eine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration, während alle anderen Rückfaltungsphasen einen identischen Verlauf aufzeigten. Somit beschreibt dieser Amplitudenverlauf die Bildung eines dimeren Zustands aus den Monomeren. Über den Amplitudenverlauf erhält man nun verschiedene Informationen bezüglich des Faltungsmechanismus von N-BAR: Erstens ist die schnellste detektierte Rückfaltungsphase (λ_1) im Amplitudenverlauf nicht erfassbar und stellt damit keinen limitierenden Schritt während der Faltung dar. Zweitens zeigt nur die initiale Amplitudenzunahme aus der schnellen Entfaltungsphase (λ_5) eine Abhängigkeit von der N-BAR Konzentrationen. Somit stellt diese Amplitudenzunahme die Dimerisierungsreaktion dar und konnte mit einer Reaktion 2. Ordnung angepasst werden. Damit wird auch deutlich, dass nur eine Phase existiert, in der eine Dimerisierung der Monomere erfolgt. Drittens zeigen die beiden Amplitudenverläufe ein biphasisches Verhalten, was auf einen komplexeren Faltungsmechanismus hindeutet. Die ansteigenden Amplituden von λ_5 zeigen wie

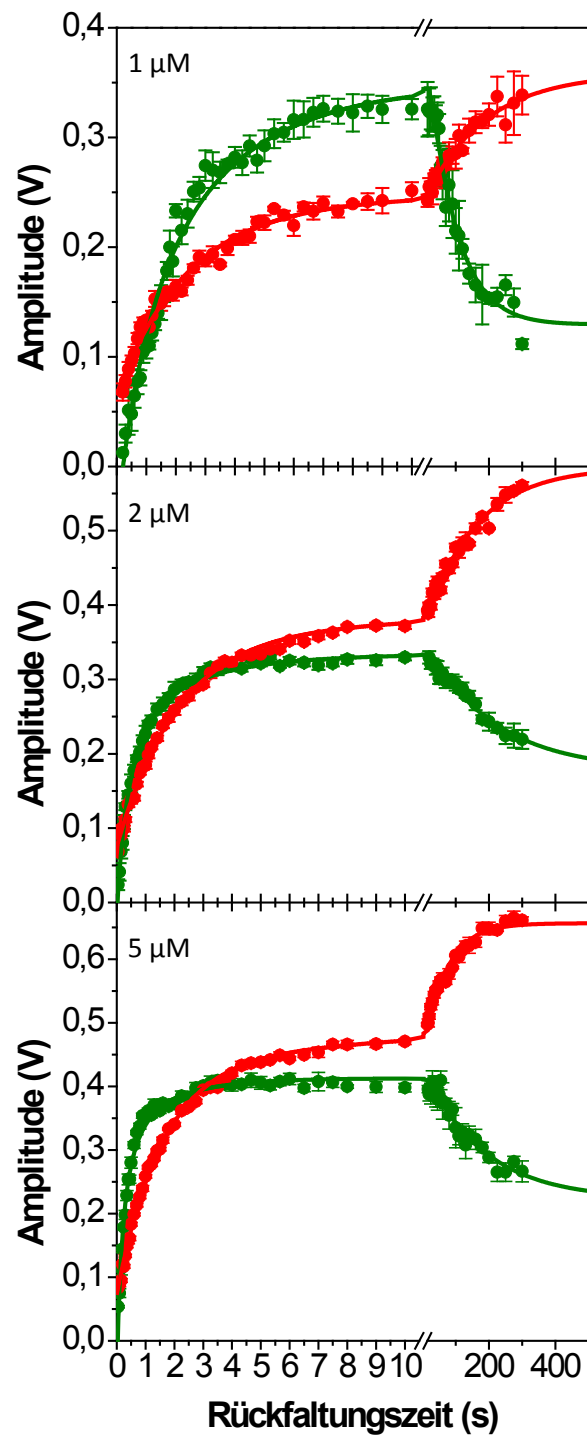


Abb.3-9: Amplitudenverlauf der Entfaltungsphasen als Funktion der Rückfaltungszeit (N-Test) detektiert mit Fluoreszenz und bei verschiedenen Proteinkonzentrationen.

Dargestellt sind die Amplituden der beiden Entfaltungsreaktionen als Funktion der Rückfaltungszeit. Die grünen Symbole zeigen die Amplituden der schnellen Entfaltungsreaktion (λ_5), die roten Symbole die der langsamen Entfaltungsreaktion (λ_6). Die Linien entsprechen der jeweiligen Anpassung: die grüne Linie ist die Summe einer Reaktion 2. Ordnung und einer einfachen exponentiellen Reaktion 1. Ordnung und die rote Linie entspricht der Summe aus einer zweifach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung. Die Konzentrationsangaben entsprechen der Proteinkonzentration während der Rückfaltung.

Ergebnisse

bereits erwähnt die Dimerisierung mit einer Geschwindigkeitskonstante von $\lambda = (3,9 \pm 0,9) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und fallen anschließend ab mit einer Geschwindigkeitskonstante von $\lambda = 0,01 \text{ s}^{-1}$, die unabhängig von der Proteinkonzentration war und den Zerfall dieses gebildeten Zustands bedeutet. Die Amplituden der langsamen Entfaltungsreaktion stiegen zuerst mit einer Geschwindigkeitskonstante von $\lambda = 0,51 \text{ s}^{-1}$ bei jeder eingesetzten Proteinkonzentration und stiegen anschließend mit einer Geschwindigkeitskonstante von $\lambda = 0,01 \text{ s}^{-1}$ weiter an. Da zwei verschiedene Rückfaltungsphasen nachweisbar waren, deutet dies auf ein sequentielles Faltungsmodell hin. Viertens erfolgte das Absinken der Amplitude von λ_5 und der Anstieg von λ_6 mit der gleichen Geschwindigkeitskonstante. Dieses Verhalten zeigt, dass die Bildung des nativen Proteins von dem Zerfall abhängig ist. Dies deutet darauf hin, dass einige Moleküle schneller gebildet werden können als andere. Der relative Endwert ist bei allen gemessenen Proteinkonzentrationen identisch (Abb. 8-5), was bedeutet, dass die relative Konzentration an nativen Molekülen nach vollständiger Rückfaltung gleich ist. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten stimmen außerdem gut mit den gemessenen Geschwindigkeitskonstanten aus Einzelsprungexperimenten überein und zeigen damit die Verknüpfung der einzelnen Faltungsphasen auf. Die Amplitudenverläufe stiegen ohne eine erkennbare lag-Phase an, da beide detektierbaren initialen Phasen eine ähnliche Geschwindigkeitskonstante aufwiesen. Eine Zusammenfassung aller ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus dem N-Test ist in Tab. 3-3 zu finden.

Tab. 3-3 Zusammenfassung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus dem N-Test mit verschiedenen N-BAR-Konzentrationen.

N-BAR Konzentration während der Rückfaltung	Amplituden aus schneller Entfaltungsphase (λ_5)		Amplituden aus langsamer Entfaltungsphase (λ_6)	
	λ_2 in $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	λ_4 in s^{-1}	λ_3 in s^{-1}	λ_4 in s^{-1}
1 μM	$2,6 \cdot 10^5$	0,012	0,42	0,006
2 μM	$4,9 \cdot 10^5$	0,005	0,48	0,007
5 μM	$4,3 \cdot 10^5$	0,006	0,63	0,015

3.1.3.2 Charakterisierung des Faltungsvorgangs unabhängig von der langsamen Rückfaltungsphase

Um den Effekt einer langsamen Isomerisierung im entfalteten Zustand zu unterbinden und einen damit verbundenen Einfluss auf die Rückfaltung wurde eine Kombination von einem Entfaltungsschritt mit einem N-Test durchgeführt („Triple-Jump“ Experiment)^{33; 168}. Das Experiment wurde durch Entfaltung in 4 M Harnstoff gestartet (1. Sprung). Es wurde aber nicht bis zur Einstellung des Gleichgewichts gewartet, sondern bereits nach 15 Sekunden wieder die Rückfaltung initiiert

(2. Sprung). Dadurch wurde sichergestellt, dass alle nativen Moleküle komplett entfaltet wurden, jedoch noch keine Isomerisierung im entfalteten Zustand beginnen konnte. Somit wurde auch sichergestellt, dass zu Beginn der Rückfaltung alle Proline in ihrer nativen *trans*-Konformation vorlagen. Die Rückfaltung wurde auch hier durch Zugabe von Harnstoff nach verschiedenen Rückfaltungszeiten unterbrochen und die entsprechende Entfaltungskinetik detektiert (3. Sprung). Die detektierten Entfaltungskinetiken zeigten den gleichen Verlauf wie bereits oben beschrieben. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten $\lambda_5 = 8,1 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda_6 = 1,1 \text{ s}^{-1}$ sind vergleichbar mit den Geschwindigkeitskonstanten aus den oben durchgeführten Doppelsprungexperimenten. In Abb. 3-10 ist der Verlauf der absoluten Amplituden beider Entfaltungsreaktionen zu sehen (in Abb. 8-6 sind die relativen Amplituden dargestellt). In den ersten 3 Sekunden der Rückfaltung ist ein Anstieg von beiden Amplituden zu verzeichnen. Für längere Rückfaltungszeiten findet keine weitere Änderung der Amplituden statt. Somit wird jeweils nur noch ein Prozess in jedem Verlauf nachgewiesen. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind für die Amplituden der schnellen Entfaltungsphase $\lambda_2 = 9,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und für die langsame Entfaltungsphase $\lambda_3 = 0,86 \text{ s}^{-1}$. Beide Konstanten sind etwa um den Faktor zwei größer als die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten aus Tab. 3-3. Trotz dieser Abweichung kann davon ausgegangen werden, dass sie auf die gleichen Faltungsprozesse zurückgeführt werden können. Auffällig ist der Unterschied in den Amplitudenwerten im Vergleich zum vorhergehend durchgeführten Experiment. Innerhalb der ersten Sekunden wird der Endwert eingenommen. Die ermittelten relativen Amplituden aus dem Dreifachsprungexperiment (Abb. 8-6)

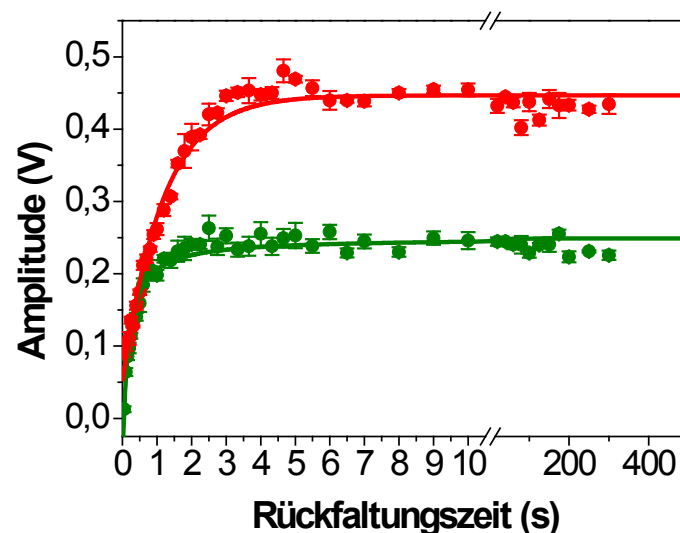


Abb. 3-10: Über Dreifachsprungexperimente detektierte Amplituden der Entfaltung als Funktion der Rückfaltungszeit.

Die beiden Amplituden der Entfaltungsreaktionen sind als Funktion der Rückfaltungszeit dargestellt. Die grünen Symbole entsprechen den Amplituden der schnellen Entfaltungsreaktion (λ_5), die roten Symbole denen der langsamen Entfaltungsreaktion (λ_6). Die grüne Linie entspricht der Anpassung mit einer Reaktion 2. Ordnung und die rote Linie der Anpassung mit einer einfachen Reaktion 1. Ordnung.

Ergebnisse

sind identisch zu den relativen Amplituden aus den Doppelsprungexperimenten (Abb.8-5). Dies deutet darauf hin, dass alle Moleküle, die in dieser Phase gebildet werden, gleich mit der folgenden Reaktion zum nativen Zustand weiterreagieren können und nach den ersten Sekunden vollständig natives Protein vorliegt und keine Zwischenstufen akkumuliert werden.

3.1.3.3 Doppelsprungexperimente zur Untersuchung des Entfaltungsvorgangs

Zur genaueren Untersuchung des Entfaltungsprozesses wurde der U-Test durchgeführt. Hierfür wurde natives Protein in einem ersten Mischschritt in 4,5 M Harnstoff entfaltet. Nach unterschiedlich langen Entfaltungszeiten wurde die Rückfaltung durch Verdünnung auf 0,75 M Harnstoff wieder initiiert und die entsprechende Rückfaltungskinetik spektroskopisch verfolgt. Der U-Test wurde einmal mit *stopped-flow* gemessen, um alle schnellen Rückfaltungsereignisse zu detektieren und einmal mit manueller Mischung, um auch die langsamste Rückfaltungsphase zu untersuchen. In Abb. 3-11 sind exemplarisch zwei *stopped-flow*-Rückfaltungskinetiken bei verschiedenen Entfaltungszeiten gezeigt. Es ist zu erkennen, dass zu allen Entfaltungszeiten alle drei schnellen Rückfaltungsereignisse, die auch im Einzelsprung sichtbar sind, detektiert werden können. Da sich die langsamste Rückfaltungsphase nur sehr schlecht aufgrund von *photobleaching* über *stopped-flow*-Techniken messen ließ, ist eine Aussage hierzu nicht möglich. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind $\lambda_1 = 21,8 \text{ s}^{-1}$, $\lambda_2 = 5,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $\lambda_3 = 0,33 \text{ s}^{-1}$ und stimmen gut mit den erhaltenen

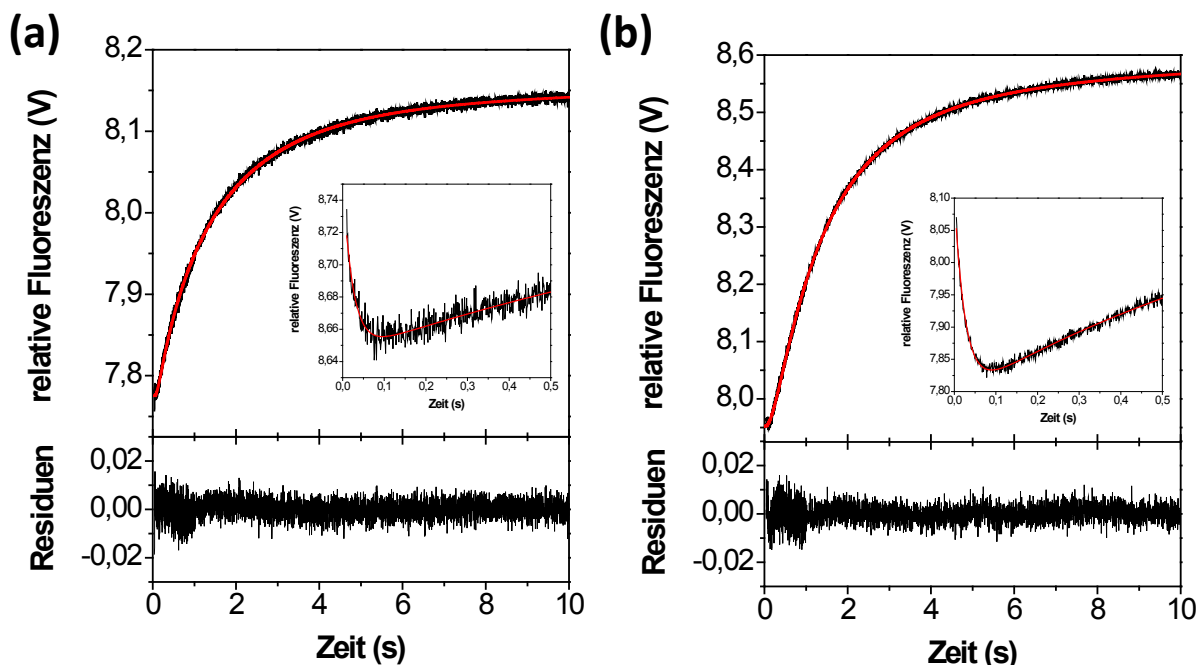


Abb.3-11: Über Doppelsprungexperimente detektierte Rückfaltungskinetiken nach verschiedenen Entfaltungszeiten.

Gezeigt sind zwei Rückfaltungskinetiken von N-BAR nach (a) 0,5 s und (b) 5 s Entfaltung in 4,5 M Harnstoff. Die rote Linie zeigt die jeweilige Anpassung mit Gleichung (24). Die Residuen der Anpassung sind unter der jeweiligen Kinetik dargestellt. Die *insets* zeigen die ersten 500 ms der Reaktion, welche separat gemessen wurden.

Geschwindigkeitskonstanten aus den Einzelsprungexperimenten überein. Die Amplitudenverläufe der Rückfaltungsphasen gegen die Entfaltungszeit geben Aufschlüsse über gebildete Faltungszustände während der Entfaltung (Abb. 3-12). Während kurzer Entfaltungszeiten (< 8 s) wurde natives Protein innerhalb von 20 s nach Rückfaltung gebildet, da ein weiterer langsamerer Entfaltungsschritt im entfalteten Zustand noch nicht stattfinden konnte. Alle drei Amplitudenverläufe zeigten in dieser Zeit ein analoges Verhalten und konnten mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst werden. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten betragen für den Amplitudenverlauf aus der schnellen Rückfaltungsphase $\lambda = 1,06 \text{ s}^{-1}$, der mittleren Phase $\lambda = 1,15 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$ und der langsamen Phase $\lambda = 1,54 \pm 0,12 \text{ s}^{-1}$. Diese Geschwindigkeitskonstanten sind identisch zu der langsamsten Entfaltungsphase. Für Entfaltungszeiten länger als 8 s bekommt der langsamste Entfaltungsschritt eine immer größere Bedeutung. Ab diesem Zeitpunkt war auch die langsamste Rückfaltungsphase (λ_4) sichtbar. Diese wurde wie bereits erwähnt, separat über manuelle Mischung gemessen. Der Amplitudenverlauf dieser Phase zeigte einen monoexponentiellen Anstieg mit einer Geschwindigkeitskonstante von $\lambda = 0,004 \text{ s}^{-1}$. Mit einer ähnlichen Geschwindigkeitskonstante von $\lambda = 0,009 \text{ s}^{-1}$ sanken auch die Amplituden der mittleren (λ_2) Rückfaltungsphase und mit $\lambda = 0,004 \text{ s}^{-1}$ die Amplituden der langsamen (λ_3) Rückfaltungsreaktion. Die Amplituden der schnellen Rückfaltungsphase zeigten keine Änderung. Es war aber eigentlich zu erwarten, dass die Amplituden der schnellsten Rückfaltungsphase nach langen Entfaltungszeiten einen ähnlichen Abfall zeigen, wie

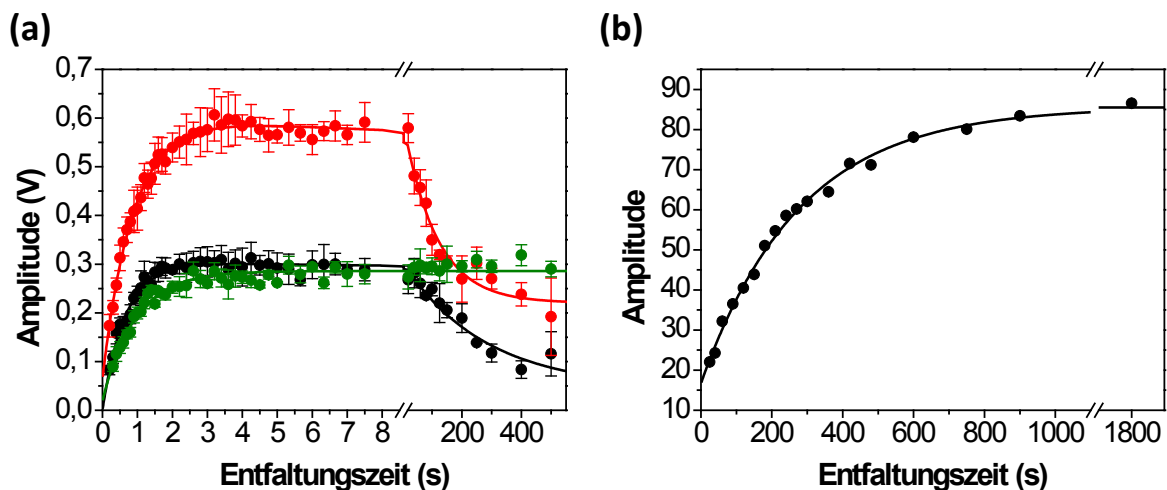


Abb. 3-12: Amplitudenverlauf der Rückfaltungsphasen als Funktion der Entfaltungszeit (U-Test).

(a) Dargestellt sind die Amplituden der detektierten Rückfaltungsphasen nach verschiedenen Entfaltungszeiten mit der *stopped-flow*-Technik. Die grünen Symbole zeigen die schnelle Rückfaltungsphase (λ_1), die roten Symbole die mittlere Rückfaltungsphase (λ_2) und die schwarzen Symbole die langsame Rückfaltungsphase (λ_3). Die Linien zeigen den entsprechenden Fit mit einer einfachen bzw. zweifachen exponentiellen Reaktion 1. Ordnung. (b) Dargestellt ist der Amplitudenverlauf der separat gemessenen langsamsten Rückfaltungsphase (λ_4) nach manueller Mischung für beide Mischschritte. Der Verlauf wurde mit einer einfachen exponentiellen Reaktion 1. Ordnung angepasst.

Ergebnisse

der Verlauf der beiden anderen Amplituden. Es kann aber möglich sein, dass diese Änderung zu klein ist, um hier beobachtet werden zu können. Der identische Amplitudenverlauf aller drei Rückfaltungsphasen innerhalb der ersten acht Sekunden zeigte den initialen Entfaltungsschritt.

3.1.3.4 Untersuchung des Faltungs- und Entfaltungsverhalten mittels Fluoreszenzanisotropie

Die durch Fluoreszenzanisotropie verfolgten Einfachsprungexperimente von N-BAR zeigten ein einfacheres Rückfaltungs- bzw. Entfaltungsverhalten im Vergleich zur Fluoreszenz. Zum genaueren Verständnis des Faltungsweges wurden die Doppelsprungexperimente auch mit Fluoreszenzanisotropie gemessen.

In Abb. 3-13a ist der N-Test gezeigt. Die entsprechende Entfaltungskinetik ist über den gesamten Rückfaltungszeitraum biphasisch. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind $\lambda_5 = 8,0 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda_6 = 1,2 \text{ s}^{-1}$ und entsprechen damit denen aus der Messung der Fluoreszenz. Somit zeigen alle drei verwendeten Detektionsmethoden (fern-UV CD-Spektroskopie, Fluoreszenz und Fluoreszenzanisotropie) die gleichen Entfaltungsprozesse. Der Amplitudenverlauf von beiden Entfaltungsreaktionen zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die Amplituden in Abb. 3-9. Auch die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten aus dem Amplitudenverlauf sind identisch: $\lambda = 1,1 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda = 0,002 \text{ s}^{-1}$ für den Amplitudenverlauf der schnellen Entfaltungsreaktion und $\lambda = 0,4 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda = 0,006 \text{ s}^{-1}$ für die Amplituden der langsamen Entfaltungsreaktion.

Der U-Test (Abb. 3-13b) zeigt ebenfalls ein vergleichbares Bild zur Fluoreszenz. Die gemessene Geschwindigkeitskonstante der detektierten Rückfaltungskinetik beträgt

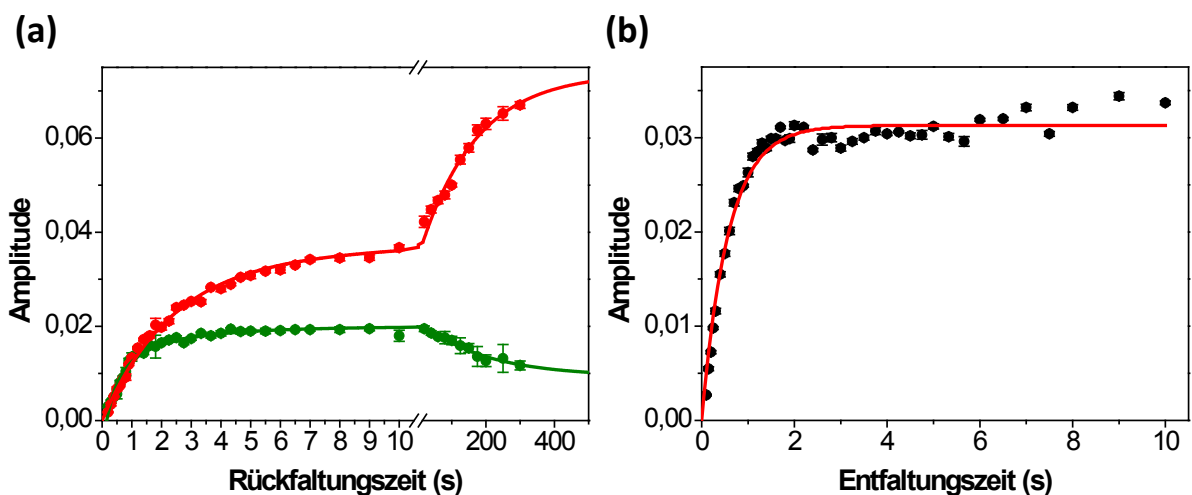


Abb. 3-13: Amplitudenverlauf der über Fluoreszenzanisotropie gemessen (a) Entfaltungsphase als Funktion der Rückfaltungszeit (N-Test) und (b) der Rückfaltungsphase als Funktion der Entfaltungszeit (U-Test).

Dargestellt sind die Amplituden (a) der Entfaltungsreaktion aus dem N-Test und (b) der Rückfaltungsreaktion aus dem U-Test. (a) Die grünen Symbole zeigen die Amplituden der schnellen Entfaltungsreaktion, die roten Symbole die der langsamen Entfaltungsreaktion. Die Anpassung erfolgte analog zu den Messungen in Abb. 3-9 (b) Gezeigt ist der Amplitudenverlauf der Rückfaltungsreaktion bei verschiedenen Entfaltungszeiten. Die rote Linie zeigt die Anpassung der Amplituden mit einer einfachen exponentiellen Reaktion 1. Ordnung.

$\lambda = 5,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und stimmt gut mit der Geschwindigkeitskonstante aus den Einfachsprungexperimenten überein. Die detektierte Rückfaltungskinetik war während des gesamten U-Tests monophasisch und zeigt damit keine weiteren detektierbaren Ereignisse. Der Amplitudenverlauf zeigte einen monophasischen Anstieg mit einer Geschwindigkeitskonstante von $\lambda_6 = 1,74 \text{ s}^{-1}$. Diese Geschwindigkeitskonstante ist identisch mit der Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung bei der gleichen Harnstoffkonzentration. Somit zeigt sich auch hier, dass die langsamste Entfaltungsreaktion limitierend für den weiteren Entfaltungsprozess ist und damit auch keine weiteren Ereignisse mit dem hier verwendeten Methodenrepertoire sichtbar gemacht werden konnten.

3.1.4 Zusammenfassende Diskussion

Hauptsächlich durch *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie konnten mehrere Faltungs- und Entfaltungsphasen identifiziert werden. Dies zeigt, dass von keinem einfachen Zweizustandsmodell ausgegangen werden kann, obwohl in den Gleichgewichtsübergängen nur zwei Zustände sichtbar sind. Das Zweizustandsmodell für die Auswertung der Gleichgewichtsübergänge ist aber ausreichend, da nur der native und entfaltete Zustand ausreichend populiert werden. Dies konnte einmal dadurch gezeigt werden, dass die gemessene Übergangskurve einstufig verläuft. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass ein gleichzeitiger Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur erfolgt, da die normierten CD- und Fluoreszenzspektren deckungsgleich sind. Dies kann als weiteres Kriterium für das Zweizustandsmodell im Gleichgewicht hingenommen werden. Ein vollständiger Nachweis des Vorhandenseins von Faltungsintermediaten im Gleichgewicht bei ausreichender Population kann letztlich aber nur mit NMR-Spektroskopie auf der Basis einzelner Aminosäuren erfolgen. Aufgrund der Größe und Form der N-BAR-Domäne ist die Anwendung der NMR-Spektroskopie für diese Problemstellung nicht möglich. Die Anwendung eines dimeren Zweizustandsmodells wird dadurch belegt, dass der Übergangsmittelpunkt eine Funktion der Proteinkonzentration ist. Dies ist bei einem Übergang ohne Änderung der Molekularität nicht der Fall. Die ermittelte thermodynamische Stabilität liegt mit $85,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ im Bereich zwischen $42\text{-}120 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, welcher für dimere Proteine ermittelt wurde¹⁶⁹.

Die Faltungskinetiken zeigen einen mehrphasigen Verlauf mit insgesamt vier beobachtbaren Rückfaltungs- und zwei Entfaltungsphasen. Dies zeigt, dass mehrere Intermediate durchlaufen werden, die sich spektroskopisch vom nativen bzw. entfalteten Zustand unterscheiden. Es kann weiterhin angenommen werden, dass weitere Faltungsphasen existieren, die nicht mit den hier verwendeten Methoden detektierbar sind. Zur genaueren Charakterisierung der Faltung wurden weiterhin Kinetiken mit Fluoreszenzansiotropie gemessen, um auch die Dimerisierungsreaktion genauer zu charakterisieren und getrennt von den anderen beobachteten Phasen zu analysieren. Es

kann davon ausgegangen werden, dass die Änderung des Fluoreszenzsignals globale Faltungsereignisse anzeigen. Bis auf die schnellste Rückfaltungsphase (λ_1) konnten sowohl mit Fluoreszenzanisotropie, als auch mit fern-UV-CD alle Faltungsphasen identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit konnten alle Rück- und Entfaltungsphasen definierten Faltungsreaktionen zugeordnet werden. Die erhaltenen kinetischen Daten wurden einem sequenziell-parallelem Faltungsweg zugordnet. Das vorgeschlagene Modell ist in Abb. 3-14 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die langsamste Rückfaltungsphase (λ_4) einen entscheidenden Einfluss auf die Aufspaltung in zwei Faltungswege von N-BAR besitzt. Es liegt nahe, dass es sich hierbei um eine Prolylisomerisierung handelt. Die Rückfaltung startet aus einem Gleichgewicht von nativen *trans*- und nicht-nativen *cis*-Prolinen. Beide Konformationen sind in der Lage, die ersten beiden Faltungsschritte (λ_1 und λ_2) zu durchlaufen und zeigen ein nicht unterscheidbares spektroskopisches Signal. Der folgende Faltungsschritt λ_3 ist auf die korrekte native Konformation angewiesen, was bedeutet, dass alle nativen intermediären Dimere zu nativen Dimeren falten können. Alle intermediären Dimere, welche eine nicht-native Prolylkonformation aufweisen, müssen erst in die nativ-ähnliche Konformation isomerisieren, bevor sie mit λ_3 zu nativen Dimeren weiterreagieren. Die einzelnen Faltungsschritte sollen im Folgenden einzeln diskutiert werden.

In Einzelsprungexperimenten mittels *stopped-flow*-fern-UV-CD-Spektroskopie ist nur ein Teil des in Abb. 3-14 gezeigten Faltungsweges sichtbar. Die beobachteten Rück- und Entfaltungskinetiken zeigen einen monophasischen Verlauf. Die Rückfaltungsreaktion ist eine Reaktion 2. Ordnung, da diese Reaktion eine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration aufweist. Der Endwert der Reaktion entspricht auch dem Elliptizitätswert des nativen Proteins, was bedeutet, dass mit dieser Reaktion die komplette native Sekundärstruktur gebildet wird. Demnach findet in allen folgenden Reaktion (λ_3 und λ_4) keine Sekundärstrukturbildung statt. Die Harnstoffabhängigkeit der beobachteten Rückfaltungsreaktion zeigt einen ausgeprägten *rollover*, was für die Existenz eines Intermediates

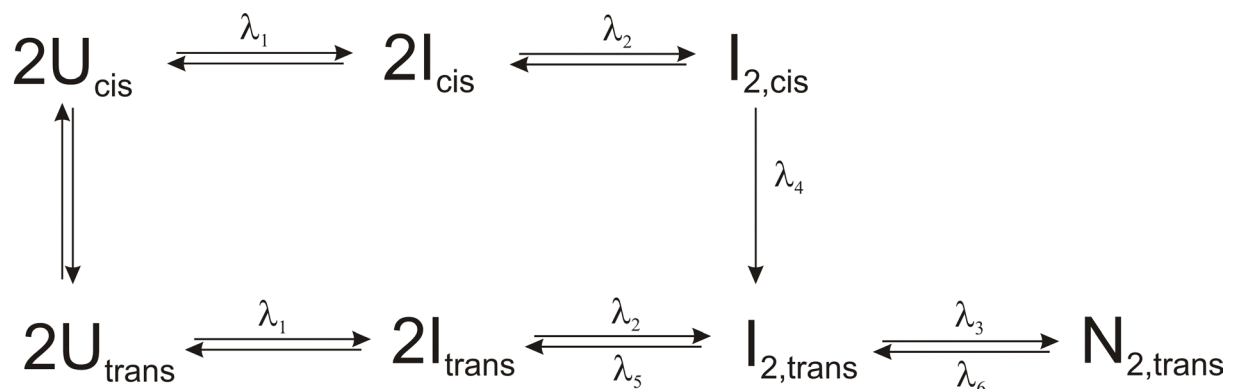


Abb. 3-14: Faltungsmodell von N-BAR

Die Faltung verläuft über einen sequenziell-parallelen Faltungsweg, wobei der Prolylisomerisierung eine entscheidende Rolle zukommt. Die beobachteten Faltungsreaktionen sind entsprechend beschriftet.

spricht, welches vor der Bildung des intermediären Dimers erfolgt. Die Existenz des Intermediates wird auch durch die Analyse der Start- und Endwerte verifiziert, welches einen Verlust der Gesamtamplitude der Reaktion im unteren Harnstoffbereich anzeigt. Erst mit zunehmender Harnstoffkonzentration steigt die Amplitude wieder. Dieses Verhalten zeigt die Population eines Intermediates innerhalb der Totzeit der *stopped-flow*-Messung. Bereits bei anderen Proteinen konnte ein ähnliches Verhalten nachgewiesen und mit der Akkumulation eines Intermediates begründet werden^{36; 170}. Es konnte auch gezeigt werden, dass dieses Intermediat ein Monomer ist, da das Verhältnis zwischen dem Startwert und dem Endwert der CD-Messung unverändert bei ansteigenden Proteinkonzentrationen ist. Bei einer Dimerisierung innerhalb der Totzeit sollte das Verhältnis aus Start- und Endwert mit zunehmender Proteinkonzentration ansteigen, da die Reaktion schneller wird und innerhalb der Totzeit das CD-Signal bei unverändertem Endwert zunehmen sollte⁵³. Die CD-Kinetiken zeigen aber nur einen Teil des Faltungsweges der N-BAR-Domäne an, seine ganze Komplexität wird durch die Kinetiken mittels Fluoreszenz sichtbar. Wobei folgende Ausgangspunkte für den Faltungsweg gelten: (i) die Bildung der nativen Struktur wird von einer heterogenen Mischung aus *trans*- und *cis*-Prolinen im entfalteten Zustand beeinflusst. (ii) Die Dimerisierungsreaktion wird durch die Prolylkonformation nicht beeinflusst. (iii) Der Dimerisierungsschritt ist die Hauptrückfaltungsreaktion. Die höhere Anzahl beobachteter Rückfaltungsreaktionen mittels Fluoreszenzspektroskopie im Vergleich zu den beobachteten Rückfaltungsreaktionen mittels CD-Spektroskopie zeigen, dass nicht alle Rückfaltungsreaktionen mit einer Bildung von Sekundärstrukturelementen einhergehen (besonders bei den Rückfaltungsphasen λ_3 und λ_4). Die Dimerisierungsreaktion hingegen ist mit allen Sonden beobachtbar. Dies zeigt, dass die Bildung des Dimers an die Bildung der Sekundärstruktur gekoppelt ist.

Die Rückfaltung startet von einer Mischung aus *cis*- und *trans*-Prolinen mit einem schnellen Faltungsereignis, welches ein monomeres Intermediat als Produkt zeigt. Dieses monomere Intermediat ist wahrscheinlich das Gleiche, welches in den CD-Kinetiken nur über die Amplitudenauswertung sichtbar ist. Eine entsprechende Signaländerung in den CD-Kinetiken zu dieser Phase ist nicht beobachtbar, da hier ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis vorliegt als bei den Fluoreszenzkinetiken und die Integrationszeit etwa doppelt so groß ist. Die mögliche Existenz eines *burst-phase*-Intermediates in Fluoreszenzkinetiken kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Die sich anschließende Dimerisierung ist ebenfalls unabhängig der Prolylkonformation. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante ist bei allen benutzten Sonden vergleichbar und zeigt, dass die Dimerisierung ein simultaner Faltungsprozess von Sekundär- und Tertiärstruktur ist. Aufgrund der Dimerisierung lässt sich diese Phase am besten mit einer Reaktion 2. Ordnung anpassen. Unter allen gemessenen Rückfaltungsbedingungen in Einzelsprung- und Doppelsprungexperimenten zeigt sich hier eine Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der Proteinkonzentration. Da keine

weitere Reaktion gefunden wurde, welche eine Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der Proteinkonzentration zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass keine weitere Dimerisierungsreaktion existiert. Die Geschwindigkeitskonstante der Dimerisierung lag bei $6,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bei 0,4 M Harnstoff und liegt damit um drei Größenordnungen unterhalb des Diffusionslimits von circa $1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Dies zeigt, dass die Assoziation der Monomere nicht nur ein Kollisionsereignis ist, sondern aus einer konformationellen Änderung der Monomere resultiert. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante steigt bis etwa 1 μM linear mit der Proteinkonzentration an. Anschließend zeigt sich eine Abweichung von der Linearität, was auf einen vorgelagerten limitierenden Faltungsschritt hinweist. Einen langsameren bzw. ähnlich schnellen Reaktionsschritt vor der Dimerisierung konnte sowohl in Einzelsprung- als auch in Doppelsprungexperimenten nicht beobachtet werden. Das Vorhandensein dieses Faltungsschrittes kann demnach nicht ausgeschlossen werden, es gibt aber keine weiteren experimentellen Befunde für die Existenz. Demnach wird dieser mögliche Faltungsschritt im Modell auch nicht berücksichtigt. Für andere dimere Proteine wie den P22 Arc Repressor oder ORF56 wurde eine ähnliche Abweichung von der Linearität zwischen der beobachteten Geschwindigkeitskonstante und der Proteinkonzentration beobachtet^{47; 48}.

Der Übergang von $I_{2,trans}$ nach N_2 (λ_3) ist nur in Einzelsprungexperimenten mittels Fluoreszenzspektroskopie zu sehen. Fern-UV-CD-Spektroskopie und Fluoreszenzanisotropie zeigen diese Reaktion nicht. Dies indiziert, dass in dieser Phase nur geringe strukturelle Änderungen erfolgen und das intermediäre Dimer einen starken nativ-ähnlichen Zustand aufweist. Im N-Test kann diese Phase auch mit fern-UV-CD-Spektroskopie bzw. Fluoreszenzanisotropie sichtbar gemacht werden. Der Verlauf der Doppelsprungexperimente zeigt auch, dass sich in dieser Phase das native Dimer bildet, da die Amplitude mit zunehmender Rückfaltungszeit stetig ansteigt. Es kann jedoch nicht hinreichend ausgeschlossen werden, dass hier nicht auch ein *off-pathway*-Intermediat gebildet wird. Ein Hinweis auf die Anwesenheit eines *off-pathway*-Intermediats zeigt die Harnstoffabhängigkeit dieser Phase, da eine Zunahme in der Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion mit zunehmender Harnstoffabhängigkeit zu sehen ist³⁹. Dieses Verhalten ist charakteristisch für einen Entfaltungsprozess im Rückfaltungsast des Chevron-Plots. Andere Proteine zeigten auch dieses Verhalten, welches mit der Bildung eines *off-pathway*-Intermediats begründet wurde²⁹. Eine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration dieser Phase konnte nicht beobachtet werden. Demnach kann auch die Bildung eines nichtproduktiven Dimers oder eines höheren Oligomeres ausgeschlossen werden. In den Doppelsprungexperimenten (N-Test) zeigen sich keine Hinweise auf ein *off-pathway*-Intermediat, da ansonsten eine lag-Phase in den Amplituden von λ_6 beobachtet werden sollte. Demnach ist λ_3 direkt mit λ_2 verbunden.

Die langsamste Rückfaltungsphase (λ_4) kann einer Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung zugeordnet werden. In der nativen Struktur liegen alle Xaa-Pro-Bindungen laut Röntgenstruktur-

analyse in der *trans*-Konformation vor¹⁴⁰. Im entfalteten Zustand dominiert die Vorgängeraminosäure des Prolylrestes das Verhältnis zwischen der *cis*- und *trans*-Konformation. In der N-BAR-Domäne existiert eine Trp94-Pro95-Bindung, bei der in besonders hoher *cis*-Anteil vorliegt. In Peptiden konnte gezeigt werden, dass der *cis*-Anteil bis zu 34% beträgt⁸⁶. Die Isomerisierung dieser Bindung in der N-BAR-Domäne führt zu einer starken Änderung in der chemischen Umgebung der Tryptophanseitenkette und damit zu einer starken Fluoreszenzänderung. Prinzipiell können alle Xaa-Pro-Bindungen eine Isomerisierung bewirken und zum Signal der langsamsten Rückfaltungsphase beitragen. Die anderen drei Prolylreste in N-BAR besitzen keine Vorgängeraminosäuren, die einen so hohen *cis*-Anteil im entfalteten Zustand hervorrufen und stehen auch nicht in räumlicher Nähe zu einem Chromophor, der eine starke Signaländerung hervorruft. Demnach kann angenommen werden, dass die hauptsächliche Signaländerung der langsamsten Rückfaltungsphase von der Isomerisierung der Trp94-Pro95-Bindung resultiert und die anderen Prolylresten nur eine untergeordnete Rolle bei der Signaländerung spielen. Es war nicht möglich, diese Phase mit einer PPIase zu beschleunigen. Dies zeigt entweder, dass N-BAR kein Substrat für die hier untersuchten PPIase darstellt oder eine sterische Hinderung der Bindung existiert, da N-BAR sehr schnell in die native bzw. nativ-ähnliche Konformation faltet und die native Konformation von keiner PPIase gebunden werden kann. Dadurch kann auch ausgeschlossen werden, dass die Isomerisierung im entfalteten Zustand von N-BAR erfolgt, sondern eher zu einem späteren Zeitpunkt der Faltung. Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei dieser Phase um eine Prolylisomerisierung handelt, zeigt die kaum vorhandene Harnstoffabhängigkeit dieser Phase. Über einen langen Konzentrationsbereich zeigt sich keine Abhängigkeit und erst kurz vor dem Übergangsmittelpunkt sinkt die Geschwindigkeitskonstante sehr langsam. Die Bestimmung der Aktivierungsenergie ergab $84,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, welche im Bereich einer Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung liegt. Jedoch gibt es keine Erklärung für die Abweichung vom linearen Verhalten in der Temperaturabhängigkeit dieser Phase in der Arrhenius-Auftragung. Es kann nur vermutet werden, dass es sich hierbei um einen anderen Faltungsschritt handelt, der in diesem Temperaturbereich die Isomerisierung limitiert. Jedoch führt auch eine Erhöhung der Ionenstärke zu keiner Änderung dieses unbekanntes Faltungsschrittes. Die Isomerisierung spielt für die Faltung eine entscheidende Rolle, da alle Moleküle mit einer nicht-nativen Prolylbindung nach der Dimerisierung in diesem Schritt in der weiteren Folge blockiert sind. Diese Moleküle müssen zuerst in die native Konformation isomerisieren, bevor sie mit λ_3 zum nativen Dimer weiterreagieren. Die Bedeutung der Isomerisierung zeigt sich auch in dem durchgeführten Dreifachsprungexperiment. Hier erfolgt nur eine sehr kurze Entfaltungszeit, was bedeutet, dass N-BAR komplett entfaltet, jedoch keine Zeit hat zu isomerisieren, da die Isomerisierung im entfalteten Zustand von U_{trans} nach U_{cis} sehr langsam ist und demnach kaum U_{cis} gebildet wird. Dadurch startet das folgende Doppelsprungexperiment mit entfaltetem Protein, wobei alle entfalteten Moleküle die

Diskussion

native *trans*-Konformation aufweisen. Hierbei zeigt sich, dass sie bereits nach 10 Sekunden die korrekte native Konformation erreicht haben, da anschließend keine Signaländerungen beobachtbar sind. Die Amplituden der schnellen Entfaltungsreaktion (λ_5), welche den Dimerisierungsschritt anzeigen, erreichen bereits nach den ersten Sekunden ihren Endwert.

Der durchgeführte U-Test zeigt auch die Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung im entfalteten Zustand an. Dieser kann nicht direkt gemessen werden, da kein spektroskopischer Unterschied im entfalteten Zustand vorliegt. Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante ist der Rückfaltung sehr ähnlich, da es sich um den gleichen Prozess und die gleiche Energiebarriere handelt. Der U-Test zeigt außerdem, dass die Amplituden der Rückfaltungsphasen λ_2 und λ_3 sehr sensitiv auf die Isomerisierung im entfalteten Zustand reagieren. Eigentlich sollte dieses Verhalten auch für die schnellste Rückfaltungsphase λ_1 detektierbar sein. Dies ist aber nicht der Fall. Möglicherweise ist die spektroskopische Änderung für diese Phase recht klein, demnach nicht auflösbar und liegt im Fehlerbereich der gemessenen Amplituden. Auch die starke Abnahme der absoluten Amplituden mit Zunahme der Isomerisierung kann nicht erklärt werden. Es ist anzunehmen, dass die Isomerisierung von mehr als einem Prolin zu dieser detektierten starken Abnahme der Amplituden führt.

Im vorgeschlagenen Modell wurde streng zwischen *cis*- und *trans*-Faltungszuständen unterschieden. Es kann allerdings nicht unterschieden werden, ob auch gemischte dimere Intermediate vorliegen, wo das eine Monomere eine nicht-native *cis*-Konformation ausweist und das andere Monomere eine native *trans*-Konformation. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Zustände vorliegen, da die Dimerisierung unabhängig der Prolylkonformation stattfindet. Damit faltet sich jedes Monomer im dimeren Zustand individuell weiter. Es gibt keine konkreten Hinweise auf den Unterschied zwischen dem dimeren intermediären Zustand und dem nativen Dimer. Es kann davon ausgegangen werden, dass der strukturelle Unterschied sehr gering ist, da nur in den Einzelsprungmessungen mittels Fluoreszenz dieser Übergang sichtbar ist. In den Kinetiken mit fern-UV-CD-Spektroskopie und Fluoreszenzanisotropie ist diese Faltungsphase in den Einzelsprungexperimenten nicht detektierbar. Dies zeigt, dass die Sekundärstrukturelemente bzw. die Packung der Tryptophane bereits nach der Dimerisierungsphase (λ_2) einen Zustand erreicht haben, der nicht mehr vom nativen Zustand zu unterscheiden ist.

Der Entfaltungsweg von N-BAR zeigt eine sehr viel geringere Komplexität als der Rückfaltungsweg. Hier kann von einem sequentiellen Faltungsweg ausgegangen werden, in dem λ_6 der geschwindigkeitsbestimmende Entfaltungsschritt ist. Dieser Schritt ist auch in allen verwendeten spektroskopischen Sonden detektierbar. Außerdem zeigt sich auch im U-Test, dass das Amplitudenverhalten aller detektierten Rückfaltungsphasen vergleichbar ist und die Amplitudenverläufe mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst werden können, wobei die ermittelte Geschwindigkeitskonstante immer vergleichbar mit λ_6 ist. Der schnellere Entfaltungs-

schritt λ_5 ist nur in Einzelsprungexperimenten mittels Fluoreszenzspektroskopie gut messbar. In den gemessenen Anisotropiekinetiken ist diese Phase detektierbar, jedoch mit einer sehr kleinen Amplitude (5-10% der Gesamtamplitude). Die Entfaltungskinetiken mit fern-UV-CD-Spektroskopie zeigen diese Phase nicht. Erst durch Doppelsprungexperimente wird diese Entfaltungsphase gut detektierbar. Dieses Verhalten wurde auch bei verschiedenen anderen Proteinen gefunden. Nach dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität existiert eine weitere Entfaltungsreaktion, der entgegengesetzte Prozess zu $\lambda_{1,}$ um bis zu U_{trans} zu gelangen. Diese konnte jedoch nie nachgewiesen werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine sehr schnelle Kinetik, welche sehr viel schneller als λ_5 ist und damit nicht detektierbar. Die Bildung von $I_{2,cis}$ und I_{cis} bei der Entfaltung ist nicht zu erwarten, da die Bildung von *trans* nach *cis* im Vergleich zu den anderen Entfaltungsreaktionen sehr viel langsamer ist.

3.2 Thermodynamische und kinetische Charakterisierung weiterer N-BAR-Varianten und der SH3-Domäne

3.2.1 Charakterisierung von N-BAR(1-286)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei Interaktionsstudien zwischen N-BAR und SH3 (Kapitel 3.3.3) die Variante N-BAR(1-286) als Bindungspartner identifiziert werden. Der Einfluss der zusätzlichen 45 Aminosäurereste zwischen den Positionen 241 und 286 auf die Stabilität und das Faltungsverhalten wurde im Folgenden untersucht. Da nicht bekannt ist, ob diese zusätzlichen Aminosäurereste einen strukturellen Beitrag besitzen, wurden zunächst fern-UV-CD-Spektren aufgenommen und mit der kürzeren N-BAR-Variante verglichen. In Abb. 3-15a sind beide Spektren dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass die mittlere molare Elliptizität von N-BAR(1-286) im Vergleich zu N-BAR(1-241) abnimmt und damit auch der gesamte α -helikale Anteil in N-BAR(1-286). Die zusätzlichen 45 Aminosäurereste enthalten keine weiteren aromatischen Aminosäuren. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass sich nur wenige spektroskopische Veränderungen ergeben. Zur Überprüfung einer möglichen strukturell lokalen Änderung um die Tryptophanreste wurden Untersuchungen zur Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid durchgeführt. Hierbei können Informationen zur Oberflächenzugänglichkeit und eine damit verbundene spektroskopische Veränderung gewonnen werden. In Abb.3-15b ist die Stern-Volmer-Auftragung für beide Proteinvarianten im Vergleich zum freien Tryptophan gezeigt. Die Anpassung an Gleichung (8) ergab für N-BAR(1-241) eine Stern-Volmer-Konstante von $K_{SV} = 3,25 \text{ M}^{-1}$ und für N-BAR(1-286) eine vergleichbare Konstante von $K_{SV} = 2,93 \text{ M}^{-1}$.

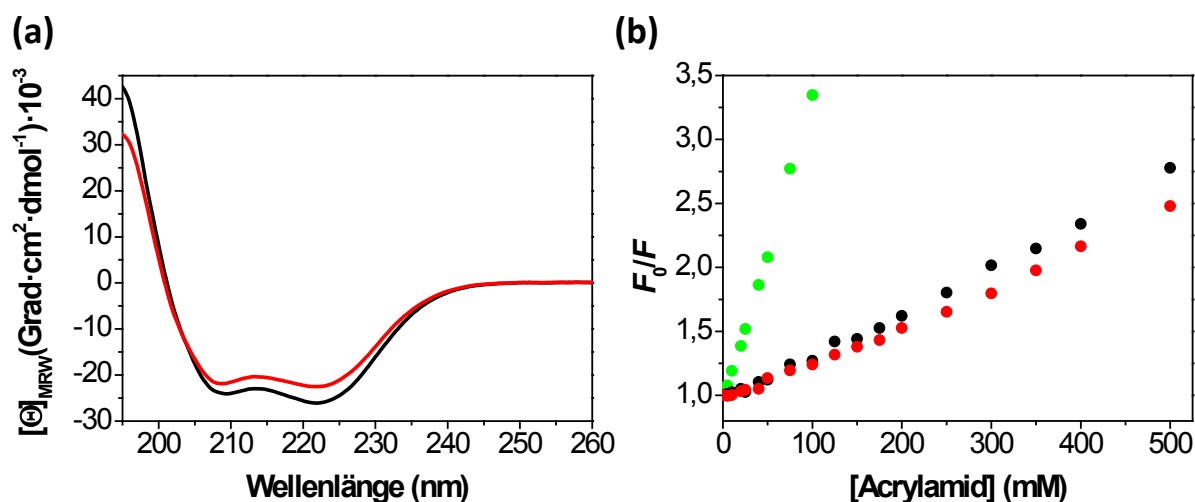


Abb. 3-15 Biophysikalische Charakterisierung von N-BAR(1-286) im Vergleich zu N-BAR(1-241).

(a) Gezeigt sind die fern-UV-CD-Spektren von N-BAR(1-241) in schwarz und von N-BAR(286) in rot. (b) Dargestellt ist der Stern-Volmer-Plot nach Fluoreszenzlöschung durch Acrylamid von N-BAR(1-241) in schwarz, N-BAR(1-286) in rot und freiem Tryptophan in grün.

Desweiteren wurde untersucht, wie sich die zusätzlichen 45 Aminosäuren auf die thermodynamische Stabilität und das Proteinfaltungsverhalten auswirken. Die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität erfolgte analog zu N-BAR(1-241) über Harnstoff-induzierte Gleichgewichtsübergänge. In Abb. 3-16a ist der Gleichgewichtsübergang von N-BAR(1-286) zu sehen. Es ist zu erkennen, dass der Gleichgewichtsübergang hochkooperativ ohne erkennbare Intermediate verläuft. Es ergibt sich ein homologer Verlauf aus fern-UV-CD- und Fluoreszenzspektroskopie. Die freie Gibbs-Enthalpie der Entfaltung, der m -Wert und der Übergangsmittelpunkt sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Die Rück- und Entfaltungskinetiken wurden mit Fluoreszenz und Fluoreszenzanisotropie gemessen (Abb.3-16b). Der Verlauf aller Kinetiken von N-BAR(1-286) ist vergleichbar zu den Kinetiken von N-BAR(1-241), wobei sich jedoch die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten leicht voneinander unterscheiden. Für die detektierten Rückfaltungskinetiken mittels Fluoreszenz ergaben sich Geschwindigkeitskonstanten von $\lambda_1 = 45,1 \text{ s}^{-1}$, $\lambda_2 = 1,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $\lambda_3 = 0,13 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda_4 = 0,005 \text{ s}^{-1}$. Auch hier zeigte λ_2 eine Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration und stellt damit die Dimerisierungsreaktion dar. Die gemessenen Entfaltungskinetiken ergaben Geschwindigkeitskonstanten von $\lambda_5 = 17,8 \text{ s}^{-1}$ und $\lambda_6 = 1,7 \text{ s}^{-1}$. Sowohl in den Rückfaltungs- als auch in den

Tab. 3-4 Thermodynamische Parameter aus Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergängen von N-BAR(1-286)

Methode	Proteinkonzentration (μM)	ΔG_U ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	m -Wert ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)	[Harnstoff] $_{0,5}$ (M)
Fluoreszenz	1,0	101,0 \pm 0,1	26,7 \pm 0,1	2,60 \pm 0,03
fern-UV CD		104,7 \pm 0,2	28,1 \pm 0,1	2,60 \pm 0,02

Die Übergänge wurden bei 15°C gemessen und mit Gleichung (19) ausgewertet. Die angegebenen Fehler ist der Fehler der Anpassung.

Entfaltungskinetiken zeigte sich eine Verlangsamung des Faltungsprozesses. Auch hier wurden die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenzanisotropie-basierten Rückfaltungskinetiken verwendet, um die Rückfaltungskinetiken mittels Fluoreszenz auszuwerten. Die Entfaltungskinetiken mittels Fluoreszenzanisotropie ergaben identische Geschwindigkeitskonstanten zu den Entfaltungskinetiken aus den Fluoreszenzmessungen. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten wurden auch hier im Chevron-Plot zusammengefasst (Abb. 3-16b). Die beiden Entfaltungsphasen zeigen eine lineare Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Der Anstieg beider Phasen ist auch hier stark unterschiedlich. Der Rückfaltungsbereich erstreckt sich hier von 0,4 M bis 2,8 M Harnstoff. Alle gemessenen Rückfaltungskinetiken lassen sich bis 2 M Harnstoff nachweisen. Die schnellste Rückfaltungskinetik λ_1 zeigt über den gesamten Detektionsbereich keine Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Bis etwa 1,5 M Harnstoff zeigen λ_2 und λ_3 keine Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration (*rollover*-Effekt) und fallen anschließend ab. Bei 2 M Harnstoff laufen beide Phasen zusammen und es lässt sich nur noch λ_2 identifizieren. Demnach zeigt die Dimerisierungsreaktion die stärkste Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Die langsamste Rückfaltungskinetik λ_4 zeigt über den gesamten Harnstoffbereich keine Abhängigkeit. Diese Phase läuft auch mit der Dimerisierungsreaktion etwa bei 2,3 M Harnstoff zusammen. Im Übergangsbereich laufen die Phasen der Dimerisierungsreaktion λ_2 und der langsamsten Entfaltungsreaktion λ_6 zusammen, was die Reversibilität des Systems zeigt.

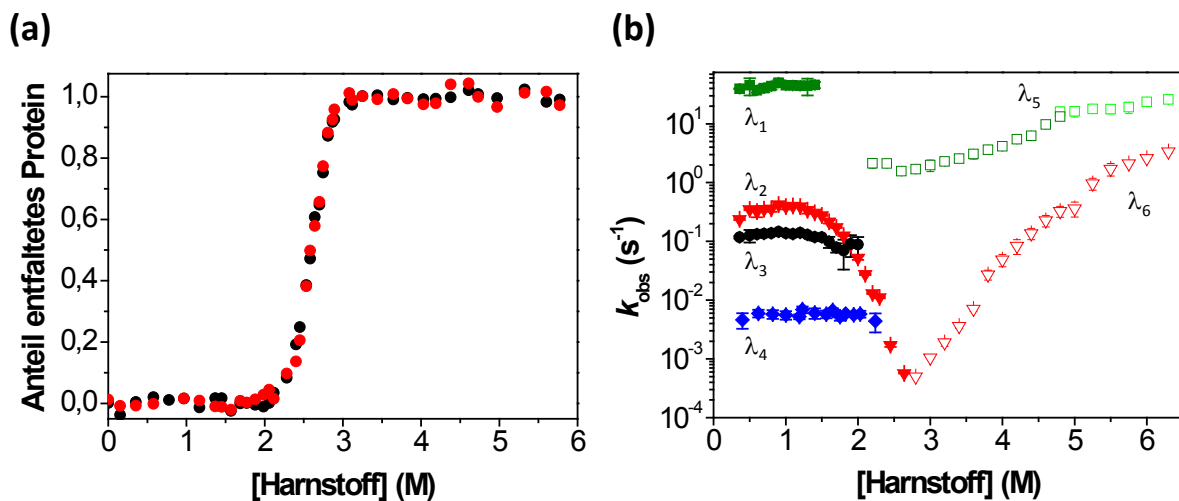


Abb. 3-16 thermodynamische und kinetische Charakterisierung von N-BAR(1-286)

(a) Gezeigt sind die normierten Übergangskurven gemessen mit Fluoreszenz (schwarze Punkte) und fern-UV-CD-Spektroskopie (rote Punkte). (b) Aufgetragen sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltungsreaktion gegen die Harnstoffkonzentration. Die Rückfaltungsphasen sind mit geschlossenen Symbolen gekennzeichnet, die Entfaltungsphasen mit offenen Symbolen.

3.2.2 Charakterisierung der AmpII/Bin1 SH3-Domäne

Die zweite Domäne des AmpII/Bin1-Proteins ist eine SH3-Domäne. Sie ist ein Monomer und ein sehr viel kleineres Protein als die N-BAR-Domäne. Die thermodynamische Stabilität und die Faltungsreaktionen wurden nur mit Fluoreszenz untersucht. Der Harnstoff-induzierte Gleichgewichtsübergang (Abb.3-17a) zeigt einen geringen kooperativen Übergang mit einem Übergangsmittelpunkt bei $(3,7 \pm 0,2)$ M Harnstoff. Die geringere Kooperativität resultiert aus einer besseren Zugänglichkeit des Harnstoffs an das Protein. Die gemessene Kurve konnte mit Gleichung (15) angepasst werden und ergab eine thermodynamische Stabilität von $(15,8 \pm 0,4)$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und ein m -Wert von $(4,3 \pm 0,1)$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$.

Die Entfaltungsreaktionen zeigten jeweils eine monophasische Kinetik, die mit einer exponentiellen Funktion angepasst werden konnte. In den Rückfaltungskinetiken lassen sich zwei Rückfaltungsphasen gut voneinander trennen. Im Chevron-Plot zeigt sich ein fast idealer v-förmiger Verlauf (Abb. 3-17b). Die beiden schnellen Phasen zeigen eine lineare Abhängigkeit von Harnstoff und laufen im Übergangsmittelpunkt zusammen, was einen reversiblen Faltungsprozess verdeutlicht. Die langsame Rückfaltungskinetik ist erst nach einer längeren Entfaltungzeit detektierbar. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine Prolylisomerisierung, da diese Phase im Chevron-Plot keine Harnstoffabhängigkeit aufweist. Der Chevron-Plot wurde mit Gleichung (27) angepasst, wobei die Prolylisomerisierung nicht berücksichtigt wurde. Dabei ergaben sich für die Rückfaltungsreaktion eine intrinsische Geschwindigkeitskonstante (k^0) von $(0,98 \pm 0,02)$ s^{-1} und ein m_f -Wert von

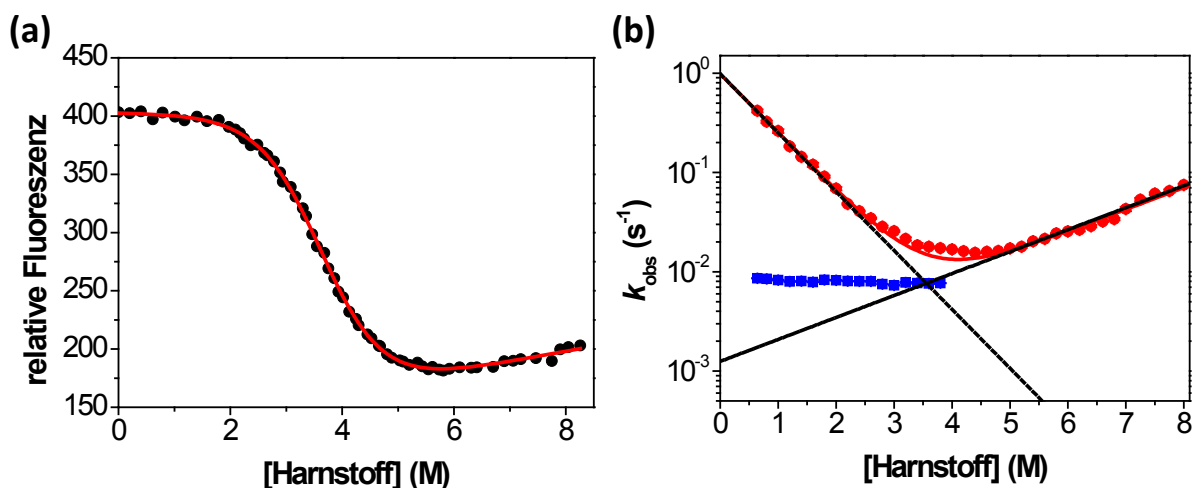


Abb. 3-17 Gleichgewichtsübergang und Chevron-Plot der AmpII/Bin1-SH3-Domäne.

(a) Gezeigt ist der Gleichgewichtsübergang der AmpII/Bin1-SH3-Domäne bei 15°C gemessen mit Fluoreszenz. Die rote Linie zeigt die Anpassung der Messpunkte mit Gleichung (15). (b) Dargestellt ist die halblogarithmische Darstellung der Rückfaltungs- und Entfaltungskinetiken der SH3-Domäne bei 15°C. Die roten Punkte zeigen hierbei die Hauptphasen an, während die blauen Punkte die langsame Rückfaltungsphase zeigt. Die rote Linie zeigt die Anpassung mit Gleichung (27). Die beiden gestrichelten Linien zeigen den Verlauf der Harnstoffabhängigkeit der intrinsischen Rück- bzw. Entfaltungsphase.

$(-1,36 \pm 0,02) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ sowie für die Entfaltungsreaktion eine intrinsische Geschwindigkeitskonstante (k^0) von $(0,0013 \pm 0,0002) \text{ s}^{-1}$ und ein m_u -Wert von $(0,51 \pm 0,03) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Der Schnittpunkt der beiden Geraden liegt bei 3,54 M Harnstoff und ist vergleichbar mit dem Übergangsmittelpunkt aus den Gleichgewichtsübergängen. Die Differenz der kinetischen m -Werte, $R \cdot T(m_f - m_u)$, beträgt $-4,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ und ist vergleichbar zu dem m -Wert aus den Gleichgewichtsübergängen.

3.2.3 Zusammenfassende Diskussion

Im Vergleich zu N-BAR(1-241) zeigt N-BAR(1-286) eine geringere molare Elliptizität, was einen geringeren Gesamthelixanteil anzeigt. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die zusätzlichen Aminosäuren keinen signifikanten Strukturbeitrag besitzen. Die Oberflächenzugänglichkeit der Tryptophane ist nur wenig geringer im Vergleich zu N-BAR(1-241), was auf eine kleine lokale Änderung hinweist. Es liegen keine Informationen vor, wie die zusätzlichen Aminosäuren orientiert sind. In Abb. 3-18a ist der Vergleich der Gleichgewichtsübergänge von N-BAR(1-241) und N-BAR(1-286) gezeigt. Die thermodynamische Stabilität und der Kooperativitätsparameter von N-BAR(1-286) nehmen im Vergleich zu N-BAR(1-241) signifikant zu. Dies zeigt, dass die zusätzlichen Aminosäuren nicht frei beweglich sind, sondern verstärkt Kontakte zur Gerüststruktur ausbilden und damit die Stabilität erhöhen. Es liegen jedoch keine strukturellen Informationen zu N-BAR(1-286) vor, wodurch die Ursache der Stabilitätserhöhung im Detail nicht geklärt werden kann. Der Vergleich des Chevron-Plots beider Proteinvarianten (Abb. 3-18b) zeigt ein sehr ähnliches Verhalten zwischen

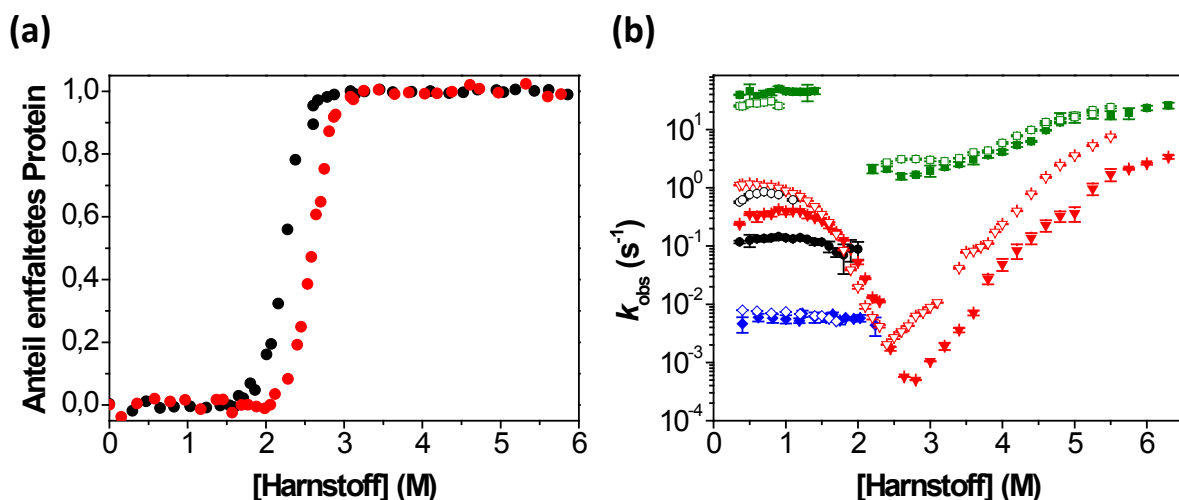


Abb. 3-18: Vergleich der thermodynamischen Stabilität und des Faltungsverhaltens von N-BAR(1-241) und N-BAR(1-286).

(a) Gezeigt sind die normierten Gleichgewichtsübergänge von N-BAR(1-241) (schwarze Kreise) und N-BAR(1-286) (rote Kreise) gemessen mit Fluoreszenz. (b) Dargestellt sind die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von N-BAR(1-241) (offene Symbole) und N-BAR(1-286) (geschlossene Symbole) gegen die Harnstoffkonzentration. Es handelt sich hierbei um eine gemeinsame Darstellung der Abb. 3-4 und Abb. 3-16. Gleiche Faltungsphasen sind mit gleichen Farben markiert.

Diskussion

beiden Varianten. Es lassen sich alle Faltungsphasen, die in N-BAR(1-241) gemessen wurden auch in N-BAR(1-286) wiederfinden. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass der Faltungsweg beider Proteine gleich ist. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der schnellsten Rück- und Entfaltungsphase (λ_1 und λ_5) und der langsamste Rückfaltungsphase (λ_4) sowie deren Verlauf stimmen sehr gut überein. Auch der Verlauf von λ_2 , λ_3 und λ_6 stimmen zwischen beiden Proteinvarianten gut überein. Die Geschwindigkeitskonstanten dieser Phasen weichen jedoch leicht voneinander ab. Sowohl die Rückfaltung als auch die Entfaltung dieser Phasen sind etwa um den Faktor drei bei N-BAR(1-286) verlangsamt. Da in N-BAR(1-286) der *rollover* von λ_2 und λ_3 stärker ausgeprägt ist, lässt sich λ_3 über einen längeren Harnstoffbereich messen. Außerdem zeigt sich hier auch keine Zunahme der Geschwindigkeitskonstante mit zunehmender Harnstoffkonzentration. Beide Phasen laufen auch hier zusammen und nach 2 M Harnstoff ist nur noch λ_2 nachweisbar. Die Rück- und Entfaltungsphasen von N-BAR(1-286) laufen bei etwa 2,7 M Harnstoff zusammen und ist damit im Vergleich zu N-BAR(1-241) zu höheren Harnstoffkonzentration verschoben. Somit stimmt die Harnstoffkonzentration, an welchem die Rück- und Entfaltungsphasen zusammentreffen, mit der Harnstoffkonzentration aus den Gleichgewichtsübergängen überein.

Die SH3-Domäne zeigt Faltungseigenschaften eines Dreizustandsmodells. Die Auswertung des Gleichgewichtsübergangs kann sehr gut mit Hilfe von Gleichung (15) für einen einfachen Übergang erfolgen, in denen nur zwei Zustände: das native und entfaltete Protein im Gleichgewicht vorliegen. Die gemessenen Rückfaltungskinetiken zeigten einen biphasischen Verlauf, einen schnellen und einen langsamen Rückfaltungsteil, was auf die Anwesenheit mehrerer Zustände hinweist. Die Chevron-Auftragung aller zeigt keine Abweichung von der Linearität, jedoch zeigt er keinen perfekten V-förmigen Verlauf. Dieser Verlauf konnte bisher auch bei anderen SH3-Domänen gezeigt werden^{40; 171}. Der lineare Verlauf des Rück- und Entfaltungssastes zeigt, dass keine weiteren, detektierbaren Intermediate nachgewiesen werden können. Jedoch zeigt der nicht V-förmige Verlauf im Chevron-Plot einen transienten Zustand an, zu dem keine weiteren Informationen vorliegen. Die beobachtete langsame Rückfaltungsphase zeigt im Chevron-Plot keine Harnstoffabhängigkeit und ist mit aller Wahrscheinlichkeit eine Prolylisomerisierung. Demnach lässt sich ein Faltungsmodell aufstellen, wobei zwei entfaltete Spezies existieren, die in einem Gleichgewicht vorliegen: eine langsam faltende Spezies mit nicht-nativen Prolylresten und eine schnell faltende Spezies mit nativen Prolylresten. Die schnell faltende Spezies ist direkt in der Lage in die native Struktur zu falten, wodurch sie dem Gleichgewicht der entfalteten Spezies entzogen wird. Der genaue Reaktionsweg der sich langsam faltenden Spezies ist unbekannt, da keine weiteren Experimente durchgeführt wurden und kann keine Aussage dazu getroffen werden, ob die Isomerisierung im entfalteten oder nativen Zustand stattfinden kann.

3.3 Untersuchungen zur Membranbindung und Interaktion zu SH3

3.3.1 Helixinduktion der Helix0

Eines der besonderen Merkmale der N-BAR-Domäne ist die Bildung einer stabilen amphipathischen Helix am N-Terminus in Gegenwart von Lipiden bzw. lipidanalogen Substanzen. Zum Nachweis dieser Helixinduktion wurden verschiedene Proteinvarianten und Lipidsysteme verwendet und mit fern-UV-CD-Spektroskopie untersucht.

In Abb. 3-19 sind fern-UV-CD-Spektren der N-BAR-Domäne ohne Lipide und in Gegenwart von Liposomen aus einer Lipidmischung aus Rinderhirn zu sehen. In beiden CD-Spektren ist der typische Verlauf eines α -helikalen Proteins zu erkennen, mit den charakteristischen Minima bei 209 und 222 nm. Es ist deutlich sichtbar, dass die der Betrag der Elliptizität in Gegenwart von Liposomen zunimmt, was auf einen höheren helikalen Anteil in der Gesamtsekundärstruktur von N-BAR hindeutet. Da die Lipidmischung aus Rinderhirn sehr undefiniert und ein großer Teil der darin enthaltenen Substanzen nicht bekannt ist, wurden zusätzlich Liposomen aus DMPG hergestellt und mit N-BAR gemessen. Das gemessene fern-UV-CD-Spektrum zeigt einen nahezu identischen Verlauf zu dem Spektrum mit Liposomen aus Rinderhirn. Somit wird deutlich, dass sowohl eine natürliche Lipidquelle als auch ein synthetisches Lipid die Induktion der Helix0 bewirken kann. Aus den Spektren lässt sich aber nicht ableiten, ob auch eine Bindung des gesamten Proteins erfolgt. Zum Nachweis, dass die Zunahme der Elliptizität von der Helixinduktion der Helix0 resultiert, wurde eine N-BAR-Variante ohne Helix0 hergestellt ($\Delta(1-32)$ BAR) und mit den gleichen Lipidmischungen gemessen. Hier zeigte sich, dass nach Zugabe der Liposomen keine Änderung im Spektrum im Vergleich zum Spektrum ohne Liposomen zu sehen ist. Dadurch wird deutlich, dass die beobachtete Änderung in Abb. 3-19a eindeutig von der Helix0 stammt. Weiterhin wurde das BAR-Peptid (AS 1-44) separat gemessen (Abb.3-19c). Das Peptid liefert ohne Lipide ein fern-UV-CD-Spektrum dem eines *random coils* mit der typischen schwachen Absorption im Bereich 210-240 nm und einem Minimum nahe 200 nm. Die Zugabe von Liposomen aus einer Lipidmischung aus Rinderhirn oder DMPG führt auch an der isolierten Helix0 zu einer Lipidinteraktion und einer Helixinduktion. Dies lässt sich an dem α -helikalen Verlauf der fern-UV-CD-Spektren mit den typischen Minima bei 209 und 222 nm erkennen. Um eine genauere strukturelle Änderung im Peptid zu sehen, wurden NMR-Spektren gemessen, da hier Informationen zur strukturellen Änderung für jeden Aminosäurerest erhalten werden können. Liposomen sind für NMR-spektroskopische Untersuchungen in Lösung jedoch ein ungünstiges System, da sie in aller Regel durch ihre Größe ein sehr schnelles Relaxationsverhalten der Peptidresonanzen erzeugen. Somit sind an Lipide gebundene Aminosäurereste oft nicht detektierbar (Abb. 8-7). Aus diesen Gründen wurden Bicellen als Lipiddoppelschicht verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus Lipiden und Detergenzien, die in der Mischung eine scheibenförmige Anordnung einnehmen, mit der Lipiddop-

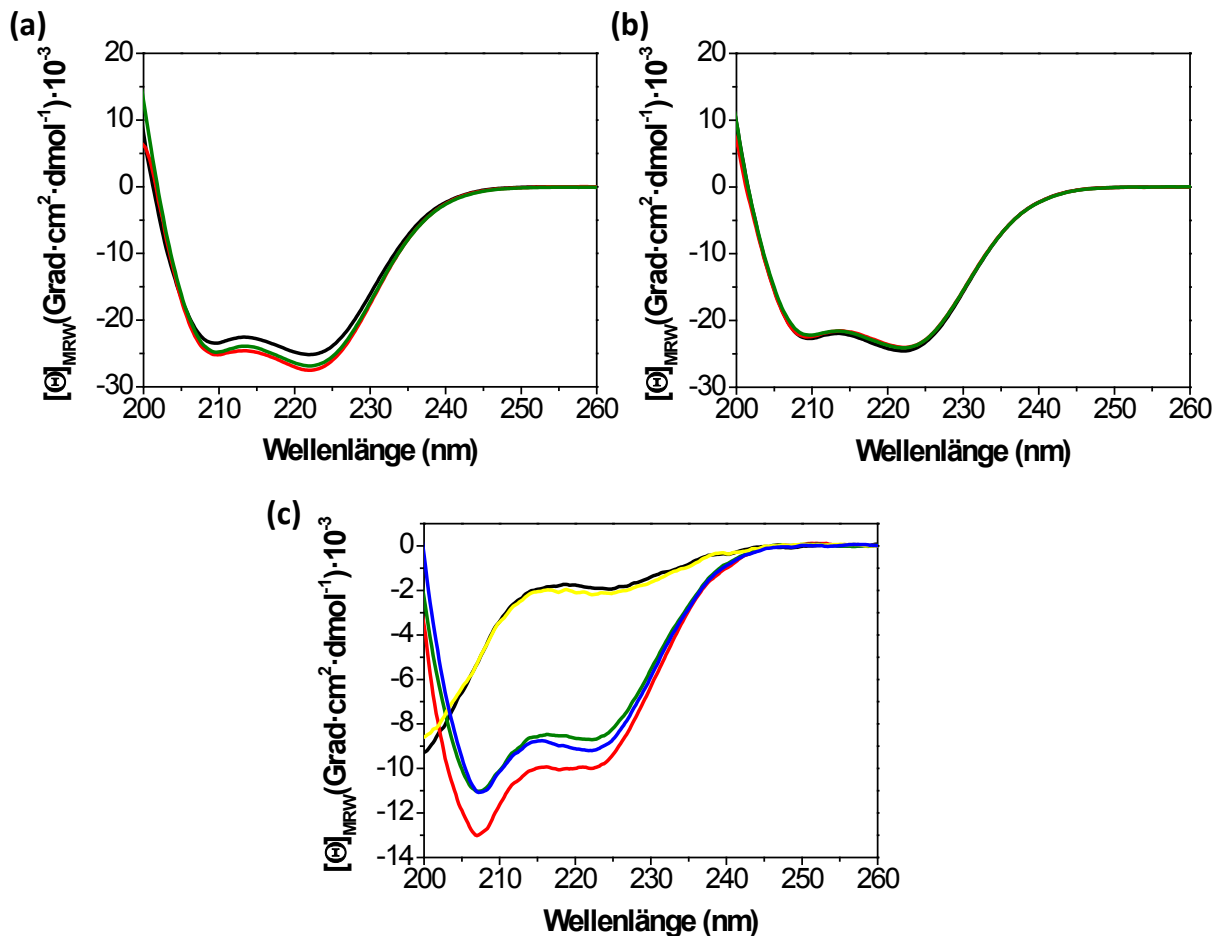


Abb. 3-19: Fern-UV CD-Spektren verschiedener N-BAR-Varianten mit verschiedenen Lipidsystemen und -zusammensetzungen.

Gezeigt sind die fern-UV CD Spektren von (a) N-BAR und (b) $\Delta(1-32)$ BAR in Abwesenheit von Lipiden (schwarz), in Gegenwart von Liposomen aus einer Lipidmischung aus Rinderhirn (rot) und in Gegenwart von Liposomen aus DMPG (grün). (c) Fern-UV CD-Spektren des BAR-Peptids (1-44) in Abwesenheit von Lipiden (schwarz), in Gegenwart von Liposomen aus Rinderhirnlipiden (rot), DMPG-Liposomen (grün), DMPC/DHPC Bicellen (gelb) und DMPG/DHPC Bicellen (blau).

pelschicht in der Mitte und dem Detergens als „Umrandung“. In Abhängigkeit des Verhältnisses zwischen Lipid und Detergens entstehen unterschiedlich große Bicellen. Alle hier verwendeten Bicellen hatten ein Verhältnis von Lipid zu Detergens von 0,2. Zum Nachweis, dass das BAR-Peptid auch Bicellen bindet und eine Helix gebildet wird, wurden zuerst fern-UV-CD-Spektren aufgenommen. In Abb.3-19c sind diese mit gezeigt, wobei für eine Mischung aus DMPG/DHPC eine Helixbildung nachgewiesen werden konnte, da hier ein typisches α -helikales CD-Spektrum gemessen wird. Für die Mischung aus DMPC/DHPC zeigt sich ein Verlauf genau wie im freien Peptid und demnach konnte hier keine Bindung an die Bicellen beobachtet werden. Dies lässt sich durch die zwitterionische Kopfgruppe des DMPCs erklären, da N-BAR nur an Lipide mit negativ geladener Kopfgruppe bindet.

In Abb. 3-20 ist das ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum des BAR-Peptids(AS 1-44) ohne Lipide und in Gegenwart von DMPG/DHPC Bicellen gezeigt. Dieses Spektrum zeigt die ^1H - ^{15}N -Korrelation zwischen dem

Amidstickstoff der Peptidbindung und dem daran gebundenen Proton. Zusätzlich erhält man auch Kreuzsignale zu stickstoffgebundenen Protonen aus den Seitenketten. Die Zuordnung der beiden HSQC-Spektren erfolgte mit einer ^{15}N , ^{13}C -markierten Probe und den *triple*-Resonanzexperimenten HNCACB, HN(CO)CACB für die Probe ohne Bicellen und mit dem HNCA, HN(CO)CA und dem ^{15}N -NOESY-HSQC für die Probe mit Bicellen. Es konnten in beiden Spektren alle Aminosäuren zugeordnet werden bis auf die erste Aminosäure, da diese im Spektrum nicht sichtbar ist sowie im Bicell-gebundenen Peptid Tyr44. Die vollständigen Zuordnungstabellen befinden sich im Anhang (Tab. 8-1 und Tab. 8-2). Das Spektrum des freien Peptids zeigte eine geringe Dispersion der Signale, was den entfalteten Zustand wiedergibt. Die Signale der Seitenketten zeigten ebenfalls kaum eine Aufspaltung, was zusätzlich indiziert, dass alle detektierbaren Seitenketten in einer ähnlichen chemischen Umgebung vorliegen und damit auch die gleiche chemische Verschiebung aufweisen. Das Peptid an Bicellen gebunden zeigte eine breitere Dispersion und eine Verschiebung vieler Kreuzsignale. Auch die Seitenkettensignale zeigten eine gute Dispersion und konnten hier zusätzlich zugeordnet werden. Außerdem war ein starker Intensitätsunterschied in den Kreuzsignalen der an Lipid-gebundenen und freien Aminosäuren zu verzeichnen. In Abb. 3-21 sind die Änderung in der chemischen Verschiebung und der heteronukleare NOE für jede Aminosäure aufgetragen. Bei einer Änderung der chemischen Verschiebung von mehr als 0,2 ppm handelt es sich um eine signifikante Strukturänderung. Hierbei ist zu erkennen, dass fast alle Kreuzsignale der Reste zwischen Thr10 und Gly34 einen $\Delta\delta_{\text{MW}}$ Wert über 0,2 ppm zeigen. Der heteronukleare NOE gibt Auskunft über die Beweglichkeit des N-H Vektors, der in einer gefalteten Struktur größer als 0,5 ist und in einer weniger strukturierten Region bzw. nicht gefalteten Region kleiner oder negativ ist. Mit Hilfe beider Experimente können nun strukturierte Bereiche (große Änderung der chemische Verschiebung und hNOE größer als 0,5) und entsprechend unstrukturierte Bereiche des Peptids identifiziert werden. Im Bereich zwischen Thr10 bis Gly34 kann somit ein strukturierter Bereich identifiziert werden. Die beiden flankierenden Bereiche sind wenig strukturiert. Die starken Änderungen in der chemischen Verschiebung sind auf eine Änderung der chemischen Umgebung der jeweiligen Aminosäure im Lipid-gebundenen Zustand und eine Strukturänderung im gesamten Peptid zurückzuführen.

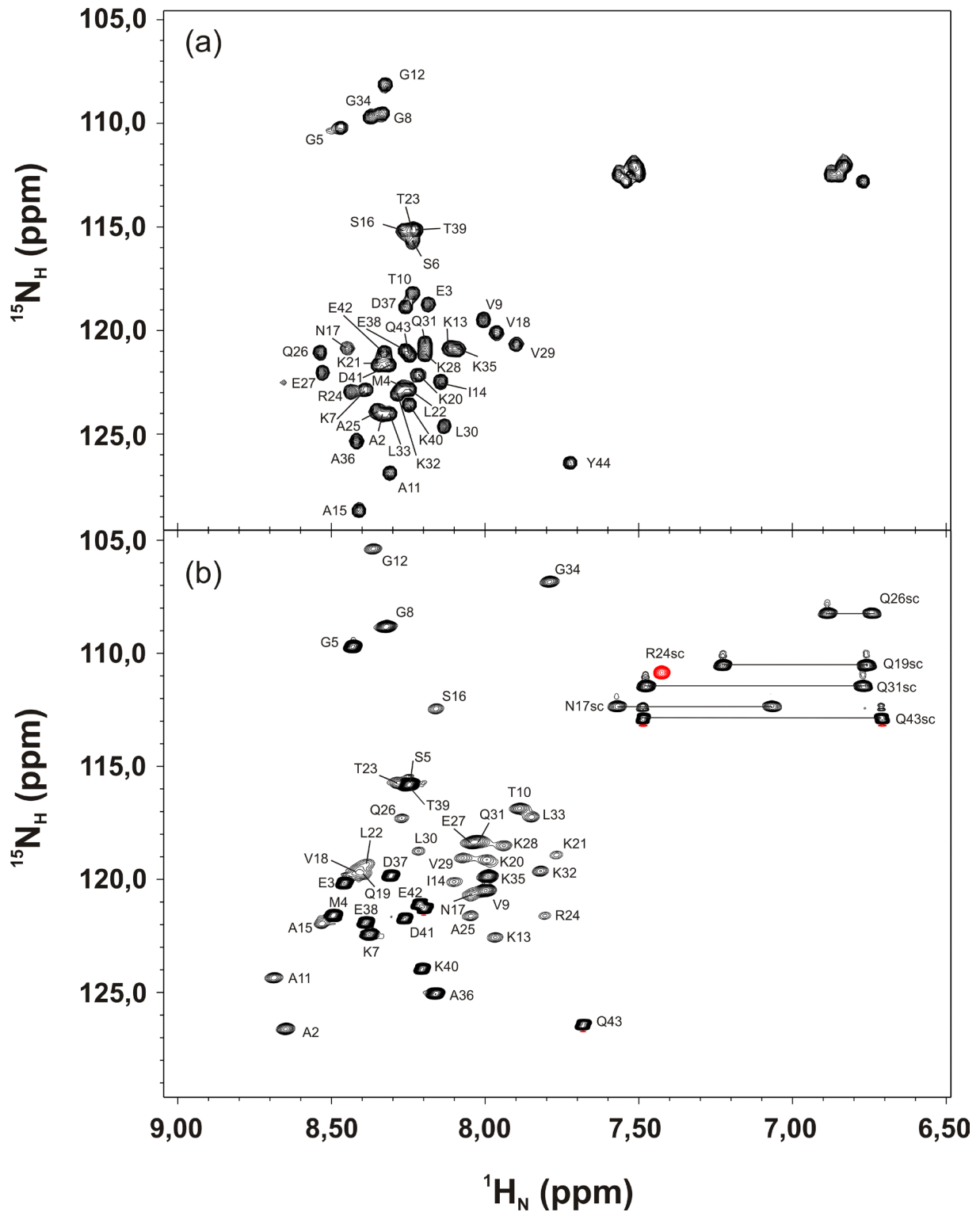


Abb. 3-20: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des BAR-Peptids (AS 1-44) im ungebundenen und Bicell-gebundenen Zustand

Spektrum des BAR-Peptids im (a) freien Zustand und in (b) DMPG/DHPC-Bicellen ($q = 0,2$). Die Peptidkonzentration betrug 1 mM in 10 mM Natriumphosphat, pH 6,0. Die Kreuzsignale sind im Einbuchstabencode markiert.

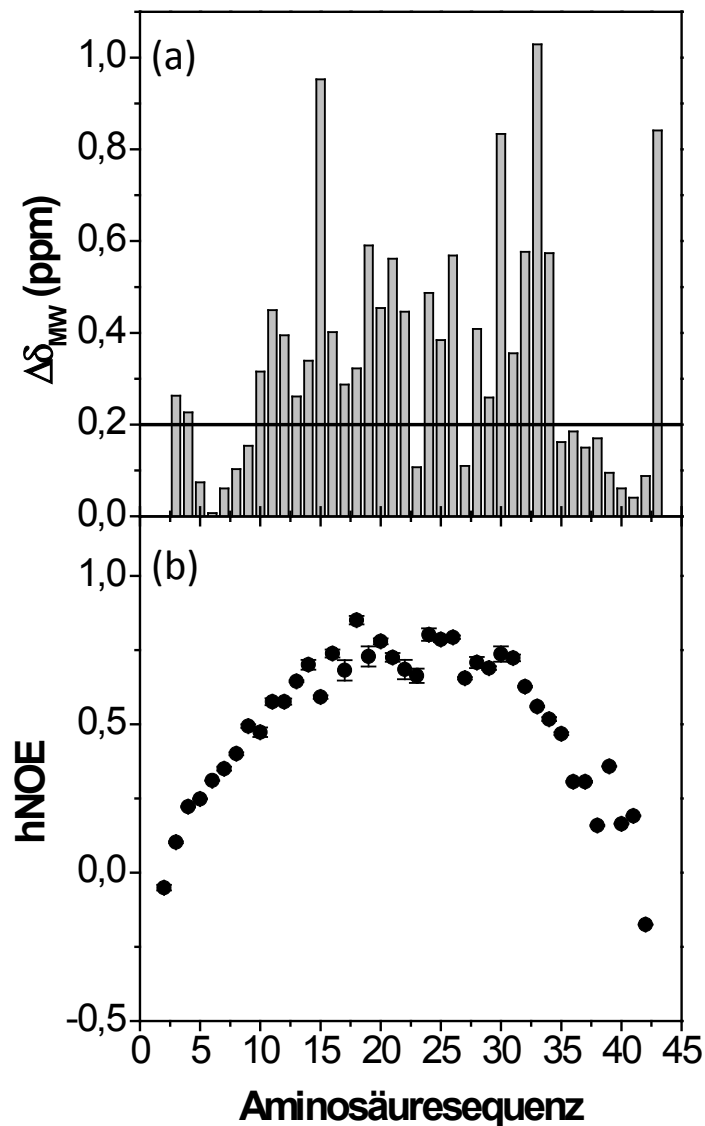


Abb. 3-17: Analyse der chemischen Verschiebung und des hNOEs des bicellgebundenen BAR-Peptids.

(a) Gezeigt ist die Änderung der chemischen Verschiebung des Peptids an Bicellen gebunden im Vergleich zum freien Peptid über die Aminosäuresequenz. Die Änderung wurde mit Gleichung (28) berechnet. Die *cut-off* Grenze von 0,2 ppm für signifikante Änderungen wurde selbst festgelegt. (b) Der hNOE gibt die Rückgratdynamik des Peptids auf der pico- bis nano-Sekunden NMR-Zeitskala in DMPG/DHPC-Bicellen wieder.

3.3.2 Lipidzusammensetzung und Tubulierung von N-BAR an SUVs

Die biologische Funktion von N-BAR ist, wie bereits oben beschrieben, die Bindung an Membranen und deren Krümmung bzw. Tubulisierung. Es ist aber bisher noch sehr wenig darüber bekannt, welche Membranbestandteile bzw. welche Lipidzusammensetzung die Bindung und/oder Tubulisierung fördern. In der Literatur gibt es keine eindeutige Lipidmischung, welche verwendet werden kann. Deshalb wurden zuerst verschiedene, sehr einfache Lipidzusammensetzungen verwendet um nachzuweisen, ob eine bloße Anwesenheit von Lipiden mit negativ geladener

Ergebnisse

Kopfgruppe für eine Bindung und Tubulisierung ausreicht. Mit den oben gezeigten fern UV-CD-Spektren kann zwar eine Helixinduktion beobachtet werden, es kann aber nicht bewiesen werden, ob auch die gesamte Domäne an die Liposomen bindet. Deshalb wurde die Langmuir-Filmwaagetechnik verwendet, um eine Bindung von verschiedenen N-BAR-Konstrukten in Kombination mit verschiedenen Lipidzusammensetzungen systematisch zu untersuchen.

Als erstes wurde das Phasenverhalten der einzelnen Lipidzusammensetzungen untersucht, um sicherzustellen, welche Phasen bei der Verringerung der zur Verfügung stehenden Fläche durchlaufen werden. Hierfür wurden die π/A -Isothermen, also Änderungen des lateralen Drucks pro Fläche, aufgenommen. In Abb. 3-22a sind die π/A -Isothermen von reinem DOPC und DOPA sowie deren Mischungen gezeigt. Hierbei ist zu sehen, dass sich sowohl die reinen Lipide als auch die Lipidmischungen ausschließlich in der flüssig-expandierten Phase befinden, bevor bei zu kleiner Fläche der Film kollabiert. Ein Phasenübergang in die flüssig-kondensierte bzw. feste Phase ist in allen Isothermen nicht zu erkennen. Im Vergleich von allen fünf Lipidmischungen ist eine Verschiebung in der Kompressibilität von reinem DOPC zu reinem DOPA zu festzustellen. Die drei Mischungen der beiden Lipide zeigten einen Kurvenverlauf zwischen denen der Einzelkomponenten. Die beiden Lipidmischungen mit 10% bzw. 20% DOPA zeigten einen stark vergleichbaren Verlauf zu reinem DOPC, was darauf hinweist, dass der Verlauf der Isotherme von DOPC dominiert wird. Alle fünf gemessenen Lipidmischungen kollabierten bei einem ähnlichen lateralen Druck, jedoch bei leicht verschobenen Flächen pro Molekül, die bei reinem DOPC am größten und bei reinem DOPA am kleinsten war. Auf gleiche Weise wurden noch folgende Lipidmischungen untersucht: ein Gemisch

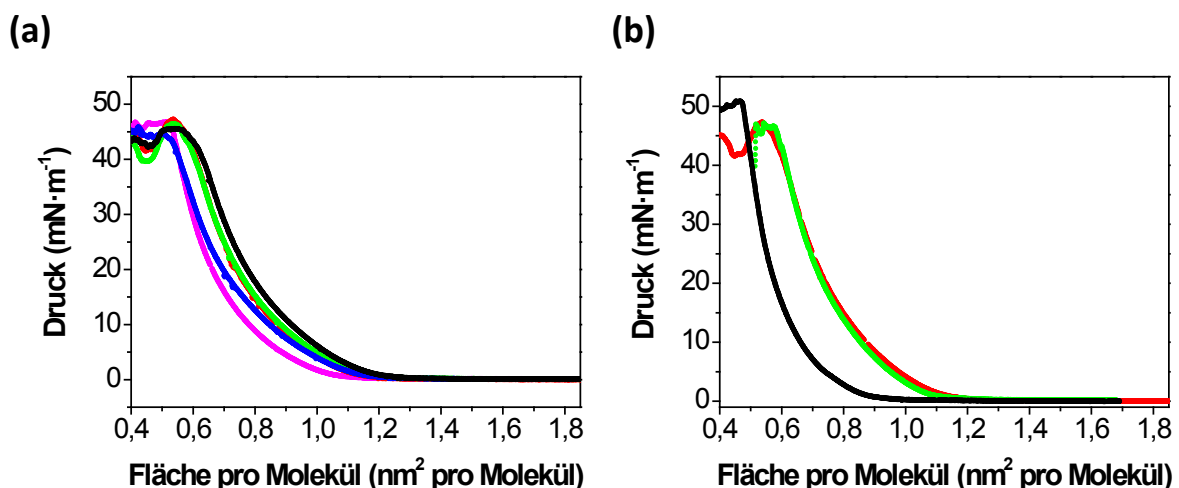


Abb. 3-22: π/A -Isothermen verschiedener Lipidmischungen.

Alle verwendeten Lipidmischungen wurden auf 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, pH 7,4, gemessen bei 20°C. (a) Gezeigt sind Lipidmischungen mit DOPC und DOPA, sowie deren Einzellipide: reines DOPC (schwarz), 90% DOPC, 10% DOPA (rot), 80% DOPC, 20% DOPA (grün), 50% DOPC, 50% DOPA (blau), reines DOPA (magenta). (b) Isothermen der Lipidmischungen von 47% DOPC, 20% DOPA, 33% Cholesterin (schwarz), 80% DOPC, 20% DOPS (grün), 90% DOPC, 10% DOPA (rot).

aus 47% DOPC, 20% DOPA und 33% Cholesterin, sowie 80% DOPC und 20% DOPS (Abb. 3-22b). Alle beiden π/A -Isothermen zeigten ein flüssig-expandiertes Phasenverhalten. Die Mischung aus DOPC/DOPA/Cholesterin besaß einen stark nach links verschobenen Kurvenverlauf, was auf die Anwesenheit von Cholesterin zurückzuführen ist, da sich die Cholesterinmoleküle mit kleiner werdender Fläche besser anordnen können als die ungesättigten Fettsäureketten von DOPA und DOPC und damit die Kompressibilität der Lipidmischung erhöhen. Der Kurvenverlauf mit 20% DOPS ist dem Lipidgemisch mit 10% DOPA sehr ähnlich. Dies zeigt, dass trotz unterschiedlicher Kopfgruppe eine ähnliche Kompressibilität vorlag und das Verhalten hauptsächlich durch die Fettsäurekette verursacht wird.

Zur Untersuchung der Interaktion von N-BAR mit den einzelnen Lipidmischungen wurden zeitabhängige Adsorptionsmessungen durchgeführt. Hierbei wurde die Fläche konstant gehalten und die zeitabhängige Druckänderung ($\Delta\pi$) bei unterschiedlichen Ausgangsdrücken (π_0) verfolgt. Nach der Auftragung von $\Delta\pi$ gegen den Ausgangsdruck π_0 konnte der maximale Oberflächendruck ermittelt werden, der Informationen enthält, ob auch ein Einbau in eine Lipiddoppelschicht erfolgen würde. In Abb. 3-23a ist das Adsorptionsverhalten von N-BAR, $\Delta(1-32)$ BAR und dem BAR-Peptid dargestellt. Für N-BAR und $\Delta(1-32)$ BAR ergab sich bei einer Lipidmischung von 80% DOPC, 20% DOPA ein maximaler Einbaudruck von $29,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ bzw. $29,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Diese Werte sind allerdings mit einigen kleinen Fehlern behaftet, da die Adsorptionsstärke um $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ sehr gering ist und auch aufgrund der Struktur kann man nicht eindeutig entscheiden, ob eine Insertion in eine flache Membran erfolgte. Jedoch kann auf Grundlage der biologischen Funktion und der größeren Oberflächenaktivität in Gegenwart von Lipiden von einem Einbau in eine Lipiddoppelschicht ausgegangen werden. Das BAR-Peptid allein besitzt einen maximalen Insertionsdruck von $24,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ und liegt weit unter der Grenze von $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, was bedeutet, dass von keinem Einbau auszugehen ist. Weiterhin wurde auch der Einfluss der DOPA-Konzentration auf den maximalen Insertionsdruck untersucht (Abb. 3-23b). Hierbei ist zu erkennen, dass bei Abwesenheit von DOPA der maximale Insertionsdruck bei $24,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ liegt und demnach kein Einbau in eine Doppelschicht zu erwarten wäre. Bei einem DOPA-Anteil von 10% bzw. 20% stieg der maximale Insertionsdruck auf $29,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ bzw. $29,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, bei einem DOPA-Anteil von 50% sogar auf $34,9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Demnach ist in allen Lipidmischungen mit DOPA wieder von einem Einbau in eine Membran auszugehen. Ein Austausch von DOPA gegen DOPS bei gleicher Gesamtanzahl negativer Ladung erniedrigte den maximalen Insertionsdruck auf $26,7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, was auf keinen Einbau schließen lässt (Abb. 3-23c). In den meisten biologischen Membranen ist Cholesterin vorhanden, weshalb der maximale Insertionsdruck auch in Anwesenheit von 33% Cholesterin untersucht wurde. Der maximale Insertionsdruck verschob sich auf $37,4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, was auf einen Einbau hinweist (Abb. 3-23d).

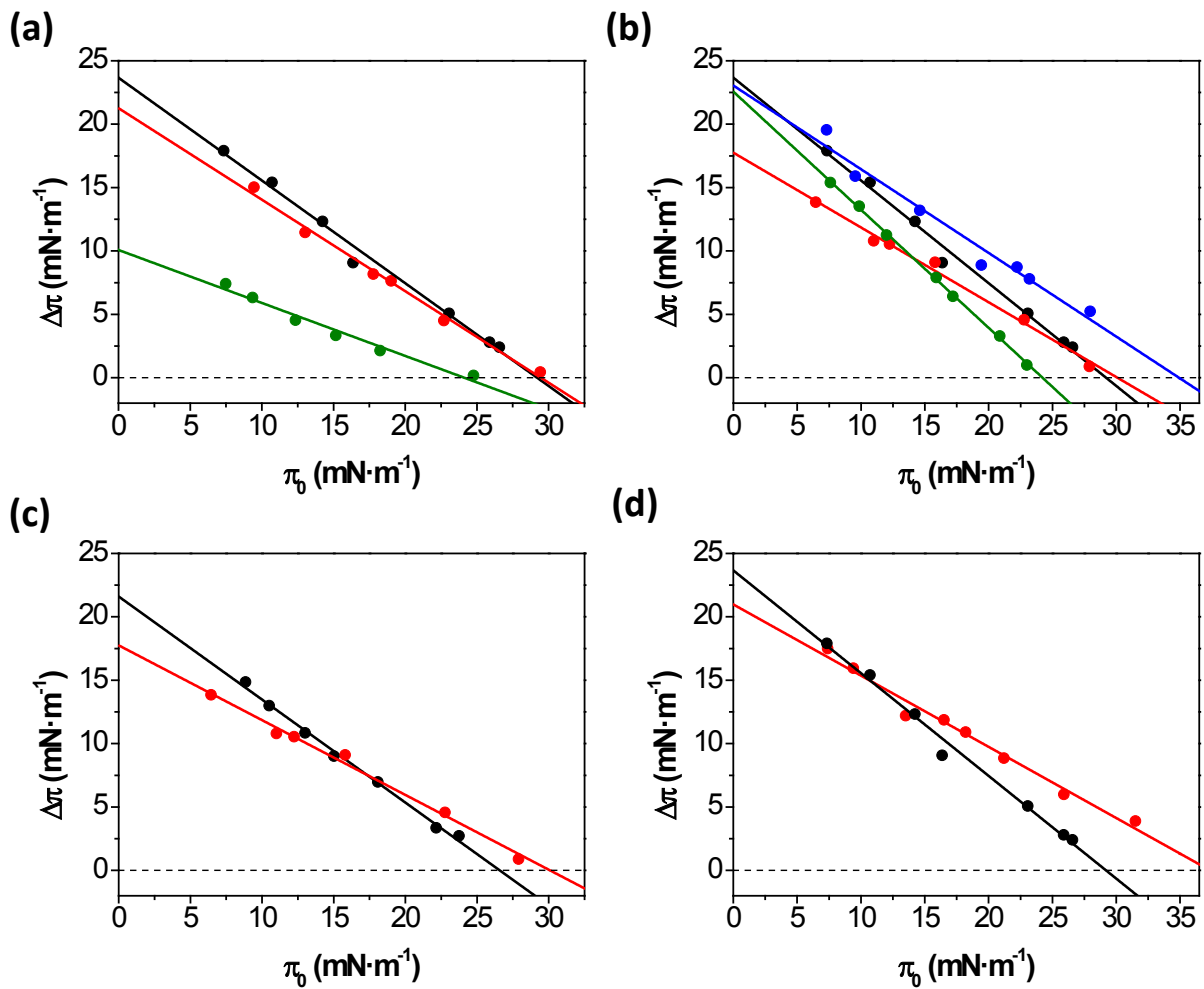


Abb. 3-23: Adsorptionsverhalten von N-BAR-Varianten in verschiedenen Lipidmischungen.

Gezeigt ist das Adsorptionsverhalten bei 20°C von (a) N-BAR (schwarz), $\Delta(1-32)$ BAR (rot) und BAR-Peptid (grün) an eine Monoschicht aus 80% DOPC, 20% DOPA, (b) von N-BAR an verschiedene Lipidmischungen bestehend aus 50% DOPC, 50% DOPA (blau), 80% DOPC, 20% DOPA (schwarz), 90% DOPC, 10% DOPA (rot) und 100% DOPC (grün), (c) von N-BAR an 90% DOPC, 10% DOPA (schwarz), 80% DOPC, 20% DOPS (rot) und (d) von N-BAR an 47% DOPC, 20% DOPA, 33% Cholesterin (schwarz), 80% DOPC, 20% DOPA (rot).

In den bisherigen Experimenten konnte lediglich eine Aussage zum Einbau in eine Membran getroffen werden. Die Frage, ob N-BAR an einer Doppelschicht mit diesen Lipidmischungen auch aktiv ist, also Tubuli aus Liposomen gebildet werden, wurde im Folgenden mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskopie mit Negativkontrastierung untersucht. Als erstes wurde die Bedeutung der DOPA-Konzentration untersucht. In Abb. 3-24 sind Aufnahmen von Liposomen in Gegenwart von N-BAR mit drei verschiedenen Lipidmischungen gezeigt. Die Aufnahmen ohne N-BAR zeigen intakte Liposomen unterschiedlicher Größe. In Gegenwart von N-BAR bildeten sich in beiden Lipidmischungen mit DOPA Tubuli, jedoch mit unterschiedlicher Effizienz. Bei hoher DOPA-Konzentration bildeten sich sehr lange Tubuli unterschiedlichen Durchmessers, während bei niedrigerer DOPA-Konzentration sehr viel weniger Tubuli entstanden, die im Vergleich untereinander

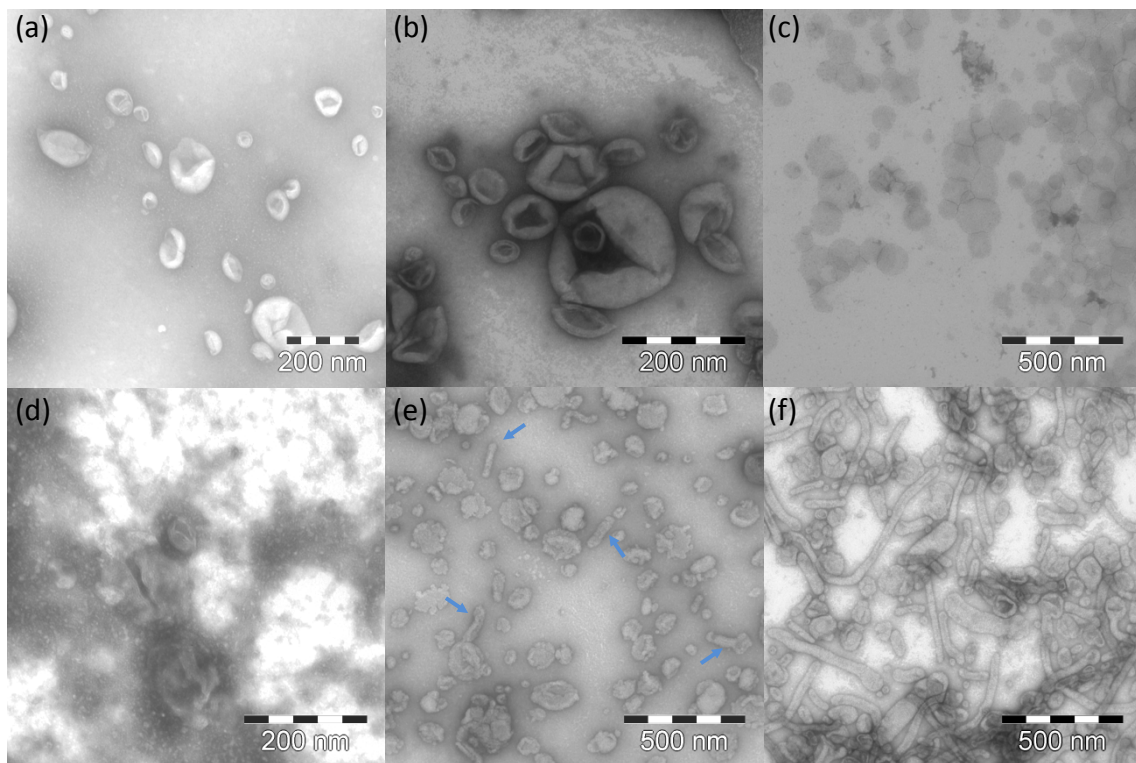


Abb. 3-24: TEM-Aufnahmen von SUVs in Ab- und Anwesenheit von N-BAR.

Gezeigt sind SUVs mit drei verschiedene Lipidmischungen: (a) und (d) 100% DOPC, (b) und (e) 80% DOPC/20% DOPA, (c) und (f) 50% DOPC/50% DOPA. Die Aufnahmen (a)–(c) wurden in Abwesenheit von N-BAR gemessen, (d)–(f) in Anwesenheit von N-BAR. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur.

recht homogen sind. Bei SUVs aus reinem DOPC bildeten sich keine Tubuli in Gegenwart von N-BAR. Die starke nebelartige Schwarzfärbung in der Aufnahme ist auf die Anwesenheit von ungebundenem Protein zurückzuführen. Damit zeigte sich, dass die Konzentration an Lipiden mit negativ geladenen Kopfgruppen entscheidend für Bindung an eine Doppelschicht sowie auch für die biologische Aktivität war. Die bloße Anwesenheit von negativ geladenen Kopfgruppen ist damit kein hinreichendes Kriterium für die Ausbildung von Tubuli.

Weiterhin wurden auch das BAR-Peptid und die $\Delta(1-32)$ BAR-Variante untersucht. Hierfür wurde die Lipidmischung aus 50% DOPC/50% DOPA verwendet. In Abb. 3-25 sind beide EM-Aufnahmen zu sehen. Die Helix0 allein zeigte keinen Einfluss auf die SUVs, es bildeten sich keine Tubuli aus. Interessanterweise zeigte jedoch die $\Delta(1-32)$ BAR Variante eine Tubulisierung der SUVs. Die Form der Tubuli ist recht homogen und sie besitzen auch die gleiche Länge. Eine inhomogene Mischung, wie sie bei dem Wildtypprotein zu finden ist, war nicht beobachtbar. Somit besitzt auch die $\Delta(1-32)$ BAR Variante eine gewisse Tendenz zur Tubulisierung.

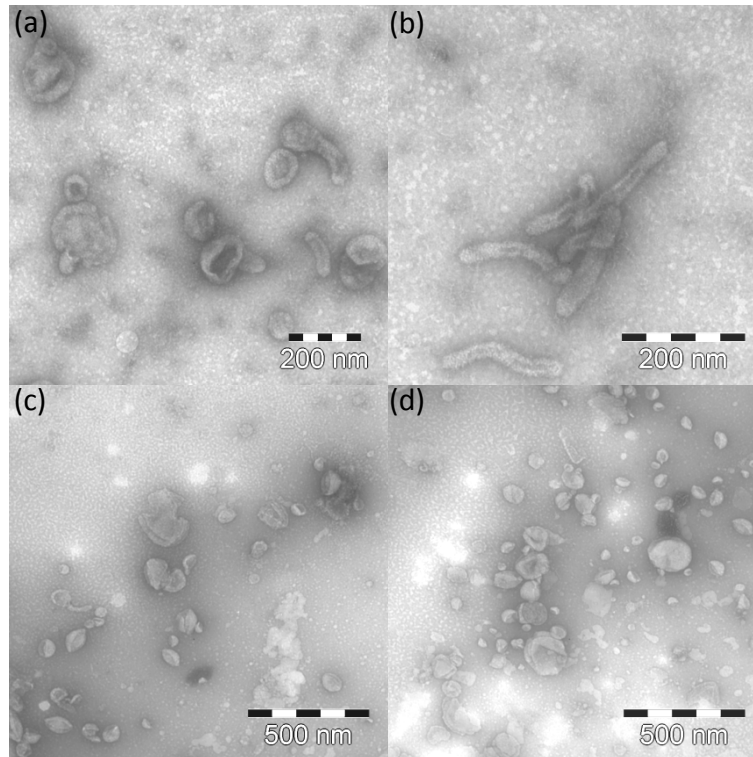


Abb. 3-25: TEM-Aufnahmen von SUVs in Anwesenheit von $\Delta(1-32)$ BAR und dem BAR-Peptid(1-44).

Gezeigt sind SUVs mit einer Lipidmischung von 50% DOPC/50% DOPA in Anwesenheit von (a) und (b) $\Delta(1-32)$ BAR und (c) und (d) dem BAR-Peptid(1-44). Gezeigt sind jeweils zwei verschiedene Ausschnitte der gleichen Probe. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur.

3.3.3 Interaktion zwischen N-BAR und der SH3-Domäne

Die Regulation der N-BAR-Domäne erfolgt durch eine intramolekulare Autoinhibition durch die SH3-Domäne. Für eine genauere Vorstellung der Affinität zwischen den Domänen wurden ITC-Kurven gemessen. In Abb.3-26a ist die Titrationskurve von N-BAR(1-241) mit SH3 zu sehen, wobei keine Bindung zwischen beiden Bindungspartner erkennbar ist. Eine Variation der Konzentration von beiden Bindungspartnern führte zu dem gleichem Ergebnis. Dies konnte auch mit Fluoreszenz und NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Biologisch ist eine fehlende Interaktion zwischen beiden Bindungspartner sehr unwahrscheinlich. Das AmpII/Bin1-Protein weist eine lange *Linkerregion* zwischen beiden Domänen auf, weshalb die N-BAR(1-241)-Domäne um 45 Aminosäurereste am C-Terminus zu N-BAR(1-286) verlängert wurde. Ein erneutes ITC-Experiment mit der verlängerten N-BAR-Variante und der SH3-Domäne zeigte eine starke Interaktion zwischen beiden Bindungspartnern (Abb. 3-26b). Für die Auswertung der Kurve wurde ein einfaches Bindungsmodell mit nur einer Bindestelle verwendet. Die Anpassung ergab einen K_D -Wert von $(19,5 \pm 1,2) \mu\text{M}$ und eine Stöchiometrie von $0,68 \pm 0,01$. Es kann nur vermutet werden, was die Ursache für die ab-

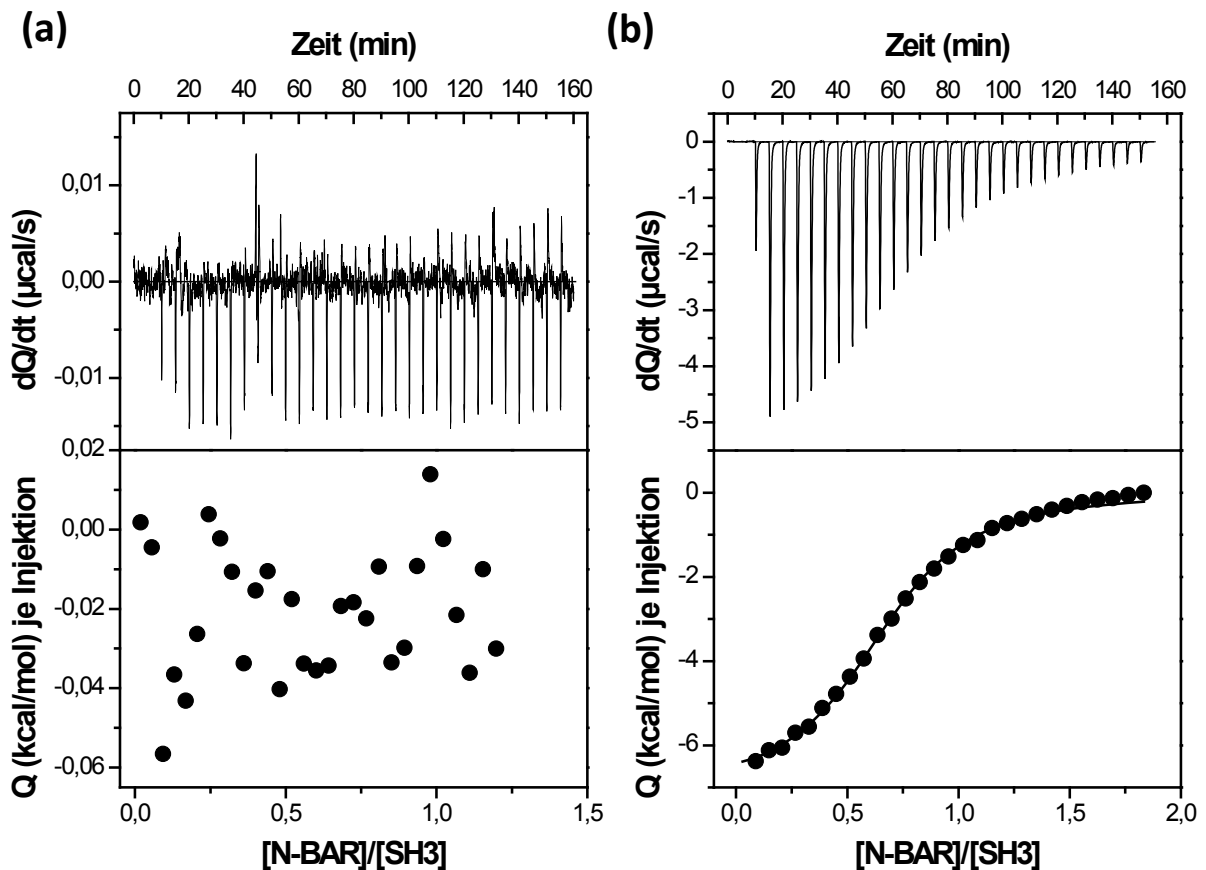


Abb. 3-26: Isothermale Titrationskurven von N-BAR(1-241) und N-BAR(1-286) mit der SH3-Domäne.

In beiden Graphen zeigt die obere Kurve die elektrische Leistung des Gerätes während der Titration an, welche der Leistung zur Konstanthaltung der Temperatur in der Messzelle im Vergleich zur Referenzzelle entspricht. Der untere Graph zeigt die integrierten Wärmemengen aus der oberen Leistungskurve gegenüber dem Verhältnis beider Proteine. (a) Gezeigt ist die Titration von N-BAR(1-241) mit der SH3-Domäne, wobei keine Bindung detektierbar war. (b) Die Titration zeigt die Wechselwirkung der längeren N-BAR(1-286) Variante mit SH3, wobei eine Bindung nachgewiesen werden konnte.

weichende Stöchiometrie von eins sein könnte. Es könnten sowohl gemischte Stöchiometrien auftreten, als auch höher oligomere Zustände von N-BAR(1-286), in denen die Bindestelle nicht zugänglich ist. Dadurch sinkt die Anzahl der bindungskompetenten Proteinmoleküle.

Die zusätzlichen 45 Aminosäurereste enthalten zwei mögliche Binderegionen für die SH3-Domäne: die Exon10-Sequenz, welche eine muskuläre Spleißvariante des AmpII/Bin1-Proteins ist, und eine PXXP-Sequenz, welche typischerweise die bevorzugte Bindesequenz für SH3-Domänen darstellt. Die Exon10-Sequenz ist 15 Aminosäuren lang und enthält hauptsächlich Lysine und Arginine. Die Bindung der SH3-Domäne an diese Sequenz sollte demnach stark elektrostatisch getrieben sein und sich mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumchlorid verändern. Im Gegensatz zu dem PXXP-Motiv, welches durch hydrophobe Wechselwirkungen bedingt ist und veränderte Salzbedingungen keine Veränderung der Bindung verursachen sollten (Abb. 8-8). In Tab.3-5 sind die Ergebnisse der ITC-Kurven bei unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumchlorid zusammengefasst. Aus denen eine Abhängigkeit erkennbar ist. Bei niedrigeren Salzkonzentrationen sank der K_D -Wert, bei höheren stieg

Ergebnisse

er an. Dies deutet stark auf die Bindung zur Exon10-Sequenz hin. Für eine genauere Untersuchung wurden drei weitere Proteinvarianten hergestellt: (i) N-BAR(1-254), welche genau am Beginn der Exon10-Sequenz endet, (ii) N-BAR(1-269), welche die Exon10 Sequenz enthält, (iii) N-BAR(1-286) Δ Exon10, welche an der Aminosäure 286 endet und die Exon10-Sequenz nicht enthält. Die ITC-Kurven zeigten eine eindeutige Bindung der Variante N-BAR(1-269), wohingegen die beiden anderen Varianten keine Bindung aufwiesen (Abb.8-9). Dies belegt umso mehr, dass die Exon10-Sequenz maßgeblich für die Interaktion beider Proteine verantwortlich ist und dass das PXXP-Motiv (AS281-285) hierbei keine Rolle spielt.

Tab. 3-5 Zusammenfassung der ermittelten Dissoziationskonstanten der verschiedenen N-BAR-Varianten und der SH3-Domäne, sowie die Abhängigkeit von der Konzentration an Natriumchlorid.

Variante	[NaCl] (M)	K_D (μ M)	Stöchiometrie
N-BAR(1-241)	0,1	—	—
N-BAR(1-286)	0,05	$9,5 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,01$
	0,1	$19,5 \pm 1,2$	$0,68 \pm 0,01$
	0,3	$35,2 \pm 5,1$	$1,01 \pm 0,05$
N-BAR(1-254)	0,1	—	—
N-BAR(1-269)	0,1	$17,8 \pm 1,2$	$0,55 \pm 0,01$
N-BAR(1-286) Δ Exon10	0,1	—	—

Zur genaueren Charakterisierung, welche Aminosäurereste seitens der SH3-Domäne an der Bindung zur Exon10-Sequenz beteiligt sind, wurden NMR-Spektren gemessen. Der entstehende Komplex zwischen N-BAR(1-286) und der SH3-Domäne ist zu groß, um ihn mit hochauflösender NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Für diese Zwecke wurde nur die Exon10-Sequenz (AS 255-269) verwendet. Die SH3-Domäne zeigte sowohl im freien als auch im gebundenen Zustand ein HSQC-Spektrum mit einer guten Dispersion der Resonanzen. Das Rückgrat beide Zustände konnten mit dem HNCACB und HN(CO)CACB komplett zugeordnet werden (Abb.3-27a). Die Zuordnungstabelle der freien SH3-Domäne befindet sich im Anhang (Tab.7-3). Die Bindung des Exon10-Peptids zeigte eine Veränderung der chemischen Verschiebung einzelner Aminosäuren, resultierend von einer sich verändernden lokalen Umgebung. Die Verschiebungen jedes einzelnen Aminosäurerestes konnten mit Gleichung (29) berechnet werden. In Abb. 3-27b sind die berechneten Verschiebungen über die Sequenz dargestellt und in der Struktur eingefärbt (Abb. 3-27c). Hierbei zeigte sich, dass sich die Bindestelle des Exon10-Peptids im Bereich zweier benachbarter β -Faltblätter, mit den sich räumlich

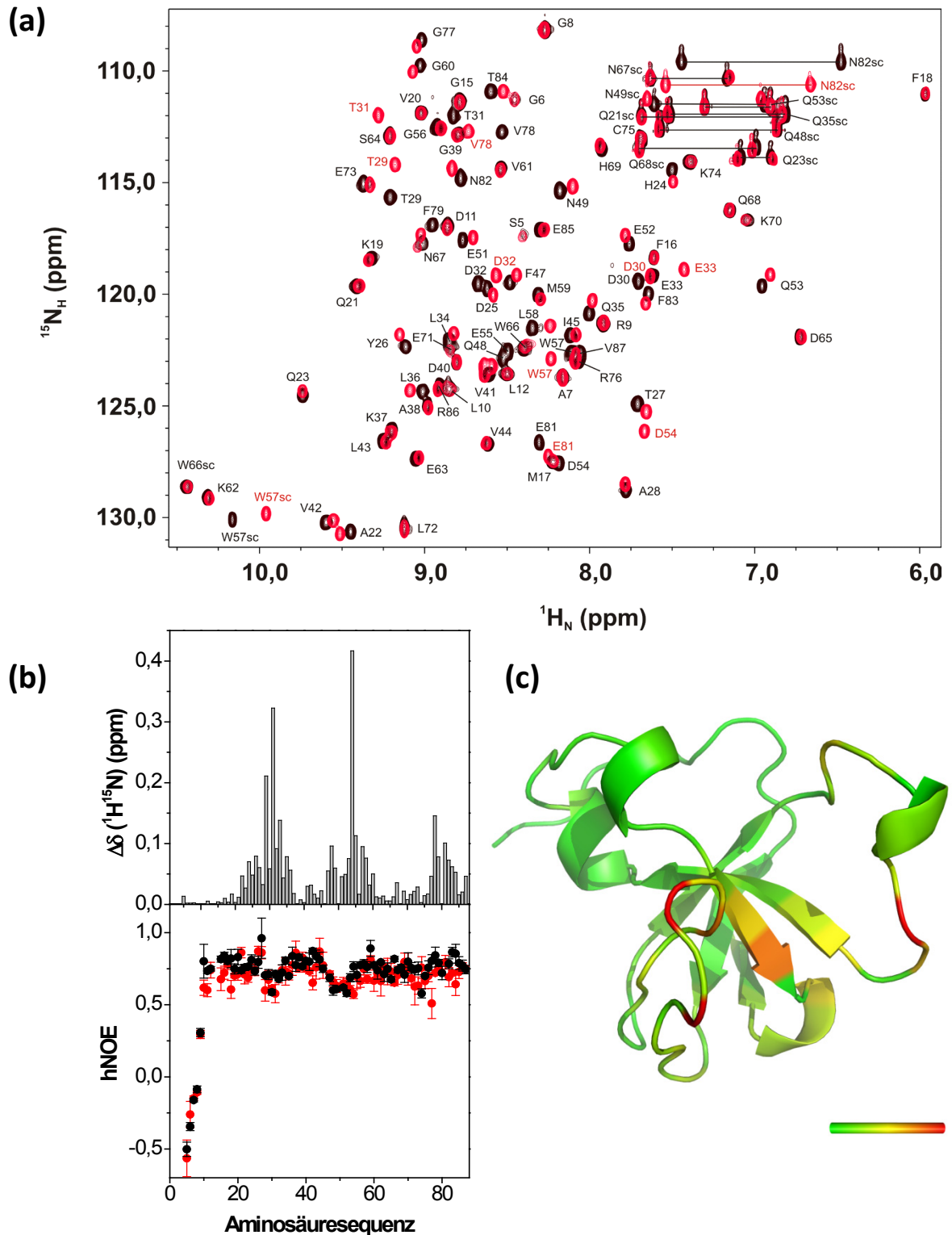


Abb. 3-27 NMR-detektierte Bindung des Exon10-Peptids an die AmpII/Bin1 SH3-Domäne.

(a) Gezeigt ist das zugeordnete ^1H - ^{15}N -HSQC der AmpII/Bin1 SH3-Domäne. Die Aminosäuren sind mit dem Einbuchstabencode und der Sequenzposition versehen. (b) Der obere Graph zeigt die Endpunktanalyse der Titration des Exon10-Peptids bei 20°C. Der untere Graph zeigt die hNOE-Werte über die Sequenz, wobei die schwarzen Kreise die freie SH3-Domäne zeigen und die roten Kreise die Exon10-gebundene SH3-Domäne. (c) Gezeigt ist die Struktur der SH3-Domäne mit den eingefärbten Aminosäuren, welche am Bindungsprozess beteiligt sind. Die Farbskala läuft von grün ($\Delta\delta = 0$ ppm) über gelb ($\Delta\delta = 0,21$ ppm) nach rot ($\Delta\delta = 0,42$ ppm).

Ergebnisse

umgebenden Schleifenregionen befindet. Ein großer Bereich der Sequenz zeigte keine signifikante Änderung bei der Bindung. Zusätzlich wurden auch hNOE-Effekte gemessen, um Änderungen in der Dynamik auf der ps- bis ns-Zeitskala zu untersuchen. Die größte Flexibilität zeigte die SH3-Domäne in den beiden großen unstrukturierten Schleifenregionen der Aminosäurereste A22 bis V41 und I45 bis G56. In diesem Bereich findet auch die Bindung an Exon10-Peptid statt. Die Bindung führte aber zu keiner signifikanten Änderung des hNOE-Wertes und damit der Dynamik auf dieser Zeitskala.

Des Weiteren wurden Titrationsexperimente durchgeführt um zu untersuchen, ob der K_D -Wert des Exon10-Peptids vergleichbar zum Gesamtprotein ist. Neben der bereits verwendeten Isothermalen Titrationskalorimetrie konnte auch Fluoreszenz- und NMR-Spektroskopie verwendet werden (Abb. 3-28, Abb.8-10 und Abb.8-11). Auch hier wurde für alle Messungen ein einfaches Bindemodell mit nur einer Bindestelle zu Grunde gelegt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-6 zusammengefasst. Bei den ermittelten Werten aus der NMR-Spektroskopie ist zu erwähnen, dass es sich hierbei um das Mittel aus allen Aminosäuren handelt, welche an der Bindung beteiligt sind. In Tab. 8-3 ist eine Auflistung mit den ermittelten Werten für jede Aminosäure zu finden, welche an der Bindung beteiligt ist. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das Exon10-Peptid allein die gleichen Bindeeigenschaften besitzt wie im Wildtypprotein. Die ermittelten K_D -Werte stimmen gut mit den Werten für N-BAR(1-286) überein. Dies bestätigt noch einmal die bereits oben getroffene Aussage, dass die Exon10-Sequenz für die Bindung zwischen der N-BAR- und SH3-Domäne verantwortlich ist.

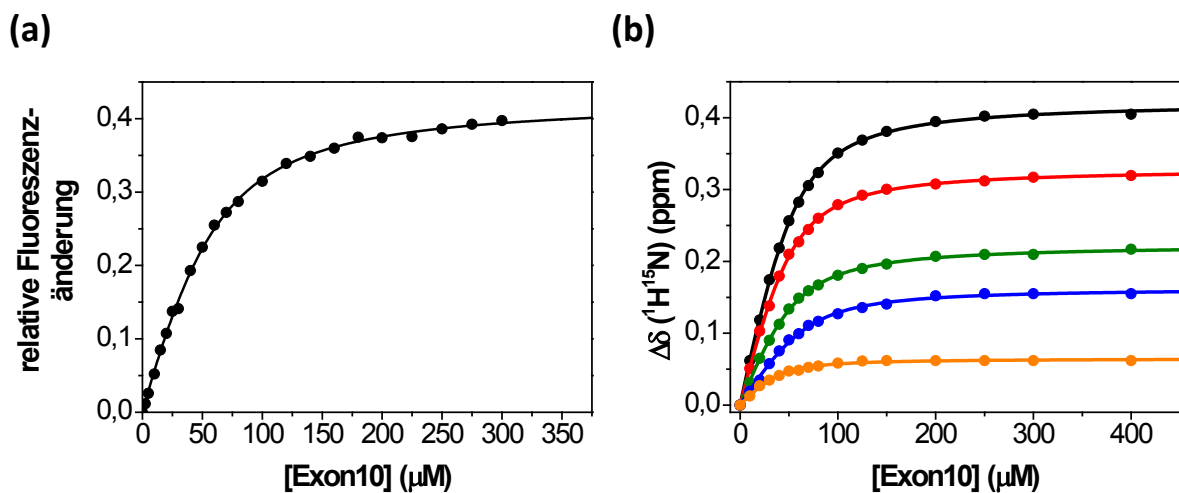


Abb. 3-28: Titrationskurven des Exon10-Peptids an die SH3-Domäne.

Gezeigt ist die Titrationskurven des Exon10-Peptids an die SH3-Domäne detektiert mit (a) Fluoreszenzspektroskopie und mit (b) NMR-Spektroskopie. Dargestellt sind jeweils die Abhängigkeiten der relativen Fluoreszenzänderung bzw. die Veränderung der chemischen Verschiebung von der Konzentration des Exon10-Peptids. In (b) ist der Verlauf der Aminosäuren D54 (schwarz), T31 (rot), T29 (grün), W57sc (blau) und L36 (orange) gezeigt.

Tab. 3-6 Zusammenfassung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der SH3-Domäne und dem Exon10-Peptid, bestimmt mit verschiedenen biophysikalischen Methoden.

Methoden	K_D (μM)	Stöchiometrie
Fluoreszenzspektroskopie	$15,4 \pm 2,5$	$0,72 \pm 0,05$
NMR-Spektroskopie	$11,9 \pm 3,5$	$1,0 \pm 0,2$
ITC	$20,4 \pm 2,3$	$0,98 \pm 0,02$

3.3.4 Zusammenfassende Diskussion

Die Fähigkeit von N-BAR zur Bindung und Tubulisierung von Membranen konnte bereits mehrfach gezeigt werden. Mit Hilfe von fern-UV-CD-Spektroskopie konnte dargestellt werden, dass die Helix0 in Lösung unstrukturiert vorliegt und erst in Gegenwart von Liposomen eine stabile Helix ausbildet¹³⁰. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass eine Bindung an Liposomen nicht nur an natürlichen Lipidmischungen erfolgte, sondern auch an Liposomen mit nur einer Lipidkomponente. Auch die Verwendung anderer Lipidsysteme (DMPG/DHPC-Bicellen) führte zu einer Helixinduktion der Helix0. Die verwendeten DMPG/DHPC-Bicellen können gut für NMR-spektroskopische Untersuchungen verwendet werden^{172; 173}, da sie das Relaxationsverhalten der Bicell-gebundenen Aminosäurereste weniger beeinflussen als dies bei der Verwendung von Liposomen der Fall ist. Die Bindung des BAR-Peptids an die Bicellen führte zu einer Verschiebung der Rückgratsignale und zu einer Separierung aller Seitenkettesignale im HSQC-Spektrum im Vergleich zum freien Peptid, was eine strukturelle Änderung des Peptids zeigt. Im Bereich zwischen den Aminosäuren Thr10 und Gly34 zeigten sich die größten Änderungen in der chemischen Verschiebung und hNOE-Werte größer als 0,5. In Kombination mit den fern-UV-CD-Spektren konnte die α -Helix für diesen Aminosäurebereich identifiziert werden. Die beiden flankierenden Bereiche um diese Aminosäuren können als *random coil* angenommen werden, da sich aus den HSQC-Spektren keine signifikanten Änderungen in der chemischen Verschiebung ergab und die hNOE-Werte nahe null oder negativ waren. Die Länge der strukturierten Helix in DMPG/DHPC-Bicellen ist demnach identisch zu der Länge, die bereits in SDS- bzw. DPC-Micellen gemessen wurde. In diesen Messungen konnte der Beginn der Helix im Bereich von Gly8 für die SDS-Micellen bzw. Thr10 für DPC-Micellen festgesetzt werden¹³⁰. Das Ende der Helix konnte nicht verglichen werden, da in den Untersuchungen in Micellen ein kürzeres Peptid verwendet wurde, welches bei Leu33 endet. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass auch das Ende der Helix vergleichbar zwischen Micellen und Bicellen ist. Die Verwendung von Bicellen ist eine gute Möglichkeit für Untersuchungen an Membrandoppelschichten, jedoch bestehen hier Beschränkungen bei der Wahl der Lipide und deren Kopfgruppen. Informationen zur biologischen

Diskussion

Bedeutung können hiermit nicht gewonnen werden. Mit den NMR-spektroskopischen Untersuchungen bekommt man somit nur Informationen über die Länge der amphiphatischen Helix in einer Doppelschichtmembran, welche etwa 25 Aminosäuren beträgt. Die Länge des Bereiches zwischen der amphiphatischen Helix und Helix1 kann nicht bestimmt werden, da keine gesicherten Informationen zum Beginn der Helix1 vorliegen. Dieser Bereich wird einen Einfluss auf die Anordnung der Helix0 auf der Membran relativ zur Gesamtdomäne haben.

Die Bindung an eine Doppelschichtmembran und die Tubulisierung der Membran durch N-BAR konnte mit Hilfe der Langmuir-Filmwaage-technik und Transmissionselektronenmikroskopie untersucht werden. Mit den Messungen an der Filmwaage konnte dargestellt werden, dass N-BAR(1-241) und $\Delta(1-32)$ BAR ein gleiches Einbauverhalten in die Monoschicht aufweisen. Das BAR-Peptid, welches die Helix0 enthält, zeigte eine sehr viel geringere Tendenz im Einbauverhalten. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Helix0 keine entscheidende Rolle bei der Bindung von N-BAR an eine Lipiddoppelschicht besitzt, sondern das Bindungsverhalten allein durch den *scaffold* von N-BAR dominiert wird. Das Bindungsverhalten ist zudem abhängig von der verwendeten Konzentration an DOPA. In den Lipidmischungen mit 10% bzw. 20% DOPA ergab sich ein maximaler Insertionsdruck nahe $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, bei der Verwendung von 50% DOPA sogar weit über $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ und bei 0% DOPA weit unter $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, was die Bedeutung der negativen Ladung für die Bindung an eine Membran verdeutlicht. Dieses Bindeverhalten ist auch soweit schlüssig, da in der Lipidbinderegion von N-BAR zahlreiche positiv geladene Aminosäuren vorhanden sind, die nur an Lipide mit negativ geladener Kopfgruppe binden und die Bindung dadurch elektrostatisch getrieben ist. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass ein bloßes Vorhandensein einer negativen Ladung nicht zu einem obligatorischen Einbau von N-BAR führt. Der Vergleich zwischen 20% DOPS und 10% DOPA bzw. 20% DOPA ergab, dass ein Einbau bei DOPA sehr viel wahrscheinlicher ist, trotz einer ähnlichen Anzahl negativer Ladungen. DOPS besitzt zwei negative und eine positive Ladung, DOPA dagegen eins bis zwei negative Ladungen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung damit auch davon abhängig ist, wie die negative Ladung zugänglich ist bzw. ob eine sterische oder elektrostatische Hinderung bei der Bindung zu den positiven Aminosäureresten von N-BAR besteht. Bei DOPS muss noch berücksichtigt werden, dass die Bindung des Serins an die Phosphatgruppe über die Hydroxylgruppe der Seitenkette erfolgt und damit die positive Aminogruppe direkt neben der negativen Carboxylgruppe lokalisiert ist und dieses Ionenpaar außerdem Oberflächen-exponiert ist. Es kann zur Zeit nicht hinreichend geklärt werden, ob dies eher ein abstoßendes Bindeverhalten verursacht. Die zweite negative Ladung in DOPS befindet sich an der Phosphatgruppe, wo sich in DOPA auch die beiden negativen Ladungen befinden. Es kann nicht genau gesagt werden, wie bei DOPA das Gleichgewicht zwischen der einfachen oder zweifachen Deprotonierungsform vorliegt. Die bekannten apparenten pK_a -Werte für DMPA liegen für die erste Dissoziationsstufe bei $\sim 3,8$ und für

die zweite Dissoziationsstufe bei ~ 9 ^{174; 175}. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese bei DOPA sehr ähnlich sind. Dies würde bedeuten, dass bei einem pH-Wert von 7,4 das Gleichgewicht auf Seiten der einfachen Deprotonierung vorliegt und demnach DOPA einfach negativ geladen ist. Weiterhin können keine Aussagen zur Oberflächenzugänglichkeit der negativen Ladung getroffen werden. Von der chemischen Struktur her ist die negative Ladung am DOPA zugänglicher als in DOPS. Jedoch kommt sowohl bei beiden Lipiden als auch bei N-BAR noch eine abschirmende Wirkung von Natriumchlorid hinzu, welches sich im Puffer befindet. Die Bedeutung der Zugänglichkeit der negativen bzw. der positiven Ladung wurde bisher noch nicht untersucht und es existieren auch keine vergleichbaren Daten. Zur Zeit kann demnach nur gesagt werden, dass eine Bindung und auch eine Aktivität bei den hier verwendeten Bedingungen erfolgt, jedoch müssen noch weitere Untersuchungen bezüglich der Abhängigkeit von der Konzentration an Natriumchlorid und der Abhängigkeit unterschiedlicher Lipidkopfgruppen erfolgen.

Es kann keine Aussage getroffen werden, wie N-BAR auf dem Monolayer orientiert ist. Es besteht die Möglichkeit, dass N-BAR mit der konkaven Seite oder aber mit einer gedrehten Orientierung an die Membran bindet. Es existieren Arbeiten, in denen davon ausgegangen wird, dass die Bindung an eine Membran flach und nicht mit der konkaven Seite erfolgt. Dies konnte sowohl in experimentellen Arbeiten, als auch in Simulationen gezeigt werden¹²⁶. Die experimentellen Befunde basieren auf EM-Aufnahmen von FBP17-F-BAR, in denen aus einer berechneten 2D-Projektion keine Übereinstimmung zur erwarteten Bindung mit der konkaven Seite zu finden war. Die weitere Analyse ergab, dass FBP17-F-BAR mit einer um etwa 60° gedrehten Orientierung zur Membrannormalen an die Membran bindet. Diese Anordnung erlaubt die Gruppierung entlang der Armregionen von F-BAR auf der Membran, bevor sich diese Anordnung mit ihrer konkaven Seite in die Membran dreht, laterale Kontakte ausbildet und die Tubulierung startet. Diese beobachtete Seitenlage konnte für N-BAR bisher nur in Simulationen nachgewiesen werden¹⁷⁶.

Die Bedeutung der negativen Ladung auf die Aktivität von N-BAR konnte durch Transmissions-elektronenmikroskopieaufnahmen sichtbar gemacht werden. Prinzipiell gilt auch hier: je höher die Anzahl an negativen Ladungen (also je höher die Konzentration an DOPA), desto mehr Tubuli werden aus SUVs im gleichen Zeitraum gebildet. Bei Abwesenheit von DOPA zeigt sich entsprechend auch keine Tubulisierung. Interessanterweise zeigt sich auch eine Tubulisierung der $\Delta(1-32)$ BAR-Domäne. Die Anzahl der Tubuli und damit auch die Aktivität ist zwar sehr viel geringer, der experimentelle Befund zeigt aber, dass N-BAR auch ohne die Helix0 aktiv ist. Das BAR-Peptid allein zeigt keine Tendenz zur Tubulibildung. Die Bedeutung der Helix0 und des *scaffolds* auf die Tubulibildung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass der *scaffolding mechanism* wahrscheinlicher ist als der *hydrophobic insertion mechanism*. Experimentelle Beweise liegen für beide Mechanismen vor¹⁷⁷. Der *hydrophobic insertion mechanism* geht nicht immer nur von

Diskussion

amphipathischen Helices aus, sondern bezieht sich auch auf amphipathische Motive, wie sie z.B. zusätzlich in Endophilin N-BAR vorkommen^{125; 129}. Generell geht dieser Mechanismus davon aus, dass das amphipathische Motiv die Krümmung der Membran erzeugt und der *scaffold* von BAR die Krümmung nur erkennen kann. Wobei es aber Untersuchungen gibt, welche die Erkennung der gekrümmten Membran durch den *scaffold* widerlegen und zeigen, dass auch die Erkennung durch das amphipathische Motiv erfolgt¹²⁸. Damit würde die gesamte Funktion von N-BAR allein aus dem amphipathischen Motiv resultieren. Folglich ist dann auch jedes Protein mit einem amphipathischen Motiv/Helix in der Lage eine Membrankrümmung zu erkennen bzw. sogar zu induzieren. Dem gegenüber stehen die TEM-Aufnahmen der $\Delta(1-32)$ BAR-Domäne, wobei ohne die Helix0 eine Membrankrümmung erzeugt werden konnte. Bei Endophilin N-BAR konnte gezeigt werden, dass die Helix0 für die lateralen Interaktionen entlang der Tubusachse verantwortlich ist und damit in der Lage ist benachbarte N-BAR-Moleküle vernetzen kann^{132; 178; 179}. Hierbei wird vermutet, dass diese Interaktionen entscheidend für die Stabilisierung des N-BAR-Gerüsts auf dem Tubus sind, da die Interaktionen zwischen benachbarten Dimeren senkrecht zur Tubusachse ansonsten zu gering sind. Somit besitzt die Helix0 nur eine entscheidende Rolle in der Strukturbildung und Stabilisierung des supramolekularen N-BAR-Gerüsts und kann keine Membrankrümmungen induzieren bzw. erkennen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Helix0 nur eine untergeordnete Rolle bei der Induzierung und Erkennung von Membrankrümmungen besitzt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei Endophilin N-BAR ohne Helix0 keine Tubulisierung nachzuweisen ist¹¹⁹, während in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass Amphiphysin-N-BAR dazu in der Lage ist. Der Gegensatz in beiden Arbeiten ist die Lipidzusammensetzung. Die hier verwendete Mischung besitzt mit 50% DOPA eine starke negative Oberflächenladung. Dadurch kann vermutet werden, dass bei einer stark negativen Oberflächenladung die Stabilität bzw. die Anordnung von $\Delta(1-32)$ BAR auf der Membran ausreichend ist um die Tubulisierung zu starten. Dies zeigt, dass die Lipidmischung einen maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität von N-BAR besitzt. Neben der negativen Oberflächenladung wird häufig PIP(4,5)P₂ erwähnt, welches für die Membranbindung und Tubulisierung von entscheidender Bedeutung ist. Jedoch konnte bisher noch nicht gezeigt werden, ob die chemische Struktur mit den negativen Ladungen determinierend ist oder nur die negativen Ladungen allein. Jedes PIP(4,5)P₂-Molekül kann jeweils zwei negative Ladungen an jeder Phosphatgruppe besitzen und eine negative Ladung an der Phosphatgruppe zwischen Inositol und den Fettsäureketten. Im PIP(4,5)P₂ existiert ein sehr komplexes Wasserstoffbrückennetzwerk, wodurch die genauen pK_{a2}-Werte für Phosphorgruppen trotz vieler Untersuchungen unklar sind¹⁸⁰. Demnach ist auch das Gleichgewicht zwischen allen Deprotonierungszuständen unbekannt. Zumal die Wechselwirkung mit anderen Lipiden und dem vorhandenen Salz im Puffer eine genaue Aussage zusätzlich erschweren. Es kann demnach nur davon ausgegangen werden, dass PIP(4,5)P₂ in geringen Konzentrationen eine

starke lokale negative Ladung hervorbringt und damit eine Bindung von N-BAR ermöglicht. In der chemischen Struktur sind die Lokalisierung der negativen Ladung zwischen DOPA und PIP(4,5)P₂ sehr ähnlich, denn in beiden Fällen kommt die negative Ladung von einer Phosphatgruppe. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass N-BAR sowohl DOPA als auch PIP(4,5)P₂ erkennt und nicht unterscheiden kann, woher die negative Ladung kommt, sondern beide Substanzen in der Membran toleriert werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt von PIP(4,5)P₂ ist das Vorhandensein einer großen Kopfgruppe. Durch diese Kopfgruppe besitzt PIP(4,5)P₂ eine umgekehrte Kegelstumpfform. Diese Form begünstigt die Ausbildung von positiven Membrankrümmungen, während zylindrische Lipide, wie PC und PS, eine flache Membran begünstigen. Damit verleiht die Kopfgruppe den Lipiden eine ganz bestimmte Form, die einen zusätzlichen Einfluss auf die Membranstruktur und -dynamik besitzt¹⁸¹.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass die Exon10-Sequenz an die Amphiphysin-SH3-Domäne bindet. Dies konnte bisher in einigen Arbeiten schon über biochemische Methoden¹⁸² gezeigt werden. Es kann ausgeschlossen werden, dass eine Interaktion von N-BAR mit SH3 über PXXP-Motive erfolgt. Das PXXP-Motiv ist das ursprünglich identifizierte Bindemotiv für SH3-Domänen¹⁸³. Mittlerweile wurden jedoch auch SH3-Domänen identifiziert, die zusätzlich auch Bindemotive mit positiv geladenen Aminosäuren enthalten. Es existieren bisher nur marginale strukturelle Informationen zur Bindung beider Domänen und keine Informationen zur Bindungsstärke, da die Bindung zwischen N-BAR und der SH3-Domäne bisher nur über biochemische Methoden nachgewiesen wurde. Die Dissoziationskonstante zwischen dem Exon10 und der SH3-Domäne liegt im Bereich von 10-20 μ M, welche bereits in vielen anderen SH3-Domänen nachgewiesen werden konnte. Der ermittelte K_D -Wert ist konsistent zwischen den verschiedenen N-BAR-Varianten und bei den verschiedenen verwendeten biophysikalischen Methoden. Die Bindung ist nicht sehr stark und elektrostatisch getrieben, da die Exon10-Sequenz positiv geladene Aminosäuren enthält und die Dissoziationskonstante von der eingesetzten Konzentration an Natriumchlorid abhängig ist. Hohe Konzentrationen an Natriumchlorid führen somit zu einer Dissoziation des Komplexes. Die NMR-Titration zeigte auch die Aminosäuren seitens der SH3-Domäne, welche an der Bindung beteiligt sind. Diese sind zum größten Teil polare Aminosäuren und negativ geladenen Aminosäuren. Die autoinhibitorische Funktion von SH3 konnte bisher in einigen Studien nachgewiesen werden. Es existieren sowohl N-BAR-Domänen mit einer SH3-Domäne als auch F-BAR-Domänen. Es wird davon ausgegangen, dass in beiden Fällen das Funktionsprinzip das gleiche ist. Die Dissoziation des Komplexes geschieht meist durch Bindung mit Dynamin. Hierbei wird vermutet, dass durch die Bindung SH3 gelöst wird und dadurch die BAR-Domäne eine Konformationsänderung erfährt, die in der Lage ist, die Membran zu krümmen. Es wird vermutet, dass durch die Bindung der SH3-Domäne die Membranbindung von der jeweiligen BAR-Domäne nicht

Diskussion

beeinflusst wird, sondern nur die Aktivität der BAR-Domäne. Die Bindung von Dynamin und SH3 wird durch die PRD-Domäne von Dynamin vermittelt, welche mehrere PXXP-Motive enthält. Die Bindestelle der SH3-Domäne für die Exon10-Sequenz und das PXXP-Motiv sind identisch, wobei beide in Konkurrenz miteinander stehen.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane, dimere AmpiphysinII/Bin1-N-BAR-Domäne auf ihr Proteinfaltungsverhalten mit verschiedenen spektroskopischen Methoden umfassend untersucht, sowie ihre Eigenschaften in der Lipidbindung näher charakterisiert.

Die thermodynamische Stabilität von N-BAR wurde mit Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergängen verfolgt, welche mit Fluoreszenz und fern-UV-CD-Spektroskopie detektiert wurden. Hierbei zeigt sich eine Verschiebung des Übergangsmittelpunktes zu höheren Harnstoffkonzentrationen mit zunehmender Proteinkonzentration. Mit Hilfe von *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie konnten während der Rückfaltung vier und während der Entfaltung zwei verschiedene kinetische Phasen identifiziert werden. In den Rückfaltungskinetiken zeigt eine Phase mit zunehmender Proteinkonzentration eine Beschleunigung, was auf die Dimerisierung zurückzuführen ist. Die Detektion der Rückfaltung mit Fluoreszenzanisotropie und fern-UV-CD-Spektroskopie zeigen nur die Dimerisierungsreaktion, was verdeutlicht, dass es sich hierbei um ein globales Faltungsereignis handelt. Weitere Dimerisierungsreaktionen lassen sich nicht nachweisen. Die Bildung der gesamten Sekundärstruktur erfolgt in den ersten drei Rückfaltungsphasen. Durch Doppelsprung- und Tripelsprungexperimenten mit variablen *delay*-Zeiten konnte ein paralleler Faltungsweg identifiziert werden, wobei die beiden Faltungspfade durch unterschiedliche Konformationen der Prolylreste entstehen. Somit lässt sich ein Faltungsweg beschreiben, in denen alle Moleküle mit nativer Prolylkonformation schnell falten, während alle Moleküle mit nicht-nativer Prolylkonformation langsam falten. Ebenso zeigen die Mehrfachsprungexperimente, dass alle detektierbaren Intermediate auf dem Faltungsweg von N-BAR liegen. Durch die Bestimmung der Aktivierungsenergie und die Messung der Abhängigkeit von der Ionenstärke lässt sich die langsamste Rückfaltungsphase einer Prolylisomerisierung zuordnen.

Die Untersuchung der Eigenschaften der Lipidbindung erfolgte hauptsächlich mit Langmuir-Filmwaage-messungen und der Detektion der Tubulisierung mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Die Bindung von N-BAR an Membranen ist abhängig von der Konzentration an Lipiden mit negativ geladenen Kopfgruppen. Hierfür wurde hauptsächlich die Konzentration von DOPA variiert, um unterscheiden zu können, ab welcher Konzentration von DOPA eine Bindung an die Membran erfolgt und auch eine Tubulisierung erfolgt. Hierbei wird deutlich, dass zwar eine geringe Konzentration an DOPA ausreicht damit N-BAR an die Membran bindet, jedoch höhere Konzentrationen von DOPA notwendig sind, um auch die Tubulisierung ausreichend zu starten.

Weiterhin wurde die intramolekulare Wechselwirkung von N-BAR mit der SH3-Domäne mit verschiedenen biophysikalischen Methoden detailliert untersucht. Die Bindung der beiden Domänen beruht hauptsächlich auf der Wechselwirkung der SH3-Domäne mit der Exon10-Sequenz.

Zusammenfassung

Untersuchungen in denen die Exon10-Sequenz nicht anwesend war, zeigen auch kein Bindungsereignis beider Domänen. Ferner konnte auch die Lokalisierung der Bindestelle der Exon10-Sequenz an der SH3-Domäne strukturell identifiziert werden.

5 Summary

In this thesis, the human dimeric AmphiphysinII/Bin1 N-BAR domain was analysed in terms of its protein folding behaviour by various spectroscopic methods and its lipid interaction, because the *in vivo* function of BAR-domains includes membrane bending and curvature sensing.

The thermodynamic stability of N-BAR was analysed by urea equilibrium transition curves followed by fluorescence and far-UV CD spectroscopy. Here, the transition midpoint shows a shift to higher urea concentrations with increasing protein concentrations. With stopped-flow fluorescence spectroscopy could be identified four refolding phases and two unfolding phases. In refolding kinetics one phase displays an acceleration with increasing protein concentration, representing the dimerisation step. The detection of refolding with fluorescence anisotropy and far-UV CD spectroscopy shows only this dimerisation refolding phase, which supports the dimerisation as the main global folding event. The formation of secondary structure occurs during the first three refolding phases. The estimation of activation energies and the dependence upon the ionic strength of the slowest refolding phase assigns this phase to a proline isomerisation. Double- and triple-jump experiments with variable delay times reveal a parallel folding behaviour of N-BAR, where the two different folding pathways differ in their proline conformation. One folding pathway contains all fast refolding molecules already with the native proline conformation while the other one contains all slow refolding molecules with non-native prolines. The double mixing experiments also show that all detectable intermediates are on-pathway intermediates.

The analysis of the lipid binding properties was mainly performed by Langmuir film balance measurements, while tubulation was detected by transmission electron microscopy. The binding of N-BAR to lipids depends on the concentration of lipids with negatively charged headgroups, which was controlled by the DOPA content. This allows to differentiate at which concentration of DOPA a binding occurs and at which concentration tubulation. It became clear, that low concentrations of DOPA are necessary for binding of N-BAR but higher concentrations of DOPA are needed for starting tubulation.

Furthermore the intramolecular interaction of N-BAR and its SH3 domain was analysed in molecular detail with different biophysical methods. The binding of both domains is based on the interaction of the exon10 sequence of N-BAR with the SH3 domain. With NMR-spectroscopy the binding region of exon10 at the SH3 domain could be identified at residue resolution.

6 Weitere wissenschaftliche Ergebnisse

6.1 Einfluss der Prolin-Alanin Substitution auf die Stabilität und Rückfaltung von Onconase

Onconase ist ein RNase A homologes Protein aus den Oocyten und frühen Embryonen des Nördlichen Leopardenfrosches (*Rana pipiens*). Im Vergleich zu RNase A zeigt Onconase eine vergleichbare Tertiärstruktur bei einer Sequenzidentität von 28%¹⁸⁴. Es handelt sich um eine Endoribonuclease mit einer Substratspezifität zu doppelsträngiger RNA. Der Katalysemechanismus ist zwischen beiden Proteinen vergleichbar, da sie ein vergleichbares aktives Zentrum enthalten¹⁸⁵. Weiterhin besitzt Onconase eine hohe thermodynamische Stabilität von mehr als 60 kJ/mol, was auf eine geringere Molekülflexibilität und einem N-terminalen Pyroglutamatrest im Vergleich zu RNase A zurückzuführen ist¹⁸⁶. Die vier vorkommenden Proline zeigen alle eine *trans*-Konfiguration im nativen Zustand auf. Die Faltungskinetiken von Onconase weisen drei Rückfaltungs- und zwei Entfaltungsphasen auf. Das Faltungsverhalten kann demnach mit einem Dreizustandsmodell mit einem *on-pathway* Intermediat beschrieben werden³². Die langsamste der drei beobachteten Rückfaltungsphasen wird als eine *cis/trans*-Isomerisierung beschrieben. Drei der vier Prolinreste (Pro41, Pro 43 und Pro95) liegen in Bereiche des sich schnell faltenden Intermediates, während Pro74 in einer flexiblen Schleifenregion liegt, die erst später ihre native Struktur einnimmt. In Kooperation mit PD Dr. Ulrich Arnold sollte untersucht werden, welche der vier Prolinreste maßgeblich an der langsamen Rückfaltungsreaktion beteiligt ist. Hierfür wurden alle Prolinreste einzeln gegen Alanin ersetzt und ihr Einfluss auf die thermodynamische Stabilität und den Rückfaltungskinetiken untersucht. Die Struktur der Varianten bleibt dabei im Vergleich zum Wildtypprotein erhalten, wie durch fern-UV CD-Spektroskopie und 1D ¹H NMR-Spektroskopie gezeigt werden konnte. Die thermische Stabilität ist bei den einzelnen Varianten leicht verändert, während die P41A und P74A vergleichbar zum Wildtypprotein ist, zeigt sich bei P94A eine Verringerung (- 4,6 °C) und bei P43A eine Erhöhung (+ 6,5 °C) der Übergangstemperatur im Vergleich zum Wildtypprotein. Die Rückfaltungskinetiken aller Varianten zeigen genau wie der Wildtyp ein dreiphasiges Verhalten. Die schnellen und mittleren Rückfaltungsphasen zeigen hierbei die größte Diversität. Die langsamste Rückfaltungskinetik ist bei allen Varianten ausgeprägt und besitzt die gleiche Geschwindigkeitskonstante im Vergleich zum Wildtypprotein. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass sich das Faltungsverhalten von Onconase nicht verändert hat. Durch das weitere Vorhandensein aller Faltungsphasen fand keine Vereinfachung des Faltungsmodells statt und die langsame Rückfaltungsphase kann keinem einzelnen Prolin zugeordnet werden. Die weitere Existenz dieser Phase kann mehrere Ursachen haben. Es besteht die Möglichkeit, dass mehrere Xaa-

Pro Isomerisierungen an der langsamen Phase beteiligt sind oder es sich auch um eine nichtprolinische Isomerisierung handelt¹⁸⁷, wie sie beispielsweise bei prolinfreiem Tendamistat gefunden wurde. Das Vorhandensein von mehreren Disulphidbrücken in Onconase kann ebenfalls zu einem langsamen Faltungsschritt führen¹⁸⁸, aufgrund einer langsamen Umstrukturierung oder Konformationsänderung. Es sind demnach noch weitere Experimente notwendig, um die molekulare Ursache der langsamen Rückfaltungsreaktion zu klären.

6.2 Etablierung eines Reinigungsprotokolls für das AmphiphysinII/Bin1-Protein

Das AmphiphysinII/Bin1-Protein ist das Volllängenprotein aus N-BAR und SH3, welche über eine lange Linkerregion von etwa 130 Aminosäuren miteinander verbunden sind. Für die Expression wurde das Protein zunächst in den pET14b-Vektor mit NdeI und BamHI kloniert und wurde zunächst analog zum bestehenden Reinigungsprotokoll von N-BAR exprimiert und gereinigt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass nach dem letzten Reinigungsschritt neben AmpII/Bin1 kleinere Proteinbanden im SDS-Gel zu sehen waren. Da die Expression und Reinigung von N-BAR sauberes Protein liefert und das gleiche Protokoll verwendet wurde, konnten Verunreinigungen durch andere Proteine ausgeschlossen werden. Es liegt demnach nahe, dass es sich hierbei um Abbaufragmente von AmpII/Bin1 handelt. Es war zunächst unklar, ob der Abbau bereits während der Expression oder der Reinigung (bei der Abspaltung des His₆-Tags durch Thrombin) erfolgte. Eine Reinigung ohne die Abspaltung des His₆-Tags brachte nicht den gewünschten Erfolg. Demnach kann der Abbau nur während der Expression erfolgen. Es erfolgten mehrere Versuche bei unterschiedlichen Induktionszeiten und/oder Induktionstemperaturen (25 °C, 30 °C, 42 °C, 45 °C), die jedoch alle nicht den gewünschten Erfolg brachten. Auch eine Abtrennung der Abbaufragmente durch weitere Chromatographieschritte führte zu keinem sauberem Protein. Deswegen erfolgte die Klonierung eines zweiten Affinitätstags an den C-Terminus. Hier wurde sich für einen StrepII-Tag entschieden. Das bestehende Reinigungsprotokoll von N-BAR wurde damit um zweite Affinitätschromatographie erweitert, die nach der Metallaffinitätschromatographie und der Thrombinspaltung erfolgte. Die Durchführung der StrepII-Affinitätschromatographie erfolgte nach Angaben des Herstellers. Mit Einführung des zweiten Affinitätstags konnten alle Abbauprodukte erfolgreich entfernt werden und es wurde sauberes Protein erhalten. Auf Grundlage des erstellten Reinigungsprotokolls konnten bereits einige Messungen mit AmpII/Bin1 an Membranen von Ben Meinen während seiner Masterarbeit durchgeführt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of proteins chains. *Science* **181**, 223-230.
2. Donald Voet & Voet, J. G. (2004). *Biochemistry*, Wiley & Sons.
3. Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S. & Weikel, T. R. (2008). The protein folding problem. *Annu Rev Biophys* **37**, 289-316.
4. Pfeil, W. (1998). *Protein stability and folding*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
5. Dill, K. A. & Shortle, D. (1991). Denatured States of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 795-825.
6. Bowler, B. E. (2012). Residual structure in unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 4-13.
7. Neri, D., Billeter, M., Wider, G. & Wüthrich, K. (1992). NMR Determination of Residual Structure in a Urea- Denatured Protein, the 434-Repressor. *Science* **257**, 1559-1563.
8. Shan, B., Eliezer, D. & Raleigh, D. P. (2009). The unfolded state of the C-terminal domain of the ribosomal protein L9 contains both native and non-native structure. *Biochemistry* **48**, 4707-19.
9. Tiffany, M. L. & Krimm, S. (1968). Circular dichroism of poly-L-proline in an unordered conformation. *Biopolymers* **6**, 1767-70.
10. Makhatadze, G. I. & Privalov, P. L. (1992). Protein Interactions with Urea and Guanidinium Chloride - A Calorimetric Study. *Journal of Molecular Biology* **226**, 491-505.
11. Makhatadze, G. I. & Privalov, P. L. (1993). Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. I. The enthalpy of hydration. *J Mol Biol* **232**, 639-59.
12. Privalov, P. L. (1993). Physical basis of the stability of the folded conformations of proteins. In *Protein folding* (Creighton, T. E., ed.). Freeman, New York.
13. Makhatadze, G. I. & Privalov, P. L. (1996). On the entropy of protein folding. *Protein Science* **5**, 507-510.
14. Lazaridis, T. & Karplus, M. (2003). Thermodynamics of protein folding: a microscopic view. *Biophys Chem* **100**, 367-95.
15. Lumry, R. & Eyring, H. (1954). Conformation Changes of Proteins. *J Phys Chem* **58**, 110-120.
16. Plaza del Pino, I. M., Ibarra-Molero, B. & Sanchez-Ruiz, J. M. (2000). Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases. *Proteins* **40**, 58-70.
17. Jaswal, S. S., Sohl, J. L., Davis, J. H. & Agard, D. A. (2002). Energetic landscape of alpha-lytic protease optimizes longevity through kinetic stability. *Nature* **415**, 343-6.
18. Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in Enzymology* **131**, 266-280.
19. Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl α - chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**, 8063-8068.
20. Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. & White, F. H. (1961). The kinetics of the formation of native ribonucleases during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1309-1314.
21. Levinthal, C. J. (1968). Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* **65**, 44-45.
22. Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884-890.
23. Fersht, A. R. & Daggett, V. (2002). Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* **108**, 573-82.
24. Baldwin, R. L. (2008). The search for folding intermediates and the mechanism of protein folding. *Annu Rev Biophys* **37**, 1-21.

25. Roder, H. & Colon, W. (1997). Kinetic role of early intermediates in protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 15-28.
26. Jaenicke, R. (1999). Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 155-241.
27. Brockwell, D. J. & Radford, S. E. (2007). Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr Opin Struct Biol* **17**, 30-7.
28. Kiefhaber, T. (1995). Kinetic traps in lysozyme folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9029-9033.
29. Lorenz, T. & Reinstein, J. (2008). The influence of proline isomerization and off-pathway intermediates on the folding mechanism of eukaryotic UMP/CMP Kinase. *J Mol Biol* **381**, 443-55.
30. Khorasanizadeh, S., Peters, I. D. & Roder, H. (1996). Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nature Struct. Biology.* **3**, 193-205.
31. DeVries, I., Ferreiro, D. U., Sanchez, I. E. & Komives, E. A. (2011). Folding kinetics of the cooperatively folded subdomain of the IkappaBalpha ankyrin repeat domain. *J Mol Biol* **408**, 163-76.
32. Schulenburg, C., Low, C., Weininger, U., Mrestani-Klaus, C., Hofmann, H., Balbach, J., Ulbrich-Hofmann, R. & Arnold, U. (2009). The folding pathway of onconase is directed by a conserved intermediate. *Biochemistry* **48**, 8449-57.
33. Martin, A. & Schmid, F. X. (2003). The folding mechanism of a two-domain protein: folding kinetics and domain docking of the gene-3 protein of phage fd. *J. Mol. Biol.* **329**, 599-610.
34. Roder, H., Maki, K., Cheng, H. & Shastry, M. C. (2004). Rapid mixing methods for exploring the kinetics of protein folding. *Methods* **34**, 15-27.
35. Plaxco, K. W. & Dobson, C. M. (1996). Time-resolved biophysical methods in the study of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 630-636.
36. Krantz, B. A., Mayne, L., Rumbley, J., Englander, S. W. & Sosnick, T. R. (2002). Fast and slow intermediate accumulation and the initial barrier mechanism in protein folding. *J Mol Biol* **324**, 359-71.
37. Löw, C., Weininger, U., Zeeb, M., Zhang, W., Laue, E. D., Schmid, F. X. & Balbach, J. (2007). Folding mechanism of an ankyrin repeat protein: scaffold and active site formation of human CDK inhibitor p19(INK4d). *J Mol Biol* **373**, 219-31.
38. Baldwin, R. L. (1996). On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Fold. Des.* **1**, R1-R8.
39. Bollen, Y. J., Sanchez, I. E. & van Mierlo, C. P. (2004). Formation of on- and off-pathway intermediates in the folding kinetics of *Azotobacter vinelandii* apoflavodoxin. *Biochemistry* **43**, 10475-89.
40. Viguera, A. R., Martinez, J. C., Filimonov, V. V., Mateo, P. L. & Serrano, L. (1994). Thermodynamic and kinetic analysis of the SH3 domain of spectrin shows a two-state folding transition. *Biochemistry* **32**, 2142-2150.
41. Jackson, S. E. & Fersht, A. R. (1991). Folding of Chymotrypsin Inhibitor-2 .1. Evidence for a Two- State Transition. *Biochemistry* **30**, 10428-10435.
42. Friel, C. T., Beddard, G. S. & Radford, S. E. (2004). Switching two-state to three-state kinetics in the helical protein Im9 via the optimisation of stabilising non-native interactions by design. *J Mol Biol* **342**, 261-73.
43. Sanz, J. M. & Fersht, A. R. (1993). Rationally designing the accumulation of a folding intermediate of barnase by protein engineering. *Biochemistry* **32**, 13584-92.
44. Martin, A. & Schmid, F. X. (2003). A proline switch controls folding and domain interactions in the gene-3-protein of the filamentous phage fd. *J. Mol. Biol.* **331**, 1131-1140.
45. Eckert, B., Martin, A., Balbach, J. & Schmid, F. X. (2005). Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 619-23.

46. Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (2000). Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 105-53.
47. Milla, M. E. & Sauer, R. T. (1994). P22 Arc Repressor: folding kinetics of a single-domain, dimeric protein. *Biochemistry* **33**, 1125-1133.
48. Zeeb, M., Lipps, G., Lilie, H. & Balbach, J. (2004). Folding and association of an extremely stable dimeric protein from *Sulfolobus islandicus*. *J. Mol. Biol.* **336**, 227-240.
49. Topping, T. B. & Gloss, L. M. (2004). Stability and folding mechanism of mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic archaeal histones: the importance of folding intermediates. *J Mol Biol* **342**, 247-60.
50. Mok, Y. K., Bycroft, M. & de Prat-Gay, G. (1996). The dimeric DNA binding domain of the human papillomavirus E2 protein folds through a monomeric intermediate which cannot be native-like. *Nat Struct Biol* **3**, 711-7.
51. Najera, H., Costas, M. & Fernandez-Velasco, D. A. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem J* **370**, 785-92.
52. Topping, T. B., Hoch, D. A. & Gloss, L. M. (2004). Folding mechanism of FIS, the intertwined, dimeric factor for inversion stimulation. *J Mol Biol* **335**, 1065-81.
53. Placek, B. J. & Gloss, L. M. (2005). Three-state kinetic folding mechanism of the H2A/H2B histone heterodimer: the N-terminal tails affect the transition state between a dimeric intermediate and the native dimer. *J Mol Biol* **345**, 827-36.
54. Gloss, L. M., Simler, B. R. & Matthews, C. R. (2001). Rough energy landscapes in protein folding: dimeric *E. coli* Trp repressor folds through three parallel channels. *J Mol Biol* **312**, 1121-34.
55. Doyle, S. M., Bilsel, O. & Teschke, C. M. (2004). SecA folding kinetics: a large dimeric protein rapidly forms multiple native states. *J Mol Biol* **341**, 199-214.
56. Mallam, A. L. & Jackson, S. E. (2006). Probing nature's knots: the folding pathway of a knotted homodimeric protein. *J Mol Biol* **359**, 1420-36.
57. Thies, M. J., Mayer, J., Augustine, J. G., Frederick, C. A., Lilie, H. & Buchner, J. (1999). Folding and association of the antibody domain CH3: prolyl isomerization precedes dimerization. *J Mol Biol* **293**, 67-79.
58. Feige, M. J., Hendershot, L. M. & Buchner, J. (2010). How antibodies fold. *Trends Biochem Sci* **35**, 189-98.
59. Dill, K. A. & Chan, H. S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nature Struct. Biology.* **4**, 10-19.
60. Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D. & Wolynes, P. G. (1995). Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Protein-Struct.Funct.Genet.* **21**, 167-195.
61. Dill, K. A. & MacCallum, J. L. (2012). The protein-folding problem, 50 years on. *Science* **338**, 1042-6.
62. Jahn, T. R. & Radford, S. E. (2005). The Yin and Yang of protein folding. *Febs J* **272**, 5962-70.
63. Freddolino, P. L., Harrison, C. B., Liu, Y. & Schulten, K. (2010). Challenges in protein folding simulations: Timescale, representation, and analysis. *Nat Phys* **6**, 751-758.
64. Bowman, G. R., Voelz, V. A. & Pande, V. S. (2011). Taming the complexity of protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 4-11.
65. Schuler, B. & Eaton, W. A. (2008). Protein folding studied by single-molecule FRET. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 16-26.
66. Schuler, B. & Hofmann, H. (2013). Single-molecule spectroscopy of protein folding dynamics--expanding scope and timescales. *Curr Opin Struct Biol* **23**, 36-47.
67. Zoldak, G., Stigler, J., Pelz, B., Li, H. & Rief, M. (2013). Ultrafast folding kinetics and cooperativity of villin headpiece in single-molecule force spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 18156-61.
68. Cao, Y. & Li, H. (2011). Dynamics of protein folding and cofactor binding monitored by single-molecule force spectroscopy. *Biophys J* **101**, 2009-17.

69. Bieri, O., Wirz, J., Hellrung, B., Schutkowski, M., Drewello, M. & Kiefhaber, T. (1999). The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9597-601.
70. Reiner, A. (2011). Triplet-triplet energy transfer studies on conformational dynamics in peptides and a protein. *J Pept Sci* **17**, 413-9.
71. Krieger, F., Fierz, B., Bieri, O., Drewello, M. & Kiefhaber, T. (2003). Dynamics of unfolded polypeptide chains as model for the earliest steps in protein folding. *J Mol Biol* **332**, 265-74.
72. Fierz, B., Reiner, A. & Kiefhaber, T. (2009). Local conformational dynamics in alpha-helices measured by fast triplet transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1057-62.
73. Hardy, J. & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-6.
74. Chiti, F. & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 333-66.
75. Blake, C. & Serpell, L. (1996). Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. *Structure* **4**, 989-98.
76. Eisenberg, D. & Jucker, M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* **148**, 1188-203.
77. Knowles, T. P., Fitzpatrick, A. W., Meehan, S., Mott, H. R., Vendruscolo, M., Dobson, C. M. & Welland, M. E. (2007). Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. *Science* **318**, 1900-3.
78. Baldwin, A. J., Knowles, T. P., Tartaglia, G. G., Fitzpatrick, A. W., Devlin, G. L., Shammass, S. L., Waudby, C. A., Mossuto, M. F., Meehan, S., Gras, S. L., Christodoulou, J., Anthony-Cahill, S. J., Barker, P. D., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. (2011). Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J Am Chem Soc* **133**, 14160-3.
79. Clark, P. L. (2004). Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel. *Trends Biochem Sci* **29**, 527-34.
80. Ramirez-Alvarado, M., Merkel, J. S. & Regan, L. (2000). A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8979-84.
81. Coyle, J. E., Texter, F. L., Ashcroft, A. E., Masselos, D., Robinson, C. V. & Radford, S. E. (1999). GroEL accelerates the refolding of hen lysozyme without changing its folding mechanism. *Nat Struct Biol* **6**, 683-90.
82. Walter, S. & Buchner, J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 1098-113.
83. Ramachandran, G. N. & Mitra, A. K. (1976). An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides. *Journal of Molecular Biology*, 85-92.
84. Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**, 4953-4963.
85. Stewart, D. E., Sarkar, A. & Wampler, J. E. (1990). Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *J. Mol. Biol.* **214**, 253-260.
86. Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1998). Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation. *J. Mol. Biol.* **279**, 449-460.
87. Garel, J.-R. & Baldwin, R. L. (1973). Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **70**, 3347-3351.
88. Schmid, F. X., Grafl, R., Wrba, A. & Beintema, J. J. (1986). Role of proline peptide bond isomerization in unfolding and refolding of ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 872-876.
89. Schmid, F. X. (1992). Kinetics of unfolding and refolding of single-domain proteins. In *Protein folding* 1 edit. (Creighton, T. E., ed.), pp. 197-241. Freeman, New York.

90. Pappenberger, G., Bachmann, A., Muller, R., Aygun, H., Engels, J. W. & Kiefhaber, T. (2003). Kinetic mechanism and catalysis of a native-state prolyl isomerization reaction. *J Mol Biol* **326**, 235-246.
91. Fischer, G., Bang, H. & Mech, C. (1984). Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomed.Biochim.Acta* **43**, 1101-1111.
92. Fanghanel, J. & Fischer, G. (2004). Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front Biosci* **9**, 3453-78.
93. Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G., Cantley, L. C. & Lu, K. P. (1997). Sequence-Specific and Phosphorylation-Dependent Proline Isomerization: A Potential Mitotic Regulatory Mechanism. *Science* **278**, 1957-1960.
94. Fischer, G., Bang, H., Ludwig, B., Mann, K. & Hacker, J. (1992). Mip Protein of Legionella-Pneumophila Exhibits Peptidyl- Prolyl- cis/ trans Isomerase (PPlase) Activity. *Mol.Microbiol.* **6**, 1375-1383.
95. Kieffer, L. J., Thalhammer, T. & Handschumacher, R. E. (1992). Isolation and Characterization of a 40-kDa Cyclophilin- Related Protein. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 5503-5507.
96. Jackson, S. E. & Fersht, A. R. (1991). Folding of Chymotrypsin Inhibitor-2 .2. Influence of Proline Isomerization on the Folding Kinetics and Thermodynamic Characterization of the Transition State of Folding. *Biochemistry* **30**, 10436-10443.
97. Freskgard, P. O., Bergenhem, N., Jonsson, B. H., Svensson, M. & Carlsson, U. (1992). Isomerase and Chaperone Activity of Prolyl Isomerase in the Folding of Carbonic Anhydrase. *Science* **258**, 466-468.
98. Veeraraghavan, S., Rodriguez-Gdiharpour, S., MacKinnon, C., Mcgee, W. A., Pierce, M. M. & Nall, B. T. (1995). Prolyl isomerase as a probe of stability of slow-folding intermediates. *Biochemistry* **34**, 12892-12902.
99. Scholz, C., Zarnt, T., Kern, G., Lang, K., Burtscher, H., Fischer, G. & Schmid, F. X. (1996). Autocatalytic folding of the folding catalyst FKBP12. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 12703-12707.
100. Hacke, M., Gruber, T., Schulenburg, C., Balbach, J. & Arnold, U. (2013). Consequences of proline-to-alanine substitutions for the stability and refolding of onconase. *Febs J* **280**, 4454-62.
101. Muller, C., Richter, S. & Rinas, U. (2003). Kinetics control preferential heterodimer formation of platelet-derived growth factor from unfolded A- and B-chains. *J Biol Chem* **278**, 18330-5.
102. Farge, E., Ojcius, D. M., Subtil, A. & Dautry-Varsat, A. (1999). Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells. *Am J Physiol* **276**, C725-33.
103. Kooijman, E. E., Chupin, V., Fuller, N. L., Kozlov, M. M., de Kruijff, B., Burger, K. N. & Rand, P. R. (2005). Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* **44**, 2097-102.
104. Brown, W. J., Chambers, K. & Doody, A. (2003). Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* **4**, 214-21.
105. Sheetz, M. P. (2001). Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 392-6.
106. Raucher, D. & Sheetz, M. P. (2000). Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol* **148**, 127-36.
107. Bettache, N., Baisamy, L., Baghdiguian, S., Payrastra, B., Mangeat, P. & Bienvenue, A. (2003). Mechanical constraint imposed on plasma membrane through transverse phospholipid imbalance induces reversible actin polymerization via phosphoinositide 3-kinase activation. *J Cell Sci* **116**, 2277-84.
108. Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J Mol Biol* **346**, 967-89.

109. Boudin, H., Doan, A., Xia, J., Shigemoto, R., Haganir, R. L., Worley, P. & Craig, A. M. (2000). Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* **28**, 485-97.
110. Hinshaw, J. E. & Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-2.
111. Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R. & McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495-9.
112. Richnau, N., Fransson, A., Farsad, K. & Aspenstrom, P. (2004). RICH-1 has a BIN/Amphiphysin/Rvsp domain responsible for binding to membrane lipids and tubulation of liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1034-42.
113. Suetsugu, S., Toyooka, K. & Senju, Y. (2010). Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 340-9.
114. Qualmann, B., Koch, D. & Kessels, M. M. (2011). Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *Embo J* **30**, 3501-15.
115. Masuda, M. & Mochizuki, N. (2010). Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 391-8.
116. Pykalainen, A., Boczkowska, M., Zhao, H., Saarikangas, J., Rebowski, G., Jansen, M., Hakanen, J., Koskela, E. V., Peranen, J., Vihinen, H., Jokitalo, E., Salminen, M., Ikonen, E., Dominguez, R. & Lappalainen, P. (2010). Pinkbar is an epithelial-specific BAR domain protein that generates planar membrane structures. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 902-7.
117. Gallop, J. L. & McMahon, H. T. (2005). BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem. Soc. Symp.*, 223-31.
118. Dawson, J. C., Legg, J. A. & Machesky, L. M. (2006). Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol.* **16**, 493-8.
119. Gallop, J. L., Jao, C. C., Kent, H. M., Butler, P. J., Evans, P. R., Langen, R. & McMahon, H. T. (2006). Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J.* **25**, 2898-910.
120. Mim, C. & Unger, V. M. (2012). Membrane curvature and its generation by BAR proteins. *Trends Biochem Sci* **37**, 526-33.
121. Millard, T. H., Bompard, G., Heung, M. Y., Dafforn, T. R., Scott, D. J., Machesky, L. M. & Futterer, K. (2005). Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *Embo J* **24**, 240-50.
122. Lee, S. H., Kerff, F., Chereau, D., Ferron, F., Klug, A. & Dominguez, R. (2007). Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis. *Structure* **15**, 145-55.
123. Chen, Y., Aardema, J., Misra, A. & Corey, S. J. (2012). BAR proteins in cancer and blood disorders. *Int J Biochem Mol Biol* **3**, 198-208.
124. Henne, W. M., Kent, H. M., Ford, M. G., Hegde, B. G., Daumke, O., Butler, P. J., Mittal, R., Langen, R., Evans, P. R. & McMahon, H. T. (2007). Structure and analysis of FCHO2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature. *Structure* **15**, 839-52.
125. Weissenhorn, W. (2005). Crystal structure of the endophilin-A1 BAR domain. *J Mol Biol* **351**, 653-61.
126. Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E. H., De Camilli, P. & Unger, V. M. (2008). Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell* **132**, 807-17.
127. Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L., Liu, Z. J., Wang, B. C., Yamamoto, M., Terada, T., Miyazawa, A., Tanaka, A., Sugano, S., Shirouzu, M., Nagayama, K., Takenawa, T. & Yokoyama, S. (2007). Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell* **129**, 761-72.

128. Bhatia, V. K., Madsen, K. L., Bolinger, P. Y., Kunding, A., Hedegard, P., Gether, U. & Stamou, D. (2009). Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing. *Embo J* **28**, 3303-14.
129. Jao, C. C., Hegde, B. G., Gallop, J. L., Hegde, P. B., McMahon, H. T., Haworth, I. S. & Langen, R. (2010). Roles of amphipathic helices and the bin/amphiphysin/rvs (BAR) domain of endophilin in membrane curvature generation. *J Biol Chem* **285**, 20164-70.
130. Löw, C., Weininger, U., Lee, H., Schweimer, K., Neundorff, I., Beck-Sickingler, A. G., Pastor, R. W. & Balbach, J. (2008). Structure and dynamics of helix-0 of the N-BAR domain in lipid micelles and bilayers. *Biophys J* **95**, 4315-23.
131. Wang, Q., Navarro, M. V., Peng, G., Molinelli, E., Goh, S. L., Judson, B. L., Rajashankar, K. R. & Sondermann, H. (2009). Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12700-5.
132. Mim, C., Cui, H., Gawronski-Salerno, J. A., Frost, A., Lyman, E., Voth, G. A. & Unger, V. M. (2012). Structural basis of membrane bending by the N-BAR protein endophilin. *Cell* **149**, 137-45.
133. Roberts-Galbraith, R. H., Ohi, M. D., Ballif, B. A., Chen, J. S., McLeod, I., McDonald, W. H., Gygi, S. P., Yates, J. R., 3rd & Gould, K. L. (2010). Dephosphorylation of F-BAR protein Cdc15 modulates its conformation and stimulates its scaffolding activity at the cell division site. *Mol Cell* **39**, 86-99.
134. Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P. A., Rittinger, K., Gamblin, S. J. & Smerdon, S. J. (2001). The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* **411**, 215-9.
135. Zhu, G., Chen, J., Liu, J., Brunzelle, J. S., Huang, B., Wakeham, N., Terzyan, S., Li, X., Rao, Z., Li, G. & Zhang, X. C. (2007). Structure of the APPL1 BAR-PH domain and characterization of its interaction with Rab5. *Embo J* **26**, 3484-93.
136. Farsad, K., Slepnev, V., Ochoa, G., Daniell, L., Haucke, V. & De Camilli, P. (2003). A putative role for intramolecular regulatory mechanisms in the adaptor function of amphiphysin in endocytosis. *Neuropharmacology* **45**, 787-96.
137. Eberth, A., Lundmark, R., Gremer, L., Dvorsky, R., Koessmeier, K. T., McMahon, H. T. & Ahmadian, M. R. (2009). A BAR domain-mediated autoinhibitory mechanism for RhoGAPs of the GRAF family. *Biochem J* **417**, 371-7.
138. Rao, Y., Ma, Q., Vahedi-Faridi, A., Sundborger, A., Pechstein, A., Puchkov, D., Luo, L., Shupliakov, O., Saenger, W. & Haucke, V. (2010). Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8213-8.
139. Vazquez, F. X., Unger, V. M. & Voth, G. A. (2013). Autoinhibition of endophilin in solution via interdomain interactions. *Biophys J* **104**, 396-403.
140. Casal, E., Federici, L., Zhang, W., Fernandez-Recio, J., Priego, E. M., Miguel, R. N., DuHadaway, J. B., Prendergast, G. C., Luisi, B. F. & Laue, E. D. (2006). The crystal structure of the BAR domain from human Bin1/amphiphysin II and its implications for molecular recognition. *Biochemistry* **45**, 12917-28.
141. Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki, T., Mori, H., Kamioka, Y. & Mochizuki, N. (2006). Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J* **25**, 2889-97.
142. Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O. A., Ochoa, G. C., Farsad, K., Wenk, M. R. & De Camilli, P. (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* **297**, 1193-6.
143. Nicot, A. S., Toussaint, A., Tosch, V., Kretz, C., Wallgren-Pettersson, C., Iwarsson, E., Kingston, H., Garnier, J. M., Biancalana, V., Oldfors, A., Mandel, J. L. & Laporte, J. (2007). Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* **39**, 1134-9.
144. Wu, T., Shi, Z. & Baumgart, T. (2014). Mutations in BIN1 associated with centronuclear myopathy disrupt membrane remodeling by affecting protein density and oligomerization. *PLoS One* **9**, e93060.

145. Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4645-9.
146. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorf, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology* **185**, 60-89.
147. Bosse-Doenecke, E., Weininger, U., Gopalswamy, M., Balbach, J., Möller Knudsen, S. & Rudolph, R. (2008). High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors. *Protein Expr. Purif.* **58**, 114-121.
148. Cohen, S., Chang, A. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **69**, 2110-2114.
149. Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379.
150. Eftink, M. R. (1997). Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions. *Methods Enzymol* **278**, 221-257.
151. Stark, G. R. (1965). Reactions of cyanate with functional groups of proteins. III Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry* **4**, 1030-1036.
152. Warren, J. R. & Gordon, J. A. (1966). On Refractive Indices of Aqueous Solutions of Urea. *Journal of Physical Chemistry* **70**, 297-&.
153. Tanford, C. (1968). Protein denaturation, part A. *Advances in Protein Chemistry* **23**, 121-217.
154. Grant, S. K., Deckman, I. C., Culp, J. S., Minnich, M. D., Brooks, I. S., Hensley, P., Debouck, C. & Meek, T. D. (1992). Use of protein unfolding studies to determine the conformational and dimeric stabilities of HIV-1 and SIV proteases. *Biochemistry* **31**, 9491-9501.
155. Schmid, F. X. (1983). Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates. *Biochemistry* **22**, 4690-4696.
156. Schmid, F. X. (1986). Fast-folding and slow-folding forms of unfolded proteins. *Methods Enzymol* **131**, 70-82.
157. Adamson, A. W. (1990). *Physical Chemistry of Surfaces*, 5. Ausgabe, John Wiley and Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
158. Mäler, L. & Graslund, A. (2009). Artificial membrane models for the study of macromolecular delivery. *Methods Mol Biol* **480**, 129-39.
159. Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M. O. & van Zijl, P. C. (1995). Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation. *J. Magn. Reson. B* **108**, 94-98.
160. Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661-665.
161. Ikura, M., Kay, L. E. & Bax, A. (1990). A Novel-Approach for Sequential Assignment of H-1, C-13, and N-15 Spectra of Larger Proteins - Heteronuclear Triple-Resonance 3-Dimensional Nmr-Spectroscopy - Application to Calmodulin. *Biochemistry* **29**, 4659-4667.
162. Sattler, M., Schleucher, J. & Griesinger, C. (1999). Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog. NMR Spectrosc.* **34**, 93-158.
163. Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R. & Bax, A. (1990). 3-Dimensional Triple-Resonance Nmr-Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins. *Journal of Magnetic Resonance* **89**, 496-514.
164. Grzesiek, S., Stahl, S. J., Wingfield, P. T. & Bax, A. (1996). The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* **35**, 10256-61.
165. Fielding, L. (2007). NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **51**, 219-242.

166. Kay, L. E., Torchia, D. A. & Bax, A. (1989). Backbone dynamics of proteins as studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **28**, 8972-8979.
167. Dayie, K. & Wagner, G. (1994). Relaxation-rate measurements for ¹⁵N-¹H groups with pulsed-field gradients and preservation of coherence pathways. *J. Magn. Reson. A* **111**, 121-126.
168. Mukaiyama, A., Nakamura, T., Makabe, K., Maki, K., Goto, Y. & Kuwajima, K. (2013). Native-state heterogeneity of beta(2)-microglobulin as revealed by kinetic folding and real-time NMR experiments. *J Mol Biol* **425**, 257-72.
169. Rumfeldt, J. A., Galvagnion, C., Vassall, K. A. & Meiering, E. M. (2008). Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **98**, 61-84.
170. Khorasanizadeh, S., Peters, I. D., Butt, T. R. & Roder, H. (1993). Folding and stability of a tryptophan-containing mutant of ubiquitin. *Biochemistry* **32**, 7054-7063.
171. Guijarro, J. I., Morton, C. J., Plaxco, K. W., Campbell, I. D. & Dobson, C. M. (1998). Folding kinetics of the SH3 domain of PI3 kinase by real-time NMR combined with optical spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **276**, 657-667.
172. Vold, R. R., Prosser, R. S. & Deese, A. J. (1997). Isotropic solutions of phospholipid bicelles: a new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides. *J Biomol NMR* **9**, 329-35.
173. Prosser, R. S., Evanics, F., Kitevski, J. L. & Al-Abdul-Wahid, M. S. (2006). Current applications of bicelles in NMR studies of membrane-associated amphiphiles and proteins. *Biochemistry* **45**, 8453-65.
174. Garidel, P., Johann, C. & Blume, A. (1997). Nonideal mixing and phase separation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid mixtures as a function of acyl chain length and pH. *Biophys J* **72**, 2196-210.
175. Garidel, P. & Blume, A. (2000). Calcium induced nonideal mixing in liquid-crystalline phosphatidylcholine-phosphatidic acid bilayer membranes. *Langmuir* **16**, 1662-1667.
176. Blood, P. D. & Voth, G. A. (2006). Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 15068-72.
177. Bhatia, V. K., Hatzakis, N. S. & Stamou, D. (2010). A unifying mechanism accounts for sensing of membrane curvature by BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 381-90.
178. Mizuno, N., Jao, C. C., Langen, R. & Steven, A. C. (2010). Multiple modes of endophilin-mediated conversion of lipid vesicles into coated tubes: implications for synaptic endocytosis. *J Biol Chem* **285**, 23351-8.
179. Arkhipov, A., Yin, Y. & Schulten, K. (2009). Membrane-bending mechanism of amphiphysin N-BAR domains. *Biophys J* **97**, 2727-35.
180. Kooijman, E. E., King, K. E., Gangoda, M. & Gericke, A. (2009). Ionization properties of phosphatidylinositol polyphosphates in mixed model membranes. *Biochemistry* **48**, 9360-71.
181. Janmey, P. A. & Kinnunen, P. K. (2006). Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol* **16**, 538-46.
182. Kojima, C., Hashimoto, A., Yabuta, I., Hirose, M., Hashimoto, S., Kanaho, Y., Sumimoto, H., Ikegami, T. & Sabe, H. (2004). Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *Embo J* **23**, 4413-22.
183. Alexandropoulos, K., Cheng, G. H. & Baltimore, D. (1995). Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**, 3110-3114.
184. Mosimann, S. C., Ardelt, W. & James, M. N. (1994). Refined 1.7 Å X-ray crystallographic structure of P-30 protein, an amphibian ribonuclease with anti-tumor activity. *J Mol Biol* **236**, 1141-53.
185. Lee, J. E., Bae, E., Bingman, C. A., Phillips, G. N., Jr. & Raines, R. T. (2008). Structural basis for catalysis by onconase. *J Mol Biol* **375**, 165-77.

186. Arnold, U., Schulenburg, C., Schmidt, D. & Ulbrich-Hofmann, R. (2006). Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics. *Biochemistry* **45**, 3580-7.
187. Pappenberger, G., Aygun, H., Engels, J. W., Reimer, U., Fischer, G. & Kiefhaber, T. (2001). Nonprolyl cis peptide bonds in unfolded proteins cause complex folding kinetics. *Nat Struct Biol* **8**, 452-8.
188. Virnau, P., Mallam, A. & Jackson, S. (2011). Structures and folding pathways of topologically knotted proteins. *J Phys Condens Matter* **23**, 033101.

8 Anhang

8.1 Abbildungen

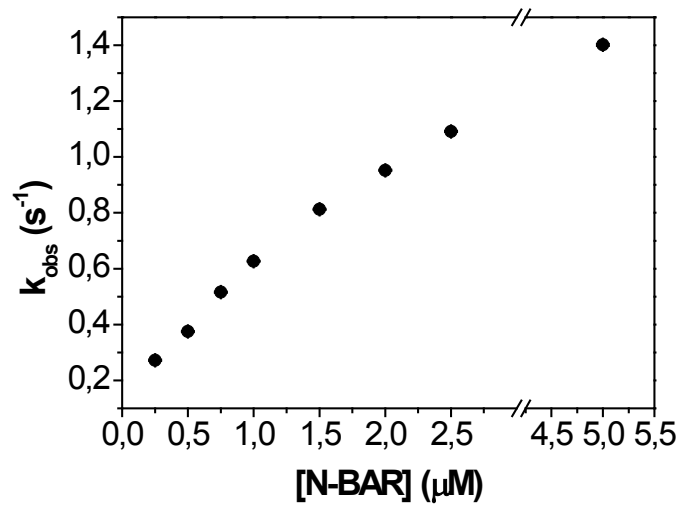


Abb. 8-1 Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstante von λ_2 als Funktion der Proteinkonzentration.

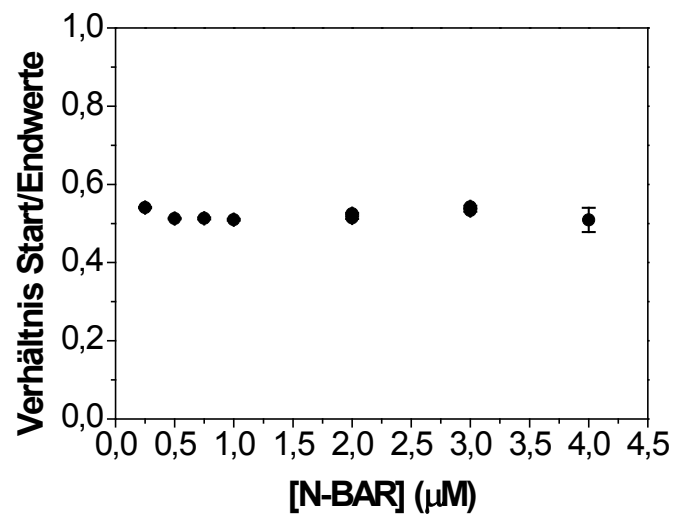


Abb. 8-2 Auftragung des Verhältnisses der Start- und Endwerte der fern-UV-CD-Kinetiken als Funktion der Proteinkonzentration.

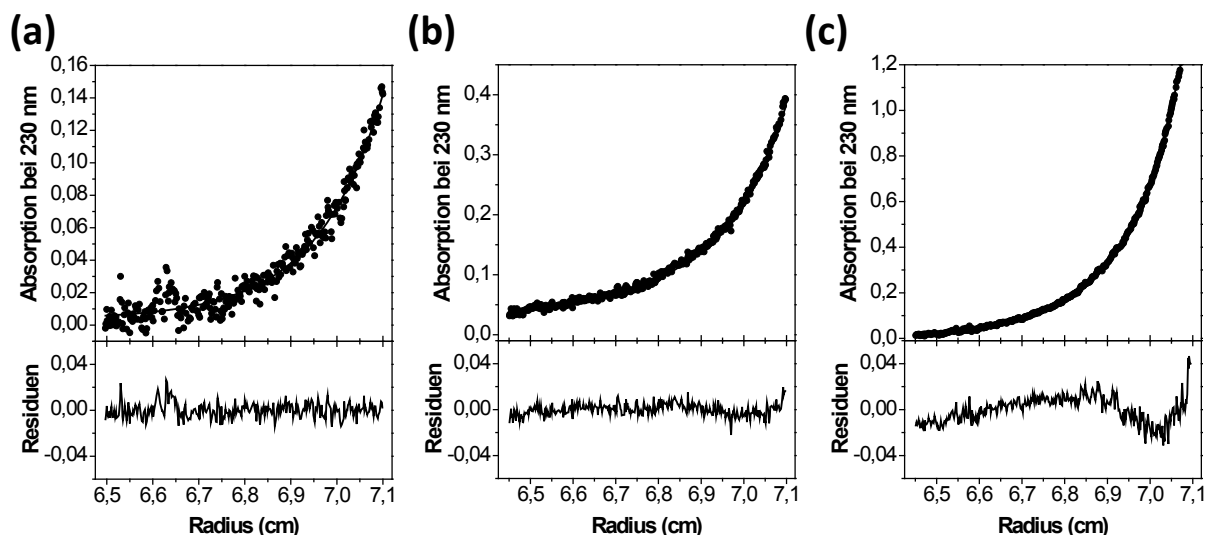


Abb. 8-3 Gleichgewichtsläufe einer analytischen Ultrazentrifugation von drei verschiedenen Konzentrationen von N-BAR P95S zur Bestimmung des Molekulargewichtes.

Die obere Kurve zeigt die gemessene Absorption bei 230 nm in Abhängigkeit des Abstandes zum Rotorzentrum, die untere Kurve entspricht der Anpassung an die Messdaten. Es wurde bei drei verschiedenen Konzentrationen von N-BAR P95S gemessen: (a) 0,5 μM , (b) 1,0 μM und (c) 2,5 μM . Das erhaltene Molekulargewicht beträgt im Durchschnitt aus allen drei Messungen $56,1 \pm 5,7$ kDa. Das theoretisch zu erwartende Molekulargewicht beträgt 57,4 kDa.

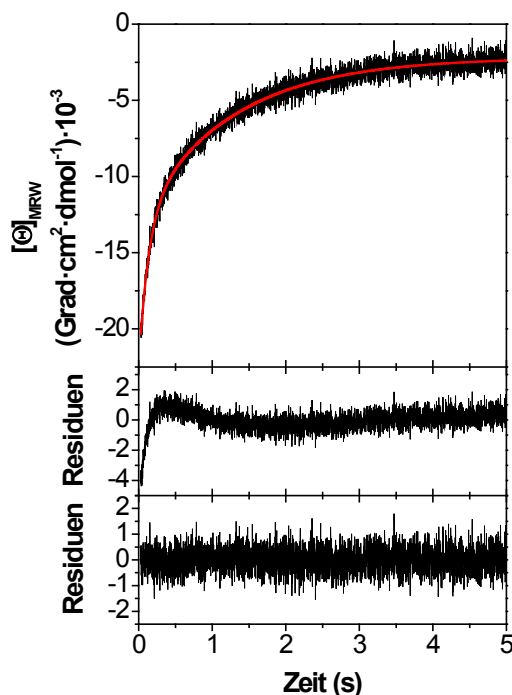


Abb. 8-4 Nach Doppelsprungexperiment detektierte Entfaltungskinetik nach 10s Rückfaltungszeit

Dargestellt ist die über fern-UV CD-Spektroskopie detektierte Entfaltungskinetik nach einer Rückfaltungszeit von 10 s. Die rote Linie zeigt die Anpassung mit einer zweifachen exponentiellen Reaktion 1. Ordnung. Die darunter dargestellten Residuen zeigen die Abweichung der Anpassung mit einer einfachen exponentiellen Reaktion 1. Ordnung (obere Residuen) und mit einer zweifachen exponentiellen Reaktion 1. Ordnung (untere Residuen) zu den experimentellen Daten.

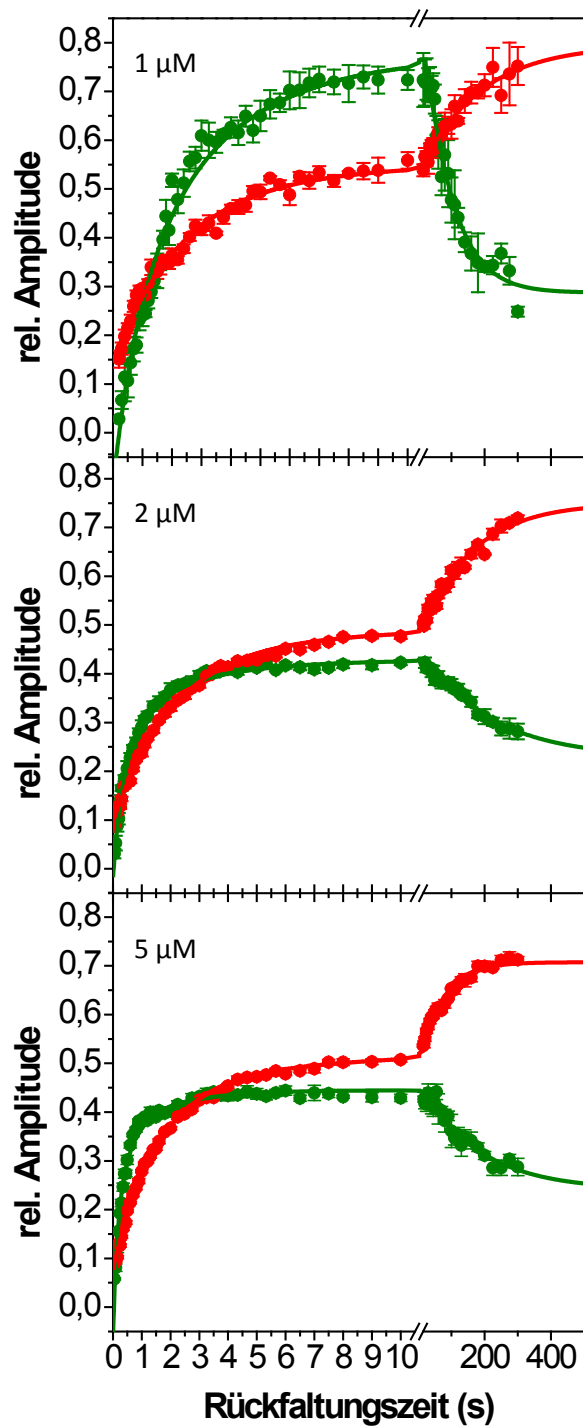


Abb.8-5: Relativer Amplitudenverlauf der Entfaltungsphasen als Funktion der Rückfaltungszeit (N-Test) detektiert mit totaler Fluoreszenz und bei verschiedenen Proteinkonzentrationen.

Dargestellt sind die relativen Amplituden der beiden Entfaltungsreaktionen als Funktion der Rückfaltungszeit. Die grünen Symbole zeigen die Amplituden der schnellen Entfaltungsreaktion (λ_5), die roten Symbole die der langsamen Entfaltungsreaktion (λ_6). Die Linien entsprechen der jeweiligen Anpassung: die grüne Linie ist die Summe einer Reaktion 2. Ordnung und einer einfachen exponentiellen Reaktion 1. Ordnung und die rote Linie entspricht der Summe aus einer zweifach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung. Die Konzentrationsangaben entsprechen der Proteinkonzentration während der Rückfaltung.

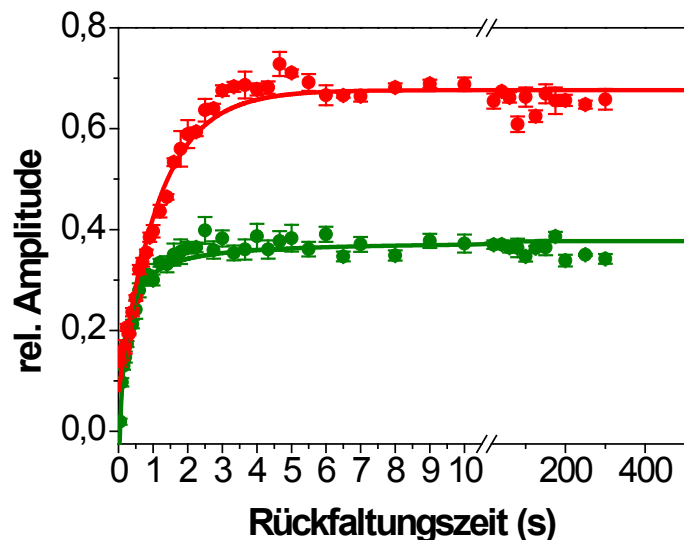


Abb. 8-6: Über Dreifachsprungexperimente detektierte relative Amplituden der Entfaltung als Funktion der Rückfaltungszeit.

Die relativen Amplituden der Entfaltungsreaktionen sind als Funktion der Rückfaltungszeit dargestellt. Die grünen Symbole entsprechen den Amplituden der schnellen Entfaltungsreaktion (λ_5), die roten Symbole denen der langsamen Entfaltungsreaktion (λ_6). Die grüne Linie entspricht der Anpassung mit einer Reaktion 2. Ordnung und die rote Linie der Anpassung mit einer einfachen Reaktion 1. Ordnung.

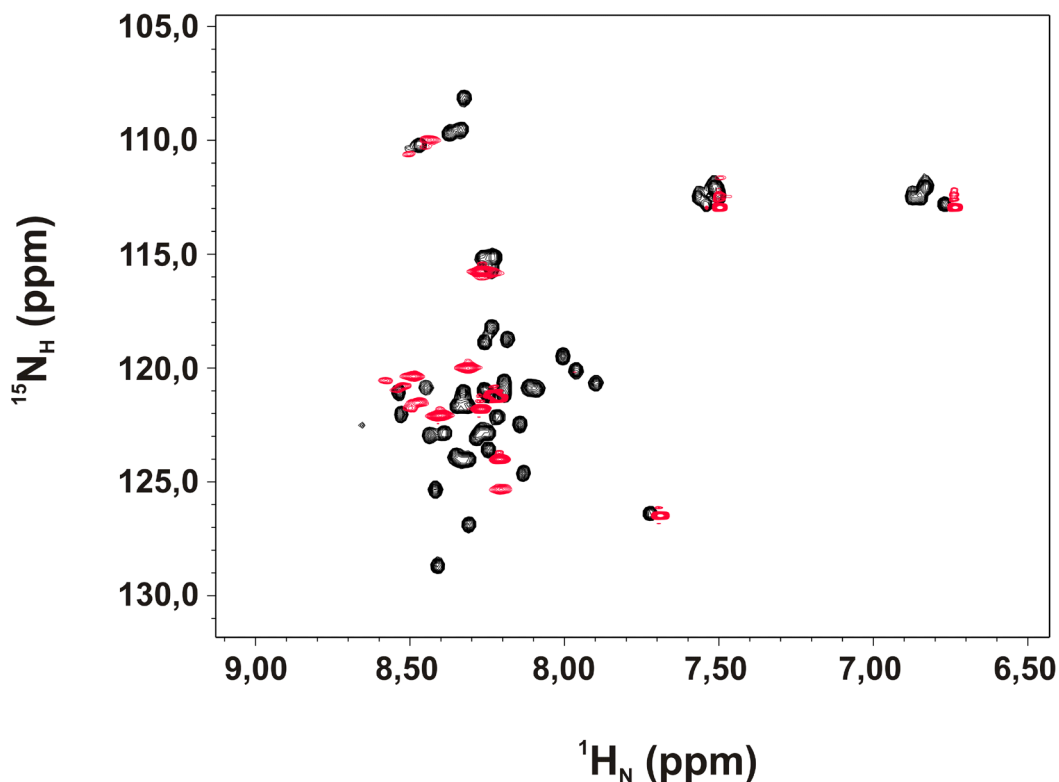


Abb. 8-7 ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des BAR-Peptides (AS 1-44) im ungebundenen Zustand und gebunden an DMPG-Liposomen.

Das HSQC-Spektrum im DMPG gebundenen Zustand zeigt etwa 19 Kreuzsignale und liegt damit deutlich unterhalb der zu erwartenden Signale. Die detektierten Signale stammen mit großer Wahrscheinlichkeit von den nicht gebundenen Aminosäureresten. Dies ist auf das schnelle Relaxationsverhalten der gebundenen Aminosäuren zurückzuführen.

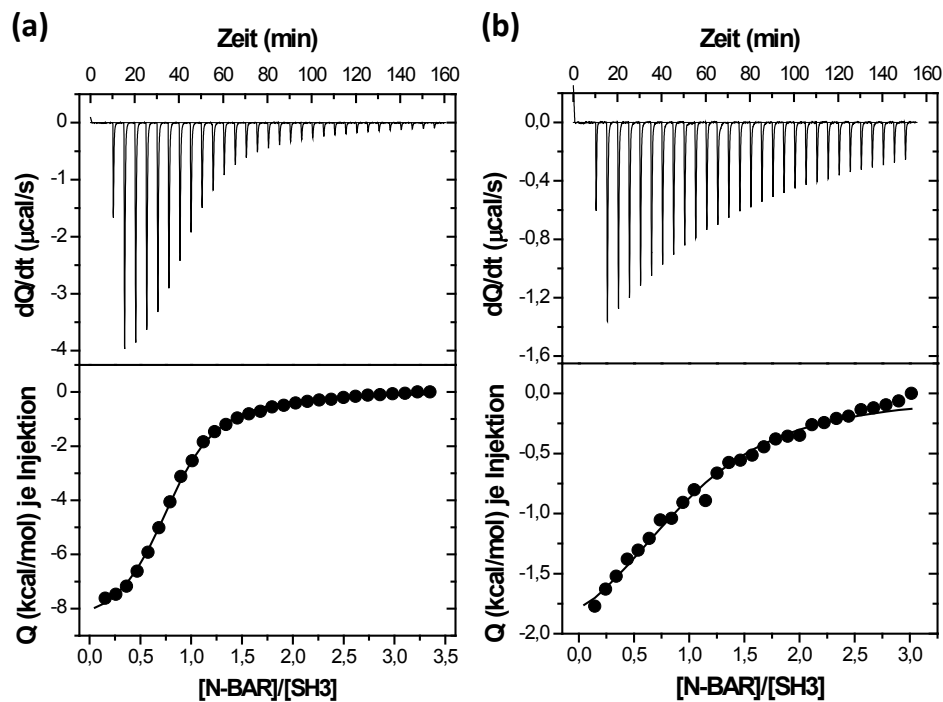


Abb. 8-8 Isothermale Titrationskurve von N-BAR(1-286) mit der SH3-Domäne bei verschiedenen Konzentrationen an Natriumchlorid.

Die obere Kurve zeigt die elektrische Leistung des Gerätes an, welches zur Konstanthaltung der Temperatur in der Messzelle im Vergleich zur Referenzzelle während der Titration benötigt wird. Der untere Graph zeigt die integrierten Wärmemengen aus der Leistungskurve gegenüber dem Verhältnis von N-BAR(1-286) und der SH3-Domäne. Gezeigt ist in (a) die Messung bei 50 mM Natriumchlorid und in (b) bei 300 mM Natriumchlorid.

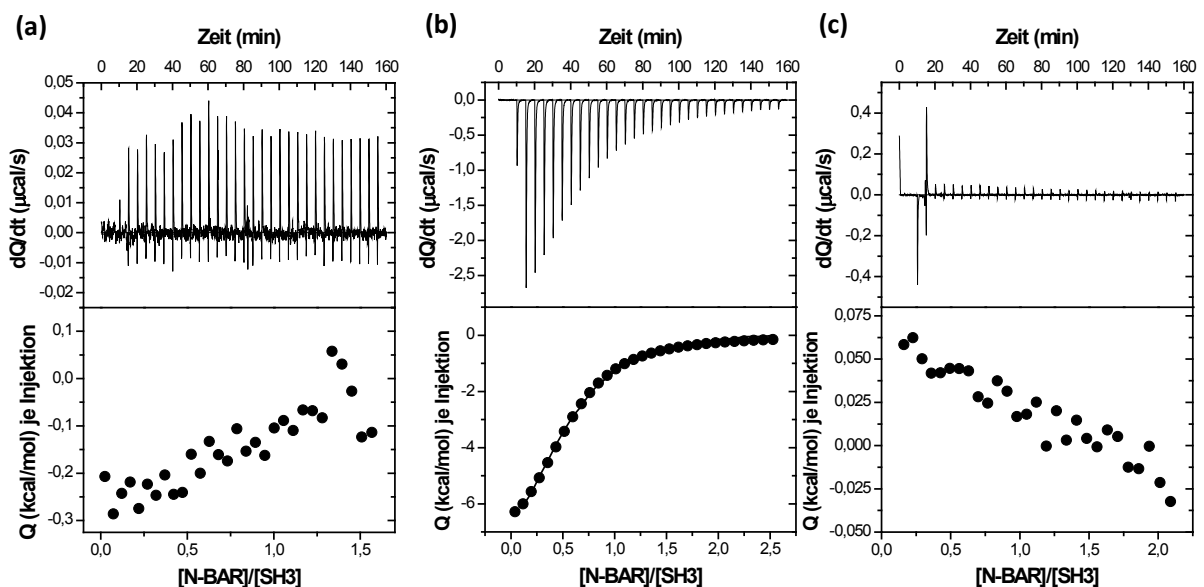


Abb. 8-9 Isothermale Titrationskurve von verschiedenen N-BAR-Konstrukten mit der SH3-Domäne.

Gezeigt sind die jeweiligen ITC-Messungen von (a) N-BAR(1-254), (b) N-BAR(1-269) und (c) N-BAR(1-286) Δ Exon10 mit der SH3-Domäne. Die obere Kurve gibt die elektrische Leistung des Gerätes wieder, aus denen die integrierten Wärmemengen des unteren Graphen ermittelt wurden und diese gegen das Verhältnis von N-BAR und SH3-Domäne aufgetragen wurden.

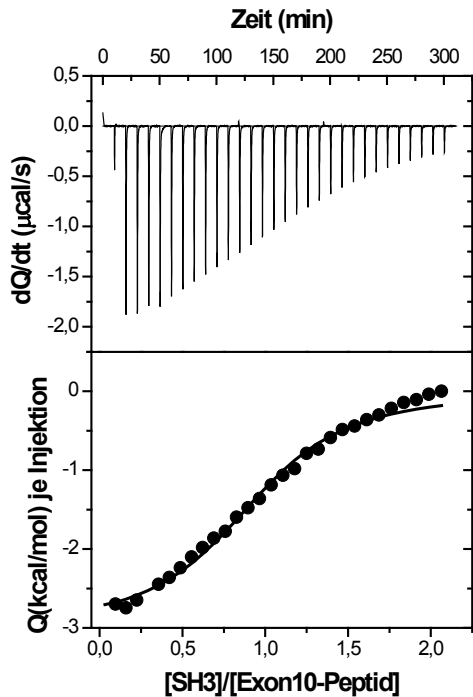


Abb. 8-10 Isothermale Titrationskurve der SH3-Domäne mit dem Exon10-Peptid.

Die obere Kurve zeigt die elektrische Leistung des Gerätes an. Der untere Graph zeigt die integrierten Wärmemengen aus der Leistungskurve gegenüber dem Verhältnis der SH3-Domäne zum Exon10-Peptid.

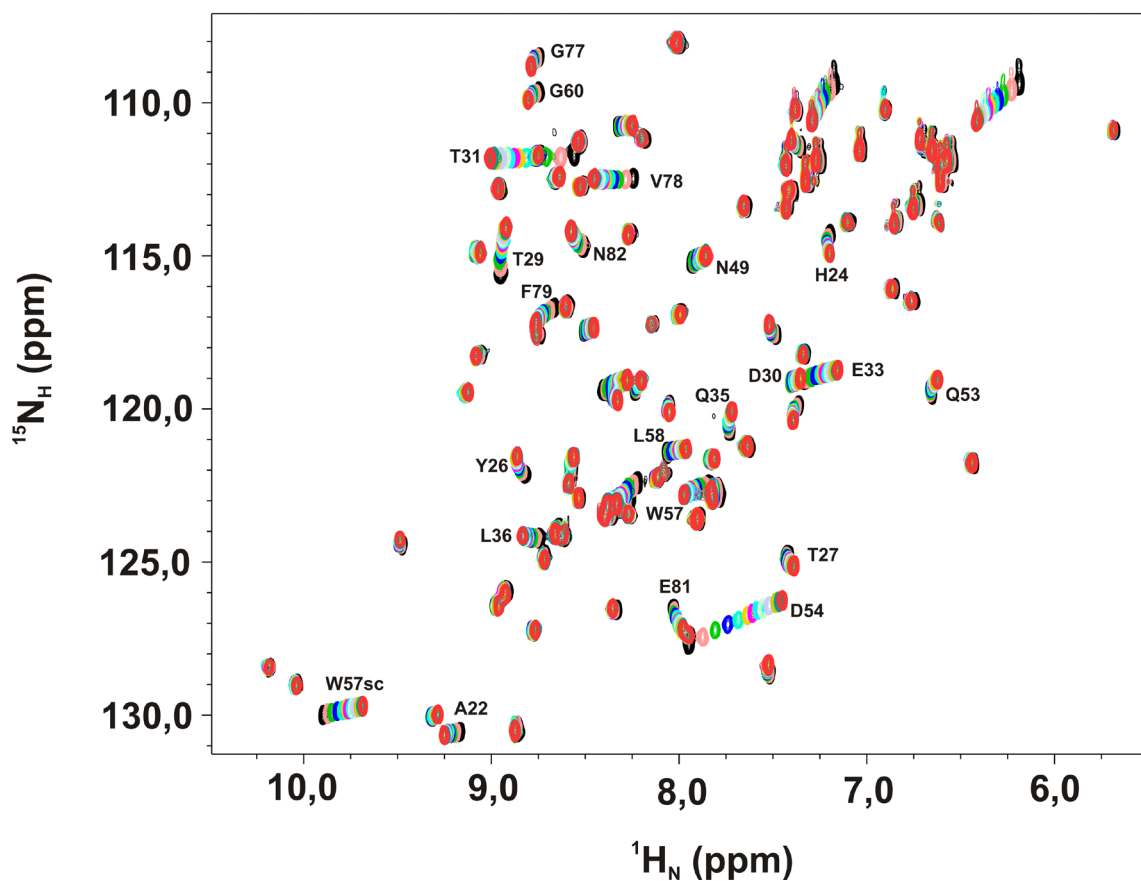


Abb.8-11 NMR-Titration der SH3-Domäne mit dem Exon10-Peptid.

Gezeigt sind die HSQC-Spektren von der ^{15}N -markierten SH3-Domäne zu verschiedenen Zeitpunkten der Titration. Die beschrifteten Kreuzsignale entsprechen den Aminosäuren, welche eine signifikante Änderung erfahren. Die Richtung der Veränderung der chemischen Verschiebung geht von schwarz (0 mM Exon10-Peptid) bis rot (400 mM Exon10-Peptid).

8.2 Tabellen

Tab. 8-1 Zuordnung (^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$) des BAR-Peptides in 10 mM Natriumphosphat, pH 6,0 bei 25°C.

Aminosäure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$	$^{13}\text{C}^\beta$
1 M	n.a.	n.a.	52,596	28,114
2 A	8,181	124,964	50,934	16,339
3 E	8,0155	119,504	54,046	26,987
4 M	8,126	123,594	53,080	30,558
5 G	8,317	110,969	42,755	
6 S	8,082	116,415	55,848	61,408
7 K	8,240	123,636	54,054	30,379
8 G	8,176	110,260	42,755	
9 V	7,849	120,243	60,153	30,379
10 T	8,087	119,071	59,435	67,327
11 A	8,162	127,643	50,283	16,745
12 G	8,170	108,898	42,755	
13 K	7,958	121,583	54,054	30,738
14 I	7,992	123,316	58,718	36,298
15 A	8,258	129,409	50,109	16,927
16 S	8,118	115,943	56,027	61,408
17 N	8,292	121,632	51,005	36,118
18 V	7,807	120,922	60,166	30,208
19 Q	8,201	124,700	53,885	26,859
20 K	8,061	122,919	53,577	26,966
21 K	8,190	122,405	53,875	30,558
22 L	8,091	123,592	52,799	42,243
23 T	8,077	115,901	59,076	67,686
24 R	8,292	123,727	54,368	27,953
25 A	8,185	124,751	49,929	16,568
26 Q	8,382	121,853	54,046	27,631
27 E	8,382	122,849	53,337	27,868
28 K	8,036	121,921	54,690	30,369
29 V	7,733	121,435	60,691	30,208
30 L	7,964	125,355	53,158	39,706
31 Q	8,038	121,402	54,054	27,689
32 K	8,319	123,911	53,855	30,558
33 L	8,162	124,810	53,158	40,244
34 G	8,215	110,420	42,575	
35 K	7,931	121,651	53,516	30,917
36 A	8,261	126,089	50,288	16,568
37 D	8,102	119,593	51,902	38,629
38 E	8,101	121,690	53,696	27,686

39	T	8,063	115,915	59,794	67,327
40	K	8,089	124,349	54,054	30,738
41	D	8,153	122,372	51,723	38,629
42	E	8,171	121,853	54,054	27,867
43	Q	8,090	121,934	53,337	27,150
44	Y	7,569	127,122	56,623	36,973

Tab. 8-2 Zuordnung (^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$) des BAR-Peptides gebunden an DMPG/DHPC Bicellen in 10 mM Natriumphosphat, pH 6,0 bei 25°C.

Aminosäure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$
1 M	n.a.	n.a.	52,2548
2 A	8,589	127,222	49,7198
3 E	8,397	120,749	53,7948
4 M	8,433	122,863	53,0698
5 G	8,368	110,315	42,7468
6 S	8,195	116,412	56,1488
7 K	8,316	123,009	54,3378
8 G	8,261	109,413	43,0188
9 V	7,940	121,083	61,1698
10 T	7,829	117,443	60,4958
11 A	8,627	124,922	52,0738
12 G	8,304	105,953	43,8298
13 K	7,908	123,139	56,0588
14 I	8,043	120,709	62,0348
15 A	8,468	122,532	52,7988
16 S	8,099	113,014	58,6938
17 N	7,984	121,264	53,6138
18 V	8,388	120,274	64,2578
19 Q	8,344	120,195	53,6838
20 K	7,936	119,699	57,0308
21 K	7,710	119,501	56,2398
22 L	8,323	119,882	53,7948
23 T	8,184	116,265	64,0158
24 R	7,746	122,179	56,0588
25 A	7,989	122,212	52,4368
26 Q	8,214	117,853	56,8738
27 E	7,966	118,882	56,6928
28 K	7,879	119,100	56,0588
29 V	8,014	119,641	64,0278
30 L	8,156	119,324	55,2438
31 Q	7,985	118,975	55,7868
32 K	7,761	120,229	54,7908

Anhang

33	L	7,788	117,813	52,7078
34	G	7,728	107,430	42,9278
35	K	7,930	120,451	52,9798
36	A	8,099	125,624	49,6388
37	D	8,247	120,422	51,4398
38	E	8,328	120,501	53,8848
39	T	8,259	116,378	59,4998
40	K	8,143	124,537	53,3418
41	D	8,199	123,301	51,5308
42	E	8,142	121,745	52,8888
43	Q	7,622	127,061	56,3298
44	Y	n.a.	n.a.	n.a.

Tab. 8-3 Zuordnung (^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$) der SH3-Domäne in 20 mM Natriumphosphat, 100 mM Natriumchlorid, pH 7,4 bei 25°C.

Aminosäure	^1H	^{15}N	$^{13}\text{C}^\alpha$	$^{13}\text{C}^\beta$
1	G	n.a.	n.a.	n.a.
2	S	n.a.	n.a.	n.a.
3	H	n.a.	n.a.	n.a.
4	M	n.a.	n.a.	n.a.
5	S	8,253	118,213	55,979
6	G	8,281	111,965	42,646
7	A	7,984	124,347	49,681
8	G	8,098	108,830	42,473
9	R	7,722	121,829	53,770
10	L	8,650	124,848	53,600
11	D	8,675	117,725	50,438
12	L	8,301	124,251	49,987
13	P	n.a.	n.a.	n.a.
14	P	n.a.	n.a.	61,079
15	G	8,599	112,018	42,891
16	F	7,406	118,956	56,829
17	M	8,027	128,115	54,620
18	F	5,762	111,650	53,940
19	K	9,138	119,018	52,920
20	V	8,829	112,478	56,149
21	Q	9,216	120,211	50,711
22	A	9,267	131,193	50,541
23	Q	9,579	124,873	52,580
24	H	7,378	114,841	50,972
25	D	8,494	121,117	52,516

26	Y	8,958	122,956	56,152	39,183
27	T	7,530	125,740	58,869	66,688
28	A	7,595	129,362	50,031	17,226
29	T	9,007	116,035	60,059	67,538
30	D	7,482	119,790	50,201	40,682
31	T	8,659	112,502	61,589	66,518
32	D	8,456	120,004	51,730	37,623
33	E	7,405	119,733	52,240	30,144
34	L	8,648	122,654	51,391	41,702
35	Q	7,815	121,458	52,750	26,405
36	L	8,848	124,968	50,712	42,892
37	K	9,007	126,657	50,451	31,504
38	A	8,790	125,508	51,730	15,016
39	G	8,601	113,460	42,042	
40	D	8,599	123,633	53,600	39,322
41	V	8,442	124,247	59,719	29,464
42	V	9,398	130,781	58,869	31,844
43	L	9,055	127,171	51,561	37,453
44	V	8,424	127,334	61,759	28,614
45	I	7,911	122,427	55,633	36,586
46	P	n.a.	n.a.	66,229	29,634
47	F	8,296	120,049	56,659	36,943
48	Q	8,339	123,550	55,640	26,065
49	N	7,990	115,979	47,651	36,433
50	P	n.a.	n.a.	62,099	29,634
51	E	8,563	118,196	55,299	26,065
52	E	7,569	118,320	53,600	27,594
53	Q	6,757	120,234	52,920	25,725
54	D	7,974	128,157	51,051	39,492
55	E	8,308	123,210	55,469	27,084
56	G	8,742	113,259	42,722	
57	W	7,936	123,247	54,620	28,274
58	L	8,127	122,099	50,201	43,912
59	M	8,122	120,646	50,541	29,294
60	G	8,833	110,444	43,572	
61	V	8,348	115,022	56,149	33,203
62	K	10,116	129,744	56,489	28,614
63	E	8,853	127,892	57,849	27,934
64	S	9,025	113,588	58,529	75,017
65	D	6,507	122,571	54,960	38,643
66	W	8,195	122,897	57,339	27,934
67	N	8,882	118,950	52,750	35,243
68	Q	6,962	116,815	53,260	27,084
69	H	7,767	113,561	54,280	22,325

Anhang

70	K	6,878	117,264	52,240	30,144
71	E	8,658	123,135	51,391	41,702
72	L	8,924	131,177	56,659	40,002
73	E	9,167	115,628	56,829	26,575
74	K	7,181	114,647	53,770	30,994
75	C	7,491	113,621	55,810	26,914
76	R	7,873	123,501	53,090	28,104
77	G	8,829	109,256	43,402	
78	V	8,356	113,237	57,169	32,184
79	F	8,752	117,486	52,410	36,093
80	P	n.a.	n.a.	58,189	27,254
81	E	8,114	127,363	56,829	27,424
82	N	8,604	115,464	52,070	33,883
83	F	7,462	120,728	56,659	36,263
84	T	8,407	111,617	58,019	70,767
85	E	8,099	117,638	51,900	31,674
86	R	8,718	124,732	54,620	27,764
87	V	7,873	123,501	56,659	30,824
88	P	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Tab 8-4 ermittelte Titrationsparameter aus NMR-Titration von ^{15}N -SH3 mit Exon10-Peptid für jedes Amidproton. Aufgelistet sind nur die Aminosäuren deren Titrationskurve ausgewertet werden konnte.

Aminosäure	K_D (μM)	Stöchiometrie	$\Delta\delta_{\text{max}}$
A22	10,7 \pm 4,1	1,3 \pm 0,2	0,057 \pm 0,001
H24	9,4 \pm 2,8	0,97 \pm 0,09	0,091 \pm 0,001
Y26	22,5 \pm 6,5	1,25 \pm 0,17	0,096 \pm 0,002
T27	13,1 \pm 6,3	0,74 \pm 0,12	0,051 \pm 0,002
T29	12,8 \pm 1,2	0,91 \pm 0,03	0,224 \pm 0,001
T31	9,8 \pm 0,9	0,90 \pm 0,03	0,33 \pm 0,002
E33	8,82 \pm 2,4	0,67 \pm 0,05	0,140 \pm 0,002
Q35	15,5 \pm 4,2	0,95 \pm 0,1	0,093 \pm 0,002
L36	11,1 \pm 2,9	1,24 \pm 0,11	0,065 \pm 0,001
Q53	10,4 \pm 3,2	0,81 \pm 0,07	0,074 \pm 0,001
D54	9,8 \pm 0,7	0,85 \pm 0,02	0,423 \pm 0,002
W57	11,3 \pm 3,8	1,13 \pm 0,13	0,108 \pm 0,002
L58	10,4 \pm 6,1	0,59 \pm 0,09	0,077 \pm 0,003
G60	11,9 \pm 3,4	1,38 \pm 0,15	0,058 \pm 0,001

G77	18,9±8,2	1,44±0,28	0,056±0,001
V78	11,6±2,5	1,09±0,08	0,156±0,002
F79	11,2±3,9	1,19±0,15	0,095±0,002
N82	8,5±2,1	0,99±0,07	0,087±0,001
W57sc	9,43±2,0	0,71±0,04	0,163±0,002

8.3 Pulssequenzen

fHSQC.uw

```

;avance-version
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using States-TPPI method
;with decoupling during acquisition
;S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O'Neil-Johnson
& P.C.M. van Zijl,
; J. Magn. Reson. B 108, 94-98 (1995)

; tested on ubiquitin at 22/11/06

;$OWNER=nmrslu

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=60u"
"d26=2.5m"

"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2-8u-
p21-108u"

"TAU=d26-p16-d16-4u"

"CEN_HN2=(p22*2+6u-p2)/2"
"CEN_HC2=(p4*2+6u-p2)/2"
"d0=(in0-(p21*1.273+6u+4*p3))*0.5"
;
```

```

;"I3=(td1/2)"

1 ze
d11 pl16:f3
2 d1 do:f3
3m
3 d11
4 d12 pl1:f1
50u UNBLKGRAD
(p1 ph0)
4u
p16:gp1
d16
TAU pl3:f3
(CEN_HN2 p2 ph0) (p21 ph0 3u p22 ph1 3u p21
ph0):f3
TAU
4u
p16:gp1
d16 pl2:f2
(p1 ph1)
4u
p16:gp2
d16
(p21 ph4):f3
d0
(CEN_HC2 p2 ph6) (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3
ph0):f2
d0
(p21 ph5):f3
4u
p16:gp2
d16
(p1 ph2)
DELTA1
p16:gp3
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph1
d19*2
p28*0.692 ph1
d19*2

```

Anhang

```
p28*1.462 ph1
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*0.231 ph3
4u
p16:gp3
d16
4u BLKGRAD
DELTA2
(p21 ph0):f3
4u
100u pl16:f3
4u
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 mc #0 to 2 F1PH(ip4, id0)
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=0 2
ph5=0 0 0 2 2 2 2
ph6=0 0 2 2
```

trocy.uw

```
;avance-version
;J.Weigelt, JACS 120(1998), 10778-10779
```

```
;$OWNER=nmrsu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"in0=inf1/2"
```

```
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
```

```
"d0=4u"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d19=60u"
"d25=2.65m"
"d26=2.65m"
"d27=2.65m"
"TAU=d26-p16-d16-4u"
```

```
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0
```

```
;pl1 : f1 channel - 1H PL for p1 (high pow)
;pl18: f1 channel - 1H PL for p28 (3-9-19)
;pl2 : f2 channel - 13C PL for p3 (high pow)
;pl3 : f3 channel - 15N PL for p21 (high pow)
;pl16: f3 channel - 15N PL for pcpd3 (decoup.)
;p1 : f1 channel - 90 deg high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 deg high power pulse
;p21 : f3 channel - 90 deg high power pulse
;p28 : f1 channel - 90 deg pulse (3-9-19)
;p16 : gradient pulse
;d16 : delay for gradient recovery
;pcpd3: f3 channel - 90 deg dec. pulse at pl16
;cpdprg3: composite pulse dec. for ch.3 [garp]
;d26 : ca. 1/(2*J(N,HN)) [2.5m]
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
; d19 = 90u for 600 MHz
;d1 : relaxation delay
;NDO = 2
;NS = N*2
;DS >= 8
;phc0(F1) = 90 deg, phc1(F1) = -180 deg
;gpz1:50%
;gpz2:80%
;gpz3:30%
;use sine.100
;d31:in0
```

```
"TAU2=d25-p16-d16-4u"
"DELTA1=d0*2+p3*4+6u+p16+d16"
"DELTA2=d27-4u-p16-d16"
"DELTA3=(d19*2-p22)*0.5"
"DELTA4=DELTA1-p16-d16-p21-8u"
```

```
"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
```

```
1 ze
d11
2 d11
d1 pl1:f1 pl2:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(p1 ph1)
4u
p16:gp1
d16
TAU2
(CEN_HN2 p2 ph2) (p22 ph10):f3
4u
TAU2
p16:gp1
d16
(p1 ph11)
4u
```

```

p16:gp2*EA*-1
d16
(p21 ph3):f3      ;; ph2=1; ph3=13
d0
(p3 ph1 3u p4 ph2 3u p3 ph1):f2
d0
p16:gp2*EA
d16
(p1 ph4)          ;; ph4=1, invert for second
FID
4u
p16:gp3
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph2) (p22 ph1):f3
4u
TAU
p16:gp3
d16
(p1 ph5)
DELTA1
(p21 ph6):f3      ;;ph5=2, ph6=1
4u
p16:gp4
d16 pl18:f1
DELTA2
p28*0.231 ph8
d19*2
p28*0.692 ph8
d19*2
p28*1.462 ph8
DELTA3
(p22 ph1):f3
DELTA3
p28*1.462 ph9
d19*2
p28*0.692 ph9
d19*2
p28*0.231 ph9

trhnca.uw
;avance-version
;$OWNER=nmrslu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/4"

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"

;p14/sp3 G3.256

4u
DELTA2
p16:gp4
d16
(p21 ph7):f3      ;; ph7=0 . invert for second
FID
4u
p16:gp2*0.1013
d16
DELTA4
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1EA(igrad EA & ip4*2 & ip7*2,
id0 & ip3*2 & ip10*2 & ip31*2)
exit

ph1=0 0 1 1 2 2 3 3
ph2=1 1 2 2 3 3 0 0
ph3=1 3 2 0 3 1 0 2
ph4=1 1 2 2 3 3 0 0
;;ph4=3 3 0 0 1 1 2 2
ph5=2 2 3 3 0 0 1 1
ph6=1 1 2 2 3 3 0 0
ph7=0 0 1 1 2 2 3 3
;;ph7=2 2 3 3 0 0 1 1
ph8=0 0 1 1 2 2 3 3
ph9=2 2 3 3 0 0 1 1
ph10=0 0 1 1 2 2 3 3
ph11=3 3 0 0 1 1 2 2
ph31=0 2 1 3 2 0 3 1

;p16: 1ms
;gpz1: 50%
;gpz2: -80%
;gpz3: -30%
;gpz4: -65%

;p13/sp2 rect100
;p14/sp5 G3.256 -117ppm offset
;p15/sp13 rect100
;p13/sp8 rect100

"d3=12.4m"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d17=200u"
"d19=60u"

"d0=4u"
"d10=4u"
"d26=2.65m"
"d30=d3*0.5"
"d29=d30-d10"
"d28=d29-p16-d16+p21*1.273+DELTA1-p11-28u"

```

Anhang

"TAU=d26-p16-d16-4u"	(p13:sp2 ph8):f2
"DELTA=d0*2-4u+3u+p22"	d0
"DELTA1=4u"	(p2 ph0):f1
"DELTA2=d26-p16-d17-4u"	3u
"DELTA3=0.5*(p16+d17+8u-p28*4.770-d19*10-p22-DELTA1)"	(p14:sp5 ph10):f2
"DELTA4=DELTA2-p28*4.77-d19*10"	3u
"TAU1=p14"	(p22 ph0):f3
	d0
	(p15:sp13 ph11):f2
"CEN_HN1=(p21-p1)/2"	DELTA
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"	(p2 ph2):f1
"CEN_CN2=(p14-p22)/2"	3u
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"	(p14:sp5 ph12):f2
	4u
"spoffs2=0"	(p13:sp8 ph13):f2
"spoffs3=0"	4u
"spoffs5=23500"	
"spoffs8=0"	(p21 ph6):f3
"spoffs13=0"	d30
	(p14:sp5 ph10):f2
"in30=in10" ;; nd0 = 4	d30
	(p14:sp3 ph11):f2
aqseq 321	3u
	(p22 ph9):f3
1 ze	3u
d11	TAU1
2 d11	d29
d1 pl11:f1 pl2:f2 pl3:f3	d10
50u UNBLKGRAD	(p14:sp5 ph12):f2
(p11 ph3)	d10
4u	d28
20u pl1:f1	p16:gp3*EA
4u	d16 pl11:f1
(p1 ph0)	(p11 ph0):f1
4u	4u
p16:gp1	20u pl1:f1
d16	4u
TAU	(p1 ph4)
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3	4u
4u	p16:gp4
TAU	d16
p16:gp1	TAU
d16	(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
(p1 ph3)	4u
4u	TAU
p16:gp2*EA	p16:gp4
d16	d16
(p21 ph7):f3	(p1 ph2)
d3	DELTA1
(p14:sp3 ph10):f2	(p21 ph1):f3
3u	4u
(p22 ph0):f3	p16:gp5
3u	d17 pl18:f1
TAU1	DELTA2
d3 pl1:f1	DELTA3
(p21 ph1):f3	(p22 ph0):f3
4u	DELTA3
	p28*0.231 ph0

```

d19*2
p28*0.692 ph0
d19*2
p28*1.462 ph0
d19*2
p28*1.462 ph2
d19*2
p28*0.692 ph2
d19*2
p28*0.231 ph2
4u
DELTA4
p16:gp5
d17
(p21 ph5):f3          ;; ph7=0 . invert for second
FID
4u
p16:gp3*0.1013
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
      F1PH(rd10 & rd30 & ip8, id0)
      F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2, id10 &
dd30 & ip6*2 & ip31*2)

exit
ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=1
ph5=0
ph6=1 3
ph7=0
ph8=0 0 2 2
ph9=0 0 0 0 2 2 2 2
ph10=0
ph11=0
ph12=0
ph13=0
ph31=0 2 2 0

;GPZ=50-80-(-80)-(-30)-(-65)
;gpz1: 50%
;gpz2: 80%
;gpz3: -80%
;gpz4: -30%
;gpz5: -65%

trhncocaetgp3d
;avance-version (07/08/13)
;TROSY-HNCOCA
;3D sequence with
; inverse correlation for triple resonance
; via TROSY and inept transfer steps
;
; F1(H) -> F3(N) -> F2(Ca) -> F2(C=O,t1)
;   -> F2(Ca) -> F3(N,t2) -> F1(H,t3)
;
;on/off resonance Ca and C=O pulses using shaped
pulse
;phase sensitive (t1)
;phase sensitive using Echo/Antiecho gradient
selection (t2)
;using constant time in t2
;with H-1 180degree pulses in t1
;uncompensated version d25=d26
;(use parameterset TRHNCOCAETGP3D)
;
;T. Schulte-Herbrueggen & O.W. Sorensen, J.
Magn. Reson. 144,
; 123 - 128 (2000)
;A. Eletsky, A. Kienhoefer & K. Pervushin,
; J. Biomol. NMR 20, 188-180 (2001)
;(M. Salzmann, G. Wider, K. Pervushin, H. Senn & K.
Wuethrich,
; J. Am. Chem. Soc. 121, 844-848 (1999))
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D

;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple>

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

define list<gradient> EA3 = { 0.8750 1.0000}
define list<gradient> EA5 = { 1.0000 0.6667}
define list<gradient> EA7 = { 0.6595 1.0000}

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"

"d22=4m"
"d23=12m"
"d25=2.3m"
"d26=2.3m"

"d0=3u"
"d10=3u"
"d30=d23/2-d25/2-p14/2-p16/2-d16/2-2u"

```

Anhang

"in0=inf1/4"	(p13:sp2 ph6):f2
"in10=inf2/4"	4u
"in30=in10"	(p14:sp5 ph1):f2
	p16:gp1
	d16
	DELTA3
	(p14:sp3 ph1):f2
"DELTA=d0*4+p2*2+larger(p14,p22)-p14-4u"	4u
"DELTA1=d26-p16-d16"	(p14:sp5 ph1):f2
"DELTA2=d23-p16-d16"	DELTA3
"DELTA3=d22-p14-p16-d16-4u"	p16:gp1
"DELTA4=d23/2-d25/2-p14/2-d10+p21*2/3.1416"	d16
"DELTA5=d23/2-d25/2-p14/2-d10-p16-d16- p11+p21*2/3.1416-8u"	(p13:sp8 ph2):f2
"DELTA6=d25-p16-d16"	4u
"DELTA7=d26-p11-p16-d16-8u"	30u fq=cnst22(bf ppm):f2
	(p13:sp2 ph7):f2
"spoff2=0"	d0
"spoff3=0"	(p2 ph1):f1
"spoff5=bf2*((cnst22-cnst21)/1000000)"	d0
"spoff7=bf2*((cnst21-cnst22)/1000000)"	(center (p14:sp7 ph1):f2 (p22 ph1):f3)
"spoff8=0"	d0
	(p2 ph1):f1
	d0
aqseq 321	(p14:sp3 ph1):f2
	DELTA
	(p14:sp7 ph1):f2
	4u
	(p13:sp8 ph1):f2
1 d11 ze	
2 d11	
3 d1 pl1:f1 fq=cnst21(bf ppm):f2	
50u UNBLKGRAD	4u
	30u fq=cnst21(bf ppm):f2
4u pl0:f1	
(p11:sp1 ph2:r):f1	(p13:sp2 ph2):f2
4u	4u
4u pl1:f1	(p14:sp5 ph1):f2
	p16:gp1
	d16
	DELTA3
(p1 ph3):f1	(p14:sp3 ph1):f2
p16:gp1	4u
d16	(p14:sp5 ph1):f2
DELTA1	DELTA3
(center (p2 ph2) (p22 ph1):f3)	p16:gp1
DELTA1	d16
p16:gp1	(p13:sp8 ph1):f2
d16	
(p1 ph2):f1	
(p21 ph1):f3	(p21 ph5):f3
p16:gp2	d30
d16	(p14:sp5 ph1):f2
DELTA2	d30
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3)	(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3)
DELTA2	DELTA4
p16:gp2	d10
d16	(p14:sp5 ph1):f2
(p21 ph2):f3	d10


```

DELTA5
p16:gp3*EA3
d16 pl0:f1
(p11:sp1 ph3:r):f1
4u
4u pl1:f1

(p1 ph8)
p16:gp4
d16
DELTA6
(center (p2 ph2) (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph2):f3 )
DELTA6
p16:gp4
d16
(p1 ph1)

p16:gp5*EA5
d16
4u

(p21 ph1):f3
p16:gp6
d16
DELTA7 pl0:f1
(p11:sp1 ph4:r):f1
4u
4u pl1:f1
(center (p2 ph2) (p22 ph2):f3 )
4u pl0:f1
(p11:sp1 ph4:r):f1
4u
DELTA7
p16:gp6
d16 pl1:f1
(p21 ph9:r):f3

p16:gp7*EA7
d16
4u BLKGRAD

go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
  F1PH(rd10 & rd30 & rp5 & rp31 & ip7, id0)
  F2EA(igrad EA3 & igrad EA5 & igrad EA7 & ip8*2
& ip9*2, id10 & dd30 & ip5*2 & ip31*2)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=2
ph4=3
ph5=0 2
ph6=0 0 0 2 2 2 2
ph7=0 0 2 2
ph8=3
ph9=3

ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;sp1: f1 channel - shaped pulse 90 degree (H2O on
resonance)
;sp2: f2 channel - shaped pulse 90 degree (on
resonance)
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on
resonance)
;sp5: f2 channel - shaped pulse 180 degree (Ca off
resonance)
;sp7: f2 channel - shaped pulse 180 degree (C=O
off resonance)
;sp8: f2 channel - shaped pulse 90 degree (on
resonance)
;
for time reversed pulse
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse
[1 msec]
;p13: f2 channel - 90 degree shaped pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1
msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (F1 in 3D) [3
usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d10: incremented delay (F2 in 3D) [3
usec]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d22: 1/(4J(CO)Ca) [4 msec]
;d23: 1/(4J(N)CO) [12 msec]
;d25: 1/(4J'(N)H) [2.3 msec]
;d26: 1/(4J(N)H) [2.3 msec]
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d23/2-d25/2-
p14/2-p16/2-d16/2-2u
;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
;cnst22: Calpha chemical shift (offset, in ppm)
;o2p: Calpha chemical shift (cnst22)
;inf1: 1/SW(Ca) = 2 * DW(Ca)
;inf2: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;in0: 1/(4 * SW(Ca)) = (1/2) DW(Ca)
;nd0: 4
;in10: 1/(4 * SW(N)) = (1/2) DW(N)
;nd10: 4
;in30: = in10
;NS: 8 * n
;DS: >= 16
;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2 td2 max = 2
* d30 / in30
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1

```

Anhang

```
;FnMODE: echo-antiecho in F2
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4 : gp 5 :
gp 6 : gp 7
;          2 : 2 : -80 : 2 : 30 : 45 : 30.13

;for z-only gradients:
;gpz1: 2%
;gpz2: 2%
;gpz3: -80%
;gpz4: 2%
;gpz5: 30%
;gpz6: 45%
;gpz7: 30.13%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100

trhncacb.uw
;avance-version

;$OWNER=nmrsl
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/4"

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"

;p14/sp3 Q3.1000
;p14/sp5 Q3.1000 131ppm offset

"d3=12.4m"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d17=200u"
"d19=60u"

"d0=10u"
"d10=4u"
"d23=(3.5m-p14)*0.5"
"d26=2.65m"
"d30=d3*0.5"
"d29=d30-d10"
"d28=d29-p16-d16+p21*1.273+DELTA1-p11-28u"
"TAU=d26-p16-d16-4u"
"DELTA=d0*2-10u+3u+p22"
"DELTA1=4u"
"DELTA2=d26-p16-d17-4u"

;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam5: SINE.100
;gpnam6: SINE.100
;gpnam7: SINE.100

;Processing
;PHC0(F2): 22.5

;$Id: trhncocaetgp3d,v 1.4.2.1 2007/09/14
16:17:35 ber Exp $

"DELTA3=0.5*(p16+d17+8u-p28*4.770-d19*10-
p22-DELTA1)"
"DELTA4=DELTA2-p28*4.77-d19*10"
"TAU1=p14"

"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_CN2=(p14-p22)/2"
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"

"spoffs3=0"
"spoffs5=26360"

"in30=in10" ;; nd0 = 4

aqseq 321

1 ze
d11
2 d11
d1 pl11:f1 pl2:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(p11 ph3)
4u
20u pl1:f1
4u
(p1 ph0)
4u
p16:gp1
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
p16:gp1
d16
(p1 ph3)
```

4u
 p16:gp2*EA
 d16
 (p21 ph7):f3
 d3
 (p14:sp3 ph10):f2
 3u
 (p22 ph0):f3
 3u
 TAU1
 d3 pl1:f1 pl2:f2
 (p21 ph1):f3
 4u

 (p3 ph8):f2
 4u
 d23 pl0:f2
 (p14:sp5 ph0):f2
 4u
 d23 pl2:f2
 (p4 ph10):f2
 4u
 d23 pl0:f2
 (p14:sp5 ph0):f2
 4u
 d23 pl2:f2
 (p3 ph12):f2
 4u
 d0 pl0:f2
 (p2 ph0):f1
 3u
 (p14:sp5 ph10):f2
 3u
 (p22 ph0):f3
 d0
 4u pl2:f2
 (p4 ph10):f2
 4u
 DELTA pl0:f2
 (p2 ph2):f1
 3u
 (p14:sp5 ph7):f2
 10u
 4u pl2:f2

 (p3 ph11):f2
 4u
 d23 pl0:f2
 (p14:sp5 ph10):f2
 4u
 d23 pl2:f2
 (p4 ph0):f2
 4u
 d23 pl0:f2
 (p14:sp5 ph0):f2
 4u
 d23 pl2:f2
 (p3 ph13):f2

4u

 (p21 ph6):f3
 d30 pl0:f2
 (p14:sp5 ph10):f2
 d30
 (p14:sp3 ph11):f2
 3u
 (p22 ph9):f3
 3u
 TAU1
 d29
 d10
 (p14:sp5 ph12):f2
 d10
 d28
 p16:gp3*EA
 d16 pl11:f1
 (p11 ph0):f1
 4u
 20u pl1:f1
 4u
 (p1 ph4)
 4u
 p16:gp4
 d16
 TAU
 (CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
 4u
 TAU
 p16:gp4
 d16
 (p1 ph2)
 DELTA1
 (p21 ph1):f3
 4u
 p16:gp5
 d17 pl18:f1
 DELTA2
 DELTA3
 (p22 ph0):f3
 DELTA3
 p28*0.231 ph0
 d19*2
 p28*0.692 ph0
 d19*2
 p28*1.462 ph0
 d19*2
 p28*1.462 ph2
 d19*2
 p28*0.692 ph2
 d19*2
 p28*0.231 ph2
 4u
 DELTA4
 p16:gp5
 d17
 (p21 ph5):f3

Anhang

```
4u
p16:gp3*0.1013
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
      F1PH(rd10 & rd30 & ip11 & ip13, id0)
      F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2, id10 &
dd30 & ip6*2 & ip31*2)
exit
```

```
ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=1
ph5=0
ph6=1 3
```

trhncocacb.uw

```
;avance-version
```

```
;$OWNER=nmrslu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"in0=inf1/2"
"in10=inf2/4"
```

```
"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
```

```
;p14/sp3 G3.256
;p13/sp2 G4
;p14/sp5 G3.256 -130ppm offset
;p15/sp13 rect100
;p13/sp8 g4tr
;p12/sp12 rect100
;p14/sp7 G3.256 +130ppm offset
```

```
"d3=12.4m"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d17=200u"
"d19=60u"

"d0=10u"
"d10=4u"
"d23=3.5m-p16-d16"
"d24=4.4m"
"d26=2.65m"
"d30=d3*0.5"
"d29=d30-d10"
"d28=d29-p16-d16+p21*1.273+DELTA1-p11-28u"
```

```
ph7=0
ph8=0 0 2 2
ph9=0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2
ph10=0
ph11=3 3 3 3 1 1 1 1
ph12=1 1 1 1 3 3 3 3
ph13=0
ph31=0 2 2 0
```

```
;gpz1: 50%
;gpz2: 80%
;gpz3: -80%
;gpz4: -30%
;gpz5: -65%
```

```
"TAU=d26-p16-d16-4u"
"DELTA=d0*2-10u+3u+p22"
"DELTA1=4u"
"DELTA2=d26-p16-d17-4u"
"DELTA3=0.5*(p16+d17+8u-p28*4.770-d19*10-
p22-DELTA1)"
"DELTA4=DELTA2-p28*4.77-d19*10"
"TAU1=p14"
```

```
"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_CN2=(p14-p22)/2"
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"
```

```
"spoffs2=0"
"spoffs3=0"
"spoffs5=-26000"
"spoffs7=26000"
"spoffs8=0"
"spoffs12=0"
"spoffs13=0"
```

```
"in30=in10" ;; nd0 = 4
```

```
aqseq 321
```

```
1 ze
d11
2 d11
d1 pl11:f1 pl0:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(p11 ph3)
4u
20u pl1:f1
4u
(p1 ph0)
4u
```

```

p16:gp1
d16
TAU fq=cnst26(bf ppm):f2
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
p16:gp1
d16
(p1 ph3)
4u
p16:gp2*EA
d16
(p21 ph7):f3
d3
(p14:sp3 ph10):f2
3u
(p22 ph0):f3
3u
TAU1
d3 pl1:f1
(p21 ph1):f3
4u

(p13:sp2 ph10):f2
4u
(p14:sp5 ph11):f2
d24
(p14:sp3 ph10):f2
4u
(p14:sp5 ph11):f2
d24
(p13:sp8 ph12):f2
4u
50u fq=cnst27(bf ppm):f2
20u
p16:gp6
d16
(p12:sp12 ph8):f2      ;; starting CA
evolution
4u
p16:gp7
d16
d23
(p15:sp13 ph10):f2
4u
p16:gp7
d16
d23
(p12:sp12 ph13):f2
4u
d0
(p2 ph0)
3u
(p14:sp7 ph0):f2
3u
(p22 ph0):f3
d0
4u

(p15:sp13 ph15):f2
4u
DELTA
(p2 ph2)
3u
(p14:sp7 ph10):f2
10u
4u

(p12:sp12 ph16):f2
4u
p16:gp8
d16
d23
(p15:sp13 ph11):f2
4u
p16:gp8
d16
d23
(p12:sp12 ph17):f2
4u
50u fq=cnst26(bf ppm):f2
4u
(p13:sp2 ph12):f2
4u
d24
(p14:sp5 ph11):f2
4u
(p14:sp3 ph10):f2
d24
(p14:sp5 ph11):f2
4u
(p13:sp8 ph10):f2

(p21 ph6):f3
d30 pl0:f2
(p14:sp5 ph10):f2
d30
(p14:sp3 ph11):f2
3u
(p22 ph9):f3
3u
TAU1
d29
d10
(p14:sp5 ph12):f2
d10
d28
p16:gp3*EA
d16 pl11:f1
(p11 ph0):f1
4u
20u pl1:f1
4u
(p1 ph4)
4u
p16:gp4
d16

```

Anhang

```
TAU                                F1PH(rd10 & rd30 & ip16 & ip17, id0)
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3     F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2, id10 &
4u                                dd30 & ip6*2 & ip31*2)
TAU                                exit
p16:gp4                            ph0=0
d16                                ph1=1
(p1 ph2)                          ph2=2
DELTA1                             ph3=3
(p21 ph1):f3                      ph4=1
4u                                ph5=0
p16:gp5                            ph6=1 3
d17 pl18:f1                       ph7=0
DELTA2                             ph8=0 0 2 2
DELTA3                             ph9=0 0 0 0 0 0 0
(p22 ph0):f3                      2 2 2 2 2 2 2
DELTA3                             ph10=0
p28*0.231 ph0                    ph11=0
d19*2                              ph12=1
p28*0.692 ph0                    ph13=1 1 1 1 3 3 3 3
d19*2                              ph15=0
p28*1.462 ph0                    ph16=3 3 3 3 1 1 1 1
d19*2                              ph17=0
p28*1.462 ph2                    ph31=0 2 2 0
d19*2
p28*0.692 ph2
d19*2
p28*0.231 ph2
4u
DELTA4
p16:gp5
d17
(p21 ph5):f3
4u
p16:gp3*0.1013
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
```

n15noesy.uw

```
;avance-version
;3D 15N-edited NOESY
;phase sensitive using States-TPPI method in both
indirect dimensions
;optimized pulse sequence for exchanging protons
;S. Talluri and G. Wagner
; J. Magn. Reson. B 112, 200-205 (1996)
;using composite pulses for C13-decoupling

;Author: Kristian Schweimer, 04.12.97
;
;Setup:
;F1 = 15N
;F2, F3 = 1H

;$OWNER=nmrslu
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/2"

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"

"d0=4u"
"d10=4u"
"d22=d10*2+p22*2+p4*2+12u+3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
```

```

"d16=100u"
"d19=60u"
"d26=2.5m"

"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2-8u"
"DELTA3=p3*4+6u+d0*2"

"TAU=d26-p16-d16-4u"

"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_CN1=(p22-p3*4-6u)/2"
"CEN_HC1=(p3*4+6u-p2)/2"

"l3=(td1/2)"
"l13=(td2/2)"

aqseq 312

1 ze
  d11 pl16:f3
2 d1 do:f3
  6m
3 3m
4 3m
5 3m
6 3m
  d11 fq=cnst26(bf ppm):f2 ; set carbon
transmitter in the aliphatic center 42 ppm
  d12 pl3:f3
  d12 pl2:f2
  d12 pl1:f1
  (p1 ph1)
  d10 ; H1-Evolution
  (p3 ph13 3u p4 ph14 3u p3 ph13):f2
  3u
  (p21 ph13 3u p22 ph14 3u p21 ph13):f3
  d10
  (p2 ph4) ; spin-echo for avoiding phase
evolution
  d22
  (p1 ph3)
  50u UNBLKGRAD
  d8 fq=cnst27(bf ppm):f2 ; mixing time, set
C13-transm. to 115 ppm
  p16:gp1 ; scrambling residual transv.
magnetization
  d16
  (p1 ph4)
  4u
  p16:gp2
  d16
  TAU pl3:f3
  (CEN_HN2 p2 ph4) (p22 ph5):f3
  4u

TAU
p16:gp2
d16
(p1 ph6)
4u
p16:gp3
d16
(p21 ph7):f3
d0 ; N15-Evolution
(CEN_HC1 p2 ph8) (p3 ph13 3u p4 ph14 3u p3
ph13):f2
d0
(p22 ph13):f3
DELTA3
(p21 ph9):f3
4u
p16:gp3
d16
(p1 ph10)
DELTA1
p16:gp4
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph11
d19*2
p28*0.692 ph11
d19*2
p28*1.462 ph11
DELTA
(p22 ph13):f3
DELTA
p28*1.462 ph12
d19*2
p28*0.692 ph12
d19*2
p28*0.231 ph12
4u
p16:gp4
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 pl16:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 wr #0 if #0 zd ; ph7 = States-TPPI phase
for N15
3m ip7
3m ip5
lo to 3 times 2
3m id0 ; incrementing N15 Evolution
lo to 4 times l3
3m ip1 rd0 ; ph1 = States-TPPI phase for H1,
resetting N15-Evol.
lo to 5 times 2
3m id10 ; incrementing H1-Evolution
lo to 6 times l13
exit

ph1=0
ph2=0 0 0 0 2 2 2 2

```

Anhang

ph3=0 0 2 2
ph4=0
ph5=0
ph6=1
ph7=0 2
ph8=0 0 0 0 2 2 2 2
ph9=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph10=2
ph11=1
ph12=3
ph13=0 0 0 0 2 2 2 2

ph14=1 1 1 1 3 3 3 3
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2

;cnst26 : frequency ali 42 ppm
;cnst27 : frequency aro 115 ppm

;gpz1: 13%
;gpz2: 30%
;gpz3: 0.6%
;gpz4: 50%

hnoe.mk

;heteronuclear nuclear overhauser effect with
gradient pulses
;with saturation to 1H
;using TPPI

;\$OWNER=nmrslu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=inf1/4"

"p2=p1*2" ; 180 to 1H
"p22=p21*2" ; 180 to 15N
"p5=1.333*p1" ; saturation pulse to 1H
"d5=1.333*p1"
"p17=10m" ; "spin lock pulse" to 1H (10ms...)
"d11=30m" ; prescan-delay
"d12=20u"
"d13=3u" ; delay
"d14=d4-2*d0-p2" ; half J-coupling (corrected by
pulse-length)
"d24=2.5m" ; half J-coupling
"d4=2.5m" ; half J-coupling

"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2-8u"
"DELTA4=d27-p16-d16-4u"
"DELTA3=d27-p16-d16-4u-p4*2-6u-2*d0"

"TAU=d26-p16-4u"

"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_HC2=(p4*2+6u-p2)/2"

"d0=3u" ; increment time
"d26=2.5m"
"d27=2.75m"

1 ze
d11 pl16:f3

;; *****saturated experiment*****
2 d1 do:f3
3 d11
4 d12 pl1:f1
d12 pl3:f3
d12 pl2:f2
5 5m
(p5 ph0):f1 ; saturation pulse - saturation time
lo to 5 times l3 ; approximately 600
6 50u UNBLKGRAD
20u pl11:f1
(p11 ph2):f1
20u pl1:f1
(p1 ph0):f1
4u
p16:gp1
d16
(p21 ph4):f3
4u
p16:gp2
d16
DELTA4
(CEN_HN2 p2 ph0):f1 (p22 ph6):f3
DELTA3
4u
p16:gp2
d16
d0
(CEN_HC2 p2 ph2):f1 (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3
ph0):f2
d0
(p21 ph0):f3
4u
p16:gp3
d16 pl11:f1
(p11 ph2):f1
20u pl1:f1
(p1 ph0):f1
DELTA1
p16:gp4
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph1
d19*2
p28*0.692 ph1


```

d19*2
p28*1.462 ph1
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*0.231 ph3
4u
p16:gp4
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 pl16:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 wr #0 if #0 zd
;; *****unsaturated experiment*****
7 d1 do:f3
8 d11
9 d12 pl1:f1
d12 pl3:f3
d12 pl2:f2
10 5m
d5 ; delay
lo to 10 times l3 ; approximately 600
11 50u UNBLKGRAD
20u pl11:f1
(p11 ph2):f1
20u pl1:f1
(p1 ph0):f1
4u
p16:gp1
d16
(p21 ph4):f3
4u
p16:gp2
d16
DELTA4
(CEN_HN2 p2 ph0):f1 (p22 ph6):f3
DELTA3
4u
p16:gp2
d16
d0
(CEN_HC2 p2 ph2):f1 (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3
ph0):f2
d0
(p21 ph0):f3
4u
p16:gp3
d16 pl11:f1
(p11 ph2):f1
20u pl1:f1
(p1 ph0):f1
DELTA1
p16:gp4
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph1
d19*2
p28*0.692 ph1
d19*2
p28*1.462 ph1
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*0.231 ph3
4u
p16:gp4
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 pl16:f3
go=7 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 wr #1 if #1 id0 ip4 zd
lo to 3 times td1
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=1 1 1 1 3 3 3 3
ph5=0
ph6=0 1 2 3
ph7=0 0 0 0 0 0 0 0
2 2 2 2 2 2 2 2
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

;gpz1: 45%
;gpz2: 0.6%
;gpz3: 13%
;gpz4: 70%

```


9 Eigene Publikationen

- (1) Hacke, M., Gruber, T., Schulenburg, C., Balbach, J. & Arnold, U. (2013). Consequences of proline-to-alanine substitutions for the stability and refolding of onconase. *Febs J* **280**, 4454-62.
- (2) Gruber, T. & Balbach, J. Folding pathway of the dimeric AmphiphysinII/Bin1 N-BAR domain. *J Mol Biol* (in Vorbereitung)
- (3) Daum, B., Auerswald, A., Hause, G., Gruber, T., Balbach, J., Kühlbrandt, W. & Meister, A. Structure of the human N-BAR domain and its role in shaping sarcolemma model membrane tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* (in Vorbereitung)

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tobias Gruber
 Geburtsdatum: 19.04.1984
 Geburtsort: Köthen(Anhalt)
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: ledig, eine Tochter

Ausbildung

09/1990-07/1994 Grundschole „Rüsternbreite III“, Köthen(Anhalt)
 09/1994-07/2003 Gymnasium „An der Rüsternbreite“, Köthen(Anhalt)
 10/2003-06/2004 Wehrdienst
 10/2004-09/2009 Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
 Studiengang Biochemie
 Abschluss: Diplom-Biochemiker
 Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Proteinfaltung und Lipidinteraktion humaner N-BAR Domänen“
 seid 09/2009 Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
 Promotion in der Arbeitsgruppe Biophysik unter Leitung von Prof. Dr. Jochen Balbach

Vorträge und Poster

15.10.-17.10.2010
Folding of an dimeric human membrane binding protein, Poster
 21th Faltertage, Regensburg

18.11.-20.11.2010
Folding of a dimeric human membrane binding protein, Vortrag
 ZIK-HALOmem retreat, Meisdorf

Lebenslauf

03.03.-05.03.2011

Folding of an dimeric human membrane binding protein, Poster
2nd International Meeting GRK1026, Halle

01.06.-08.06.2011

Folding behaviour of human Ampl/Bin1 N-BAR domain, Vortrag
Protein Science Summer school, Organisator: Flemming M. Poulsen, Spetses, Griechenland

26.09.-27.09.2011

Biophysical characterisation of the membrane curving human N-BAR protein, Vortrag
Gesamtarbeitssprechnung ProNet-T³, Halle

14.10.-16.10.2011

Folding and function of the membrane curving human N-BAR protein, Poster
22th Faltertage, Regensburg

18.06.-19.06.1012

The biophysical story about the membrane binding protein Ampl/Bin1 und its lipid interaction binding domain N-BAR, Vortrag
ZIK-HALOmem retreat, Wernigerode

25.06.-30.06.2012

Folding behaviour of human Ampl/Bin1 N-BAR domain, Vortrag
EMBO-Kurs: *Transient kinetic methods applied to biological macromolecules*,
Organisator: Mike Geeves, Canterbury, UK

12.-14.10.2012

The human N-BAR domain: Not only a curved protein, Poster
23th Faltertage, Regensburg

03.06.-04.06.2013

The AmphiphysinII/Bin1 protein: What have we reached so far?, Vortrag
ZIK-HALOmem retreat, Oppurg

31.07.2013

Folding behaviour of human Ampl/Bin1 N-BAR domain, Gastvortrag
TU München, AG Prof. T. Kiefhaber

18.10.-20.10.2013

Folding mechanism and membrane interaction of N-BAR, Vortrag
24th Faltertage, Regensburg

04.11.-06.11.2013

The folding pathway of the dimeric lipid binding Protein N-BAR, Poster
3rd International Meeting GRK1026, Halle

17.10.-19.10.2014

Folding pathway of the dimeric AmphiphysinII/Bin1 N-BAR domain, Poster
25th Faltertage, Regensburg

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Es wurden nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet, inhaltlich oder wörtlich entnommene Stellen sind als solche markiert. Weiter erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Bewerbung eines Doktorgrades eingereicht habe. Ich selbst habe mich noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle(Saale), den 08.12.2014

Tobias Gruber

12 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Fachgruppe Biophysik unter Leitung von Prof. Dr. Jochen Balbach an der Martin-Luther-Universität angefertigt. Bei ihm möchte ich mich besonders bedanken für die Überlassung des sehr interessanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft, viele hilfreiche Ratschläge, sein Vertrauen in vielen Dingen und auch die Freiheit die mir gelassen wurde in der Bearbeitung und Durchführung von Projekten und Projektideen.

Bei PD Dr. Ralph Golbik und PD Dr. Hauke Lilie möchte ich mich bedanken für die Betreuung dieser Arbeit seitens der Biochemie, für zahlreiche konstruktive Diskussionen, Ratschläge und Hinweise. Ich möchte mich bei Ralph bedanken für seine Hilfe und Unterstützung bei Problemen der *stopped-flow*-Anlage und bei Hauke für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugationsmessungen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Christian Schwiager bedanken für seine Einführung in die Langmuir-Filmwaage-Technik. Unseren Kooperationspartnern PD Dr. Annette Meister und Andrea Auerswald danke ich für die Präparation und Aufnahme der EM-Bilder, sowie die Betrachtung und Diskussionen zu allen Ergebnissen rund um die Lipidinteraktionen.

Bei allen ehemaligen und derzeitigen Laborkollegen möchte ich mich bedanken: Dr. Caroline Haupt, Dr. Christian Löw, Dr. Ulrich Weininger, Dr. Michael Kovermann, Dr. Rolf Sachs, Rica Patzschke, Mathias Henze, Mohanraj Gopalswamy, Dr. Amit Kumar, Prof. Dr. Detlef Reichert, Stefan Gröger, Kathrin Waldheim, Heike Böcker, Susanne Link, Constanze Westphal, Monika Baumann, Andi Klamt und Matthias Altenstein. Besonders möchte ich mich bei Kathrin bedanken für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor, bei Caro für ihre Hilfe bei allen Problemen in der Proteinchemie bzw. Molekularbiologie und für ihre Unterstützung in der Anfangszeit. Uli und Micha möchte ich danken für ihre Hilfe bei allen NMR-spektroskopischen Fragen und ihr kritisches Hinterfragen von Ergebnissen und die darauffolgenden Diskussionen. Christian danke für die Einführung in das Thema.

Ich möchte mich auch bei allen Forschungsgruppenpraktikanten bzw. Bachelorstudenten bedanken, die ich in meiner Zeit betreuen durfte und ich auch während dieser Zeit etwas lernen konnte. Diese waren Veronika Preylowski, Caroline Falk, Alina Bendinger, Martha Schulz und Madlen Stephani.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Festkörper-NMR-Gruppe für die gute Atmosphäre und viele gute ablenkende Diskussionen.

Bei Prof. Dr. Thomas Kiefhaber und Dr. Annett Bachmann möchte ich bedanken für die Messzeit an der PiStar-CD-*stopped-flow*-Anlage.

Ferner gilt mein Dank dem gesamten HALOmem-Team für viele gute Diskussionen und Ratschläge rund um das Thema Membran und die sehr angenehmen *retreats*.

Für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotionszeit möchte ich mich beim BMBF, dem Land Sachsen-Anhalt, der DFG und dem SFB-610 bedanken und für die Möglichkeit an zwei Workshops im Ausland teilzunehmen.

Ein besonderen Dank gilt Claudia Valk sa und Clemens Blattert SJ aus Leipzig für ihren geschaffenen Zeitraum der Stille und dem damit verbundenen „Trommeln ins Leben“.

Ebenso möchte ich mich bei Marco Vogler und der gesamten Studentengemeinde bedanken, die mir immer wieder die nötige Ablenkung gaben, ich auch viel nicht-wissenschaftliches lernen konnte, mich auch selbst ausprobieren durfte und mir auch immer Kraft gaben weiterzumachen.

Ein besonders liebes Dankeschön gilt meiner kleinen Familie, Diana und Hanna, sowie meiner Mutti, Großeltern und allen anderen Familienangehörigen, die die ganze Zeit für mich da waren, mich unterstützt haben, mich auch in einigen Situationen ausgehalten haben und wenn es sein musste mich auch immer wieder aufgebaut und an mich geglaubt haben. Vielen Dank dafür!!!