

# Initiale Schritte der Faltung und Entfaltung von Barstar aus *Bacillus amyloliquefaciens*

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

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



von  
Hagen Hofmann  
geboren am 05.10.1978  
in Sangerhausen / Sachsen-Anhalt

Gutachter:

Prof. Renate Ulbrich-Hofmann

Prof. Jochen Balbach

Prof. Robert Seckler

Verteidigung der Arbeit am 16.07.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000014938**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014938>]

## Abkürzungen und Symbole

---

### Abkürzungen und Symbole

#### Abkürzungen

ACBP	Acyl-Coenzym A-Bindeprotein
ACN	Acetonitril
Amp	Ampicillin
A488	Alexa Fluor 488 C5
A594	Alexa Fluor 594 C5
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill Spinecho-Sequenz
Csp	Kälteschockprotein ( <i>cold shock protein</i> )
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Natriummethyldiamintetraacetat
FID	freier Induktionsabfall ( <i>free induction decay</i> )
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GdmCl	Guanidiniumchlorid
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
INEPT	<i>insensitive nuclei enhanced by polarization transfer</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LFE	lineare freie Enthalpie-Beziehung
NMR	Kernmagnetische Resonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pWT	Pseudowildtyp
pWT <sub>SS</sub>	Pseudowildtyp S12C/S89C
pWT <sub>SS</sub> <sup>DA</sup>	Pseudowildtyp S12C/S89C erst markiert mit A488 und dann mit A594
pWT <sub>SS</sub> <sup>AD</sup>	Pseudowildtyp S12C/S89C erst markiert mit A594 und dann mit A488
pWT <sub>S12</sub> <sup>D</sup>	Pseudowildtyp S12C markiert mit A488
pWT <sub>SS</sub> <sup>D</sup>	Pseudowildtyp S12C/S89C einfach-markiert mit A488
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung ( <i>small angle X-ray scattering</i> )

## Abkürzungen und Symbole

---

Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
WLC	<i>worm like chain model</i>

### Symbole

$H$	Enthalpie
$S$	Entropie
$G$	freie Enthalpie
$\Delta G^0$	Differenz der freien Standardenthalpie
$m_{eq}$	Kooperativität
$K_{eq}$	Gleichgewichtskonstante
$k_f$	Geschwindigkeitskonstante der Faltung
$k_u$	Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung
$k_{op}$	Geschwindigkeitskonstante der Öffnungsreaktion
$k_{cl}$	Geschwindigkeitskonstante der Schließreaktion
$k_{int}$	Geschwindigkeitskonstante des chemischen Austausches
$\lambda$	apparente Geschwindigkeitskonstante
$\tau$	Relaxationszeit
$k_B$	Boltzmannkonstante
$T$	Temperatur in Kelvin
$R$	ideale Gaskonstante
$\langle r^2 \rangle^{1/2}$	mittlerer End-zu-Endabstand
$R_G$	Gyrationsradius
$R_S$	hydrodynamischer Radius
$E$	Transfereffizienz
$\phi_d$	Quantenausbeute des Donors
$\phi_a$	Quantenausbeute des Akzeptors
$\varepsilon_a$	Extinktionskoeffizient des Akzeptors
$I_d$	Fluoreszenzintensität des Donors
$I_a$	Fluoreszenzintensität des Akzeptors
$\eta_d$	Detektoreffizienz im Donorkanal
$\eta_a$	Detektoreffizienz im Akzeptorkanal
$J$	Überlappungsintegral
$\varepsilon$	Dielektrizitätskonstante
$n$	Brechungsindex

## Abkürzungen und Symbole

---

$R_0$	Försterabstand
$\kappa^2$	Orientierungsfaktor
$M$	molare Masse
$L$	Kontourlänge
$l_p$	Persistenzlänge
$C_N$	charakteristisches Verhältnis
$W$	Coulomb-Energie
$e$	Elementarladung
$I$	Ionenstärke
$z$	Ladungszahl
$h$	Planck'sches Wirkungsquantum
$\nu$	Frequenz
$\omega$	Kreisfrequenz
$[\Theta]_{MRW}$	molare Elliptizität pro Aminosäurerest
$d$	optische Weglänge
$r$	Anisotropie
$R_1$	Geschwindigkeitskonstante der longitudinalen Relaxation
$R_2$	Geschwindigkeitskonstante der transversalen Relaxation

## Inhaltsverzeichnis

---

### **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Theorie</b> .....	3
2.1. Barstar als Modellprotein.....	3
2.2. Grundlagen der Proteinfaltung.....	7
2.2.1. Allgemeine Modelle zur Faltung von Proteinen.....	7
2.2.2. Experimentelle Analyse der Proteinfaltung.....	9
2.3. Der entfaltete Zustand.....	14
2.3.1. Modelle zur Beschreibung des entfalteten Zustandes.....	14
2.3.2. Skalierungsgesetze für entfaltete Proteine.....	16
2.3.3. Der Kollaps der entfalteten Polypeptidkette.....	18
2.4. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie.....	19
2.4.1. Fluoreszenz organischer Verbindungen.....	19
2.4.2. Photophysik: Das Drei-Zustandsmodell.....	20
2.4.3. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET).....	22
2.4.4. Fluoreszenz-Polarisation.....	24
2.5. Grundlagen der Einzelmolekülspektroskopie.....	27
2.6. Protonenaustausch und NMR-Spektroskopie.....	29
2.6.1. Amidprotonenaustausch.....	29
2.6.2. NMR-Spektroskopie.....	31
2.6.3. Die NMR-Zeitskala.....	31
2.6.4. Das HSQC-Spektrum.....	33
<b>3. Materialien und Methoden</b> .....	35
3.1. Materialien.....	35
3.1.1. Chemikalien.....	35
3.1.2. Molekularbiologische Enzyme und Reagenzien.....	36
3.1.3. Bakterienstämme, Plasmide und Primer.....	36
3.1.4. Reagenzien und Lösungen.....	37
3.1.5. Nährmedien.....	38
3.2. Methoden.....	39
3.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	39
3.2.2. Expression, Renaturierung und Reinigungsverlauf.....	39
3.2.2.1. Expression.....	39

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.2.2. Renaturierung.....	40
3.2.2.3. Reinigung.....	41
3.2.3. Fluoreszenzmarkierung der Variante pWT-S12C/S89C.....	41
3.2.4. Bestimmung der Kopplungsausbeuten.....	42
3.2.5. Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie.....	43
3.2.5.1. Aufnahme von Fluoreszenzspektren.....	43
3.2.5.2. Bestimmung der Quantenausbeuten.....	43
3.2.5.3. Fluoreszenz-Anisotropie.....	44
3.2.5.4. CD-Spektroskopie.....	45
3.2.6. Einzelmolekülspektroskopie.....	45
3.2.6.1. Instrument-Aufbau.....	45
3.2.6.2. Probenvorbereitung und Datenanalyse.....	46
3.2.7. NMR-Spektroskopie.....	47
3.2.7.1. Schneller Amidprotonenaustausch.....	47
3.2.7.2. Harnstoff-induzierte Übergangskurven mittels 2D <sup>15</sup> N-TROSY-HSQC-NMR.....	49
3.2.8. Denaturanz-induzierte Übergangskurven.....	49
3.2.9. pH-induzierte Übergangskurven.....	50
3.2.10 <i>Stopped-flow</i> -Fluoreszenzkinetik.....	51
3.2.10.1. Entfaltungskinetik in Harnstoff.....	51
3.2.10.2. Rückfaltungskinetik in Harnstoff.....	51
3.2.10.3. pH-induzierte Rückfaltungskinetik.....	51
<b>4. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>52</b>
4.1. Charakterisierung des entfalteten Zustandes von Barstar-pWT.....	52
4.1.1. Stabilität des Fluoreszenz-markierten Proteins pWT <sub>SS</sub> <sup>AD</sup> .....	52
4.1.2. Beweglichkeit beider Fluorophore.....	53
4.1.3. FRET-basierte Einzelmolekülspektroskopie mit pWT <sub>SS</sub> <sup>DA</sup> .....	55
4.1.4. FRET-Histogramme von pWT <sub>SS</sub> <sup>DA</sup> in Harnstoff und GdmCl.....	57
4.1.5. Vergleich der Stabilität aus Ensemble- und Einzelmolekül- experimenten.....	59
4.1.6. Der entfaltete Zustand von pWT <sub>SS</sub> <sup>DA</sup> in Harnstoff und GdmCl.....	61
4.1.7. Der Einfluss von KCl auf den entfalteten Zustand von pWT <sub>SS</sub> <sup>DA</sup> .....	64
4.1.8. Abschätzung der Coulom-Energie des entfalteten Zustandes.....	66
4.1.9. Die lineare Extrapolation bei pWT in GdmCl.....	69
4.1.10 Dynamik im entfalteten Zustand von pWT <sub>SS</sub> <sup>DA</sup> ?.....	71

## **Inhaltsverzeichnis**

---

4.2. Entfaltung von Barstar-pWT.....	74
4.2.1. Spektroskopische Charakterisierung von Barstar-pWT.....	74
4.2.2. Kinetische Analyse der Faltung und Entfaltung von pWT.....	76
4.2.3. Chevron-Diagramm für pWT.....	77
4.2.4. <i>burst</i> -Amplitude in der Entfaltung von Barstar-pWT.....	79
4.2.5. pH-Stabilität von Barstar-pWT.....	81
4.2.6. Amidprotonen-Austausch in Barstar-pWT.....	82
4.2.7. Austausch über den EX2-Mechanismus.....	83
4.2.8. Harnstoff-induzierte Übergangskurven mittels NMR.....	85
4.2.9. Die Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungs- und Schließreaktion.....	87
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>107</b>
<b>8. Publikationen, Poster und Tagungsbeiträge.....</b>	<b>114</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>116</b>

# 1. Einleitung

Die biologische Aktivität von Proteinen ist untrennbar mit ihrer dreidimensionalen Struktur verknüpft. Die enorme Vielfalt der von Proteinen ausgeführten Reaktionen, wie z.B. enzymatische Katalyse, Kontrolle von Genexpressionen, rezeptorvermittelte Signaltransduktion, basiert letztlich auf intermolekularen Wechselwirkungen. In grober Näherung können diese Interaktionen mit einem Schlüssel-Schloss-Prinzip verglichen werden. Allerdings sind im Falle von Makromolekülen, wie Proteinen, weder das Schloss noch der Schlüssel statisch, sondern in gewissen Grenzen flexibel. Neben der exakten dreidimensionalen Form ist also auch die Flexibilität der Proteinstruktur entscheidend für die biologische Funktion.

Seit dem Gelingen des Nachweises, dass die gesamte Information zur Bildung der Proteinstruktur in der Aminosäuresequenz enthalten ist (Anfinsen, 1973), stellt sich die Frage nach dem der Proteinfaltung zugrunde liegenden strukturbildenden Prinzip. Levinthal wies 1969 darauf hin, dass eine Polypeptidkette eine astronomische Zeit benötigen würde um ihre native, d.h. aktive Struktur zufällig zu erlangen (Levinthal, 1969). Seitdem stellte sich heraus, dass viele Proteine während der Faltung Zwischenstufen, d.h. partiell gefaltete Intermediate, durchlaufen (Schmid, 1983, Kuwajima *et al.*, 1985). Proteinfaltung ist demzufolge kein stochastischer Prozess sondern folgt vielmehr definierten Pfaden. Allerdings bleibt die Faltung vieler Proteine, bei denen keine Intermediate detektiert werden konnten (Zwei-Zustandsfalter), trotz einer Vielzahl von Modellen (Daggett & Fersht, 2003), noch weitgehend ungeklärt.

Neben dem aufgeführten Grundlagen-orientierten Aspekt, ist ein Verständnis des Faltungs- und vor allem des Entfaltungsvorganges von Proteinen von besonderer praktischer Bedeutung. So kann die Fehlfaltung eines Proteins zu schweren Krankheiten, wie z.B. Alzheimer oder

Parkinson, führen. Die Entwicklung effizienter Therapeutika ist demzufolge nur mit einem detaillierten Verständnis der physiko-chemischen Eigenschaften von Polypeptidketten im Allgemeinen, wie des Faltungsprozesses des jeweiligen Proteins im Besonderen, möglich.

Aufgrund ihrer hohen Regio- und Enantioselektivität finden Proteine, in diesem Fall Enzyme, in industriellen Herstellungsprozessen verbreitete Anwendung. Ein entscheidendes Kriterium für den industriellen Einsatz eines Proteins ist seine Stabilität, z.B. gegenüber hohen Temperaturen. In diesem Fall müssen der Faltungs- und Entfaltungsprozess des Proteins bekannt sein, um auf rationalem Wege effiziente Stabilisierungsstrategien entwickeln zu können.

Ein umfassendes Verständnis von Faltungs- und Entfaltungsprozessen ist allerdings nur dann möglich, wenn deren Verlauf auf atomarer Ebene mit hoher zeitlicher Auflösung experimentell zugänglich ist. Die Methode der NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*), insbesondere in Kombination mit einer Technik, die die Detektion schneller Amidprotonen-Austauschprozesse erlaubt (Gemmecker *et al.*, 1993), kann strukturelle Informationen über einzelne Aminosäure-Reste während der Faltung und Entfaltung von Proteinen liefern. Lokale Entfaltungsvorgänge sind über die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung eines Proteins mit atomarer Auflösung einer detaillierten Analyse zugänglich (Linderstrøm-Lang, 1955 und Hvidt, 1966). Allerdings besitzt die Methode der NMR-Spektroskopie den Nachteil, dass die mit ihr erhaltenen Informationen nur Mittelwerte über alle Moleküle der Probe darstellen.

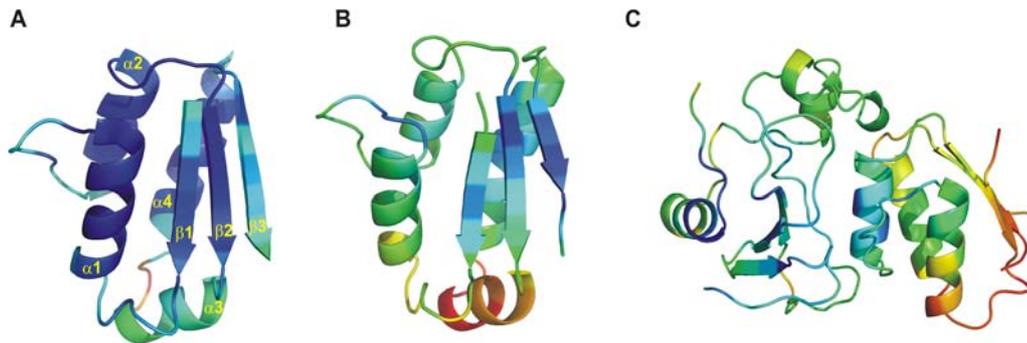
Im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie ermöglicht die Methode der Einzelmolekülspektroskopie die Analyse einzelner Moleküle. Selbst die geringen Anteile entfalteter Moleküle unter nativ-ähnlichen Bedingungen sind mittels Einzelmolekülspektroskopie somit einer Analyse zugänglich. Signale von Proteinmolekülen unterschiedlicher Konformation lassen sich damit voneinander separieren. Zusätzlich ermöglicht die Kombination dieser Technik mit Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) exakte Abstandsbestimmungen auf molekularer Ebene. Der entscheidende Nachteil der Einzelmolekülspektroskopie im Vergleich zur NMR-Spektroskopie ist jedoch, dass Informationen jeweils nur über einen einzigen Abstand erhalten werden können. NMR-Spektroskopie und Einzelmolekülspektroskopie liefern demzufolge komplementäre Informationen über Faltungs- und Entfaltungsprozesse bei Proteinen. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb beide Techniken kombiniert zum Einsatz kommen, um die initialen Schritte der Faltung und Entfaltung eines Modellproteins zu untersuchen.

An einer Variante des Proteins Barstar (10,2 kDa) (Nölting *et al.*, 1995) gelang es, die unter nativen Bedingungen in der entfalteten Polypeptidkette wirkenden Kräfte zu identifizieren. Weiterhin konnte ein während der Entfaltung des Proteins auftretendes Intermediat strukturell wie auch energetisch charakterisiert werden.

## 2. Theorie

### 2.1. Barstar als Modellprotein

Barstar ist der natürliche Inhibitor der Ribonuklease Barnase aus dem Organismus *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley, 1989). Das Protein besteht aus 89 Aminosäuren und besitzt eine molare Masse von 10,2 kDa. Die NMR-Struktur von Barstar (Lubliński *et al.*, 1994) wie auch die Röntgenkristallstruktur (Ratnaparkhi *et al.*, 1998) zeigen ein Ein-Domänenprotein bestehend aus 3 parallelen  $\beta$ -Faltblättern und vier  $\alpha$ -Helices (Abb. 2.1 A und B). Barstar besitzt zwei biologisch funktionale Cysteinreste in Position 40 und 82, die innerhalb der Zelle reduziert vorliegen. Im reduzierenden intrazellulären Milieu hat Barstar eine außergewöhnlich hohe Affinität zu Barnase (Abb. 2.1 C), wobei die Wechselwirkungen zwischen beiden Proteinen größtenteils elektrostatischer Natur sind. Negativ geladene Aminosäurereste binden in der positiv geladenen Bindungstasche von Barnase (Buckle *et al.*, 1994). Umfangreiche thermodynamische und kinetische Untersuchungen zur Interaktion von Barstar mit Barnase konnten in Kombination mit *protein engineering* die Energiebeiträge der an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren identifizieren (Frisch *et al.*, 1997; Schreiber und Fersht, 1993a; Schreiber und Fersht, 1995; Schreiber *et al.*, 1997). Im oxidierenden extrazellulären Milieu dagegen, werden die beiden Cysteine in Position 40 und 82 zu Cystin oxidiert, was eine verminderte Affinität von Barstar für Barnase zur Folge hat. Aus NMR-Relaxationsexperimenten konnte weiterhin geschlossen werden, dass die an der Interaktion mit Barnase beteiligte Region von Barstar relativ unflexibel ist (Sahu *et al.*, 2000a; Sahu *et al.*, 2000b).



**Abbildung 2.1. Raumstrukturen von Barstar und dem Barstar-Barnase Komplex.** (A) NMR-Struktur von Barstar-Wildtyp (Lublienski *et al.*, 1994; pdb-file 1bta). (B) Röntgenkristallstruktur der Variante Barstar-C82A (Ratnaparkhi *et al.*, 1998; pdb-file 1a19). (C) Röntgenkristall-Struktur des Barstar-Barnase-Komplexes (Vaughan *et al.*, 1999; pdb-file 1b27). Die Farbskala in A entspricht den rmsd-Werten der C<sub>α</sub>-Atome der NMR-Struktur. Die Strukturen in B und C wurden entsprechend der B-Faktoren der C<sub>α</sub>-Atome des Peptidrückgrates eingefärbt. Blau bedeutet niedriger rmsd-Wert bzw. B-Faktor und Rot bedeutet hoher rmsd-Wert bzw. B-Faktor.

Barstar enthält jeweils einen Prolinrest in Aminosäureposition 27 und 48. Die Peptidylprolyl-Bindung Leu26-Pro27 liegt im nativen Protein in einer *trans*-Konformation, die Bindung Tyr47-Pro48 dagegen in einer *cis*-Konformation vor. Beide Peptidylprolyl-Bindungen sind die Ursache für die Heterogenität des entfalteten Zustandes von Barstar. Abhängig vom Isomerisierungszustand beider Peptidylprolyl-Bindungen liegen im thermodynamischen Gleichgewicht vier entfaltete Spezies vor ( $U_{27cis}^{48cis}$ ,  $U_{27trans}^{48cis}$ ,  $U_{27cis}^{48trans}$ ,  $U_{27trans}^{48trans}$ ).

Zur Vereinfachung von Stabilitäts- und Faltungsstudien wurde die Variante C40A/C82A entwickelt. Dieses permanent aktive Protein wurde als pseudo-Wildtyp\* (pWT\*) bezeichnet (Schreiber und Fersht, 1993b). Eine weitere Variante (C40A/C82A, P27A) wurde für Temperatur-Relaxations-Experimente sowie zum Studium der *cis-trans*-Isomerisierung der Peptidylprolyl-Bindung Tyr47-Pro48 verwendet (Nölting *et al.*, 1995; Nölting *et al.*, 1997; Killick *et al.*, 1999). Diese Variante wird in der Literatur allgemein als pseudo-Wildtyp (pWT) bezeichnet und dient in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem. Strukturell konnten keine Unterschiede zwischen pseudo-Wildtyp\* und reduziertem Wildtyp festgestellt werden. Allerdings zeigen NMR-Relaxationsexperimente Unterschiede in der Dynamik des Peptidrückgrates zwischen der Variante C82A und dem Wildtyp (Ratnaparkhi *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu dem aus dem Originalorganismus isolierten Protein enthält das durch heterologe Genexpression im Wirtsorganismus *Escherichia coli* hergestellte Protein noch einen

zusätzlichen Methionylrest am N-Terminus (Met0). Das rekombinant hergestellte Protein zeigt jedoch keine Unterschiede in der Hemmwirkung auf Barnase sowie keine strukturellen Unterschiede im Vergleich zum natürlichen Protein (Mossakowska *et al.*, 1989).

Untersuchungen zur thermodynamischen Stabilität zeigen, dass Barstar bei pH 7 und 25°C nur eine relative geringe Stabilität von 20,5 kJ·mol<sup>-1</sup> (Wildtyp) aufweist (Shastry *et al.*, 1994). Bei pH 8 und 25°C wurde für pWT\* eine Stabilität von 20,2 kJ·mol<sup>-1</sup> (Schreiber und Fersht, 1993b) und für pWT eine Stabilität von 12,9 kJ·mol<sup>-1</sup> (Golbik *et al.*, 1999) gefunden. Aufgrund der geringen thermodynamischen Stabilität des Proteins kann Barstar auch durch niedrige Temperaturen ( $T < 273$ ) in Gegenwart geringer Konzentrationen an Denaturanzien entfaltet werden (*cold unfolding*) (Agashe und Udgaonkar, 1995). Dies konnte genutzt werden, um den entfalteten Zustand von pWT\* CD- und NMR-spektroskopisch zu untersuchen (Wong *et al.*, 1996; Nölting *et al.*, 1997). Innerhalb der entfalteten Polypeptidkette konnten labile helikale Strukturen nachgewiesen werden. Unterhalb des isoelektrischen Punktes des Proteins ( $pI = 4,9$ ) bildet sich ein *molten-globule* ähnlicher Zustand (*A-state*). Dieser Zustand bildet lösliche Aggregate bestehend aus 16 Monomeren (Juneja *et al.*, 2002) und kann zu höheren fibrillären Aggregaten polymerisieren (Gast *et al.*, 2003).

Erste kinetische Untersuchungen der Faltung von Barstar-Wildtyp und pWT\* zeigten aufgrund der durch die Prolinisomerisierung der Leu26-Pro27 und Tyr47-Pro48 Peptidylprolyl-Bindungen hervorgerufenen Heterogenität des entfalteten Zustandes zwei parallele Faltungswege (Shastry *et al.*, 1994; Schreiber und Fersht, 1993b). In beiden Studien wurden zwei Faltungsreaktionen mittels intrinsischer Tryptophanfluoreszenz detektiert. Startet die Faltungsreaktion ausgehend von einer Mischung aus *cis*- und *trans*-Isomeren im entfalteten Zustand, konnte ein nativ-ähnliches Faltungsintermediat ( $I_N$ ) nachgewiesen werden.  $I_N$  ist aktiv, d.h. in der Lage Barnase zu hemmen, und unterscheidet sich vom nativen Protein dadurch, dass die Bindung Tyr47-Pro48 in einer *trans*-Konformation vorliegt (Schreiber und Fersht, 1993b). Anhand der Variante pWT konnte gezeigt werden, dass die langsame Rückfaltungsreaktion durch die *cis/trans*-Peptidylprolylisomerase Cyclophilin 18 (Cyp 18) beschleunigt wird (Golbik *et al.*, 1999).

Eine umfassende Analyse der Faltung von Barstar-Wildtyp gibt ein komplexes Bild (Shastry und Udgaonkar, 1995). Der initiale Schritt der Faltung von Barstar ist ein hydrophober Kollaps der entfalteten Polypeptidkette (Agashe *et al.*, 1995a). Für die Faltung, ausgehend vom entfalteten Zustand mit der Tyr47-Pro48-Bindung in *trans*-Konformation ( $U_s$ ), wurden zwei parallele Faltungswege postuliert. Beide führen über getrennte Intermediate ( $I_{S1}$  und  $I_{S2}$ ). Allerdings wird nur auf dem Weg über  $I_{S1}$  auch  $I_N$  populiert. Aus ANS-Bindungsstudien wurde zusätzlich auf die Bildung von zwei *molten-globule*-ähnlichen Intermediaten geschlossen ( $I_{M1}$

und  $I_{M2}$ ). Indirekt konnte auch für die Faltungsreaktion ausgehend vom entfalteten Zustand mit der Peptidylprolylbindung Tyr47-Pro48 in der *cis*-Konformation, auf das Vorhandensein eines Intermediates ( $I_F$ ) geschlossen werden. Eine nähere Charakterisierung von  $I_F$  gelang jedoch nicht (Shastry und Udgaonkar, 1995).

Hochaufgelöste Informationen über den Faltungsprozess von pWT konnten anhand von Temperatur-Relaxations-Experimenten in Kombination mit  $\Phi$ -Wert-Analysen gewonnen werden (Nölting *et al.* 1995; Nölting *et al.* 1997). Aus der  $\Phi$ -Wert-Analyse lässt sich folgern, dass innerhalb der ersten 1 bis 2 ms ein Nukleus, bestehend aus den Aminosäureresten des hydrophoben Kernes gebildet wird. Teile der  $\alpha$ -Helix 1 des Proteins werden ebenfalls in dieser ersten Faltungsreaktion gebildet. In einem zweiten Schritt bilden sich die weiteren Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helix 2,  $\alpha$ -Helix 4 und die  $\beta$ -Faltblätter.  $\alpha$ -Helix 3 bildet sich als letztes Sekundärstrukturelement.

Analog zur Faltung von Barstar verläuft auch die Entfaltung des Proteins über parallele Wege. So konnte mittels Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie für die Variante W38F/W44F gezeigt werden, dass während der Totzeit (1ms) des Experiments, Entfaltungsintermediate (*burst-phase intermediates*) populiert werden (Zaidi *et al.*, 1997). Aus diesen Experimenten wurden zwei parallele Entfaltungswege postuliert. Überdies geben zeitaufgelöste Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Studien (*time-resolved* FRET, *tr*FRET) der Entfaltung von Barstar Hinweise auf eine kontinuierliche Expansion des nativen Proteins bei Transfer in hohe Harnstoffkonzentrationen (Lakshmikanth *et al.*, 2001). In einer weiteren FRET-Studie konnte durch ortsgerichtete Markierung von cysteinhaltigen Varianten des Proteins die Entfaltungsreaktion ortsspezifisch verfolgt werden. Während die bekannte Entfaltungskinetik erhalten wurde, wenn Barstar W38F/W44F in Position 40 oder 82 markiert wurde, lieferte eine Markierung in Position 25 oder 62 eine zusätzliche schnelle Entfaltungsreaktion (Srivedi und Udgaonkar, 2003). Aus der Tatsache, dass die Positionen 40 und 82 weniger Oberflächen-exponiert sind als die Positionen 25 und 62, schlossen die Autoren, dass die Proteinoberfläche während der Entfaltung schneller expandiert, als der hydrophobe Kern (*hydrophobic core*) des Proteins solvatisiert wird (Srivedi und Udgaonkar, 2003).

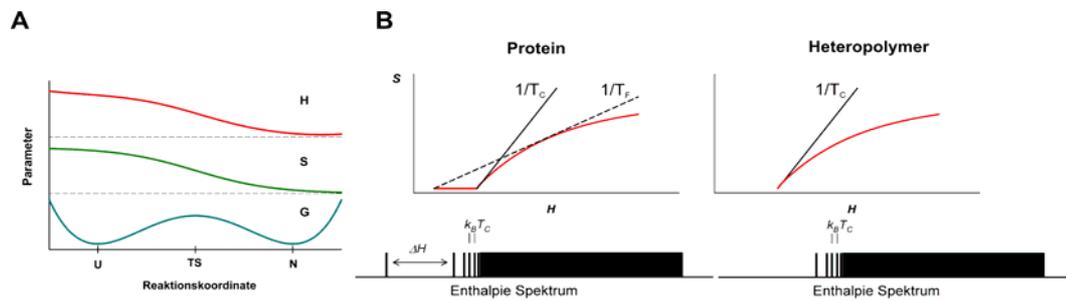
Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Faltungsreaktion von Barstar ein Kollaps der entfalteten Polypeptidkette vorgelagert ist (Sinha und Udgaonkar, 2005; Sinha und Udgaonkar, 2007). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Kollaps vom expandierten zum kollabierten Zustand einen Phasenübergang höherer Ordnung darstellt. Aus *tr*FRET-Experimenten ging hervor, dass sich die entfaltete Polypeptidkette in GdmCl und Harnstoff ähnlich verhält. Allerdings waren diese Experimente auf relativ hohe Denaturanzkonzentrationen beschränkt ( $> 3$  M GdmCl,  $> 5$  M Harnstoff) (Saxena *et al.*, 2006).

## 2.2. Grundlagen der Proteinfaltung

### 2.2.1. Allgemeine Modelle zur Faltung von Proteinen

Die Aufklärung der in Proteinen ausgebildeten Strukturen wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter hatte eine Vielzahl von Studien zur Thermodynamik und Kinetik ihrer Bildung zur Folge. So konnte Anfinsen zeigen, dass die globale dreidimensionale Struktur eines Proteins ohne eine spezielle biologische Maschinerie *in vitro* spontan ausgebildet wird (Anfinsen, 1973). Dieses Ergebnis war vor allem deshalb überraschend, da die zu dieser Zeit bekannten Kristallstrukturen zeigten, dass Proteine im Gegensatz zu DNA keine einfachen repetitiven Strukturen darstellen.

Eine Vielzahl von allgemeinen Modellen zur Faltung von Proteinen wurden seitdem aufgestellt. Basierend auf dem hierarchischen Aufbau von Proteinen, Primärstruktur-Sekundärstruktur-Tertiärstruktur, folgen manche Modelle dieser Hierarchie. So bilden sich im Rahmenmodell (*framework model*) zunächst Elemente der nativen Sekundärstruktur unabhängig von der Tertiärstruktur des Proteins (Fersht, 1999; Wedemeyer *et al.*, 2002). Durch Diffusion und Kollision dieser Sekundärstrukturen (*diffusion-collision model*) entsteht schließlich die native Tertiärstruktur. Das klassische Modell geht allerdings von der Bildung eines Nukleus aus. Dieser bestünde aus einigen in der Sequenz benachbarten Aminosäuren und könnte den Startpunkt für den Aufbau der Tertiärstruktur darstellen (*classic nucleation*) (Fersht, 1999). Dieses Modell wurde zum Nukleations-Kondensations-Modell (*nucleation condensation model*) erweitert (Fersht, 1999). Auch hier wird ein Nukleus als Startpunkt der Faltung angenommen. Allerdings ist dieser nicht auf einige benachbarte Aminosäuren beschränkt, sondern kann auch nichtlokale Kontakte beinhalten. Es wird angenommen, dass die Strukturbildung und die Stabilisierung des Nukleus konzertiert ablaufen. Basierend auf der besonderen Rolle des hydrophoben Effektes wurde das Modell des hydrophoben Kollaps entwickelt (*hydrophobic collapse model*) (Fersht, 1999). Laut diesem Modell kollabiert die Polypeptidkette zunächst zu einem dichten Knäuel, um hydrophobe Aminosäuren vom Lösungsmittel Wasser abzuschirmen. Nachfolgend bilden sich Sekundär- und Tertiärstrukturen. Schließlich geht ein weiteres Modell, das Puzzle-Modell (*jigsaw model*) davon aus, dass jedes Molekül auf individuellem Wege in den nativen Zustand faltet (Fersht, 1999; Harrison und Durbin, 1985). Einige der aufgeführten Modelle implizieren die Existenz von Zwischenstufen, d.h. teilgefalteten Intermediaten. Obwohl solche Intermediate tatsächlich für eine Vielzahl von Proteinen, wie RNaseA (Schmid, 1983), Lysozym (Kuwanajima *et al.*, 1985; Radford *et al.*, 1992; Chaffotte *et al.*, 1992; Kiefhaber *et al.*, 1995),  $\alpha$ -Lactalbumin (Kuwanajima *et al.*, 1985) und Barstar (Shastri und Udgaonkar, 1995)



**Abbildung 2.2. Schematische Darstellung der Energielandschaft der Proteinfaltung.** (A) Enthalpie ( $H$ ), Entropie ( $S$ ) und freie Enthalpie ( $G$ ) als Funktion der Reaktionskoordinate der Proteinfaltung im Falle fehlender Balance zwischen Enthalpie und Entropie. (B) Schematische Darstellung der Entropie als Funktion der Enthalpie sowie Enthalpiespektren für Proteine und unstrukturierte Heteropolymere. Die Schmelztemperatur des Proteins ist mit  $T_F$  und die Glasübergangstemperatur mit  $T_C$  bezeichnet. Die Enthalpie-Lücke (*energy gap*) zwischen der energetisch niedrigsten und der nächst höher liegenden Konformation des Proteins ist im Enthalpiespektrum als  $\Delta H$  angegeben (nach Finkelstein, 2002).

experimentell nachgewiesen werden konnten, ist aufgrund der geringen Informationen über die Struktur dieser Intermediate eine eindeutige Zuordnung zu einem der Modelle nicht möglich. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Intermediate, unter bestimmten Bedingungen, zu einer Beschleunigung der Faltungsreaktion führen (Wagner und Kiefhaber, 1999). Unklar bleibt jedoch, ob tatsächlich alle Moleküle eines Proteins einem festen, vorgegebenen Pfad folgen oder ob eine Vielzahl von mikroskopischen Wegen zum nativen Zustand existieren.

Eine Alternative zur konventionellen Betrachtung der Proteinfaltung als definierten Pfad über Intermediate entwickelte sich in den späten achtziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts. Darin wird der Faltungsprozess als diffusive Wanderung auf einer Energieoberfläche betrachtet (Bryngelson and Wolynes, 1987). Diese Betrachtungsweise ist dann hilfreich, wenn die Faltung über ein Ensemble mehrerer Strukturen erfolgt. In diesem Falle kann eine Beschreibung der Protein-Energielandschaft mit Mitteln der statistischen Mechanik genutzt werden. Die Energielandschaft der Proteinfaltung kann als eine Art Energie-Trichter (*funnel*) betrachtet werden (Dill, 1987; Dill und Chan, 1997; Leopold *et al.*, 1992; Zwanzig *et al.*, 1992; Bryngelson *et al.*, 1995; Chan und Dill, 1998). An dessen Ende wird die energieärmste Struktur, der native Zustand, erreicht. In den frühen Stadien der Faltung leitet der Trichter die Polypeptidkette effektiv zu energieärmeren Zuständen. Strukturell bedeutet dies, dass innerhalb der Polypeptidkette Interaktionen zwischen den einzelnen Aminosäuren ausgebildet werden. Allerdings ist neben der inneren Energie oder, bei konstantem Druck und konstanter Temperatur, der Enthalpie, auch die Entropie der Polypeptidkette für die Form des Trichters entscheidend. Intramolekulare Interaktionen sind zwar enthalpisch günstig, schränken aber die

Freiheitsgrade der Polypeptidkette ein und sind folglich entropisch ungünstig. Die Balance zwischen Enthalpie und Entropie bestimmt deshalb die Form des Trichters. Ist die Balance zwischen Enthalpie und Entropie nicht gegeben, so entsteht an dieser Stelle des Trichters eine Barriere. Diese kann als Pendant des klassischen Übergangszustandes betrachtet werden (Abb. 2.2. A). Prinzipiell ist diese Betrachtungsweise dem schon erwähnten Puzzle-Modell (*jigsaw model*) ähnlich. Die makroskopisch sichtbaren Intermediate würden dann erst am Ende des Faltungsprozesses signifikant populiert werden. Die konventionelle Betrachtungsweise der Faltung als diskreten Pfad über Intermediate stellt somit einen Grenzfall der allgemeineren Energie-Landschaft-Betrachtungsweise dar.

Vom chemischen Standpunkt aus gesehen, stellen Proteine eine besondere Form von Heteropolymeren, bestehend aus 20 Aminosäuren, dar. Für eine Kette bestehend aus  $N$  Aminosäuren gibt es also letztlich  $20^N$  mögliche Sequenzen. Von diesen  $20^N$  Sequenzen besitzt tatsächlich nur ein Bruchteil eine thermodynamisch günstige eindeutige native Struktur. Diese Sequenzen werden als thermodynamisch faltbare Sequenzen bezeichnet (Onuchic *et al.*, 1997). Ein grundlegender Unterschied zwischen Proteinen und zufälligen Heteropolymeren besteht in der Toleranz von Proteinen gegenüber Änderungen der physiko-chemischen Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert und Zusammensetzung des Lösungsmittels. Dies wird deutlich wenn die Entropie der Polypeptidkette gegen deren innere Energie oder, bei konstantem Druck und Temperatur, gegen deren Enthalpie aufgetragen wird (Abb. 2.2. B). Während zwischen der nativen Konformation eines Proteins und allen weiteren Konformationen keine Zwischenstufen existieren (*energy gap*), weisen zufällige Heteropolymere ein kontinuierliches Enthalpiespektrum auf (Abb. 2.2. B). Experimentell bedeutet dies, dass Proteine in einem Alles-oder-Nichts-Prozess bei der Temperatur  $T_F$  denaturieren, d.h. das Protein ist entweder aktiv oder inaktiv (Finkelstein und Ptitsyn, 2002). Dagegen werden die Konformationen von Heteropolymeren unterhalb der so genannten Glasübergangstemperatur  $T_C$  nur eingefroren, ohne dass die Kette eine definierte Struktur ausbildet.

Da Proteine auch innerhalb einer biologisch sinnvollen Zeit falten müssen, wird die Zahl funktionaler Sequenzen zusätzlich eingeschränkt. Proteine müssen nicht nur thermodynamisch, sondern auch kinetisch faltbar sein.

### 2.2.2. Experimentelle Analyse der Proteinfaltung

Trotz ihrer Komplexität lassen sich Proteinfaltungsreaktionen oft durch sehr einfache Reaktionsmodelle beschreiben. Grundsätzlich wird angenommen, dass der Faltungsmechanismus eine endliche Anzahl kinetischer Spezies umfasst. Diese müssen sich durch

Energiebarrieren, die signifikant größer als die thermische Energie ( $> 5k_B T$ ) sind, voneinander unterscheiden, um als beobachtbare Zustände gelten zu können (Bieri und Kiefhaber, 2000). Die kinetischen Spezies werden als homogene Zustände im Sinne der Thermodynamik angenommen. Basierend auf diesen Annahmen können die Übergänge von einer kinetischen Spezies ( $X_i$ ) zur nächsten ( $X_j$ ) durch mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{ij}$  und  $k_{ji}$ ) mit



beschrieben werden. Die Übergänge von einer zur anderen kinetischen Spezies sind Reaktionen 1. Ordnung weshalb die zeitabhängige Änderung von Messgrößen (Observablen) wie Fluoreszenzintensität, Absorption oder Aktivität als Summe von Exponentialfunktionen dargestellt werden können:

$$P_t - P_\infty = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\lambda_i t} \quad [2.2]$$

In [2.2] ist  $P_t$  das Messsignal zur Zeit  $t$  und  $P_\infty$  das Signal nach Ablauf der Reaktion. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $\lambda_i$  wie auch die Amplituden  $A_i$  sind Funktionen der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten. Für die Werte der Amplituden sind zusätzlich noch die Anfangsbedingungen entscheidend. Allgemein gilt, dass ein kinetischer Mechanismus mit  $n$  kinetischen Spezies zu  $n-1$  apparenten Geschwindigkeitskonstanten führt.

Mehr als 20 bekannte Proteine falten nach dem lt. [2.1] einfachsten Schema, dem Zwei-Zustandsmodell (Jackson, 1998):



In [2.3] existiert das Protein nur in zwei möglichen Konformationszuständen, dem nativen Zustand ( $N$ ) und dem entfalteten Zustand ( $U$ ). Die Faltung und Entfaltung wird durch die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten  $k_f$  und  $k_u$  charakterisiert. Die apparente Geschwindigkeitskonstante  $\lambda$  ist für dieses Modell

$$\lambda = k_f + k_u \quad [2.4]$$

Das Gleichgewicht (*equilibrium*) der Reaktion ist erreicht wenn die Geschwindigkeit der Faltungsreaktion gleich der Geschwindigkeit der Entfaltungsreaktion ist, d.h.

$$k_f [U]_{eq} = k_u [N]_{eq} \quad [2.5]$$

Durch [2.5] ist die Gleichgewichtskonstante des Modelles durch

$$K_{eq} = \frac{[N]_{eq}}{[U]_{eq}} = \frac{k_f}{k_u} \quad [2.6]$$

definiert. Die Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  ist über die van't Hoff-Beziehung mit der Differenz der freien Enthalpie ( $\Delta G^0$ ) zwischen nativem ( $N$ ) und entfaltetem Zustand ( $U$ ) durch

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} = -RT \ln \left( \frac{[N]_{eq}}{[U]_{eq}} \right) = -RT \ln \left( \frac{k_f}{k_u} \right) . \quad [2.7]$$

verknüpft.  $\Delta G^0$  wird auch als thermodynamische Stabilität des Proteins bezeichnet. Im Folgenden wird stets die thermodynamische Stabilität unter nativen Bedingungen angegeben und als Stabilität bezeichnet. Aus [2.7] wird ersichtlich, dass die Stabilität des Proteins sowohl aus kinetischen Experimenten, durch die Bestimmung von  $k_f$  und  $k_u$ , wie auch aus Experimenten im thermodynamischen Gleichgewicht, durch Bestimmung von  $[N]_{eq}$  und  $[U]_{eq}$ , ermittelt werden kann.

Experimentell erfolgt die Bestimmung von  $\Delta G^0$  durch Entfalten der Proteine mittels chemischer Denaturanzien wie Guanidiniumchlorid (GdmCl) und Harnstoff. Empirisch wurde gefunden, dass  $\Delta G^0$  linear von der Denaturanzkonzentration  $[D]$  abhängt,

$$\Delta G^0 = \Delta G^0(H_2O) + m_{eq}[D] . \quad [2.8]$$

Der Parameter  $m_{eq}$  wird als Kooperativität bezeichnet und korreliert mit der Differenz der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface area*, SASA) zwischen nativem und entfaltetem Protein (Myers *et al.*, 1995). Ähnliche Beziehungen (lineare-freie-Enthalpie-Beziehungen, LFE) gelten für die logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten

$$\ln k_f = \ln k_f^0 + m_f^\ddagger [D] \quad [2.9]$$

$$\ln k_u = \ln k_u^0 + m_u^\ddagger [D] \quad [2.10]$$

mit

$$m_{eq} = m_u^\ddagger - m_f^\ddagger . \quad [2.11]$$

In [2.9] und [2.10] sind  $k_f^0$  und  $k_u^0$  die Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung in Abwesenheit von Denaturanz.

Proteine, die makroskopisch detektierbare Intermediate aufweisen, werden durch das Zwei-Zustandsmodell nicht adäquat beschrieben. In solchen Fällen kann das in [2.3] skizzierte Modell um partiell gefaltete Intermediate ( $I$ ) erweitert werden (Ikai und Tanford, 1973).

Die vorgestellten chemischen Modelle beruhen auf dem Konzept des Übergangszustandes. Die Theorie des Übergangszustandes (*transition-state-theory*, TST) verknüpft die mikroskopische

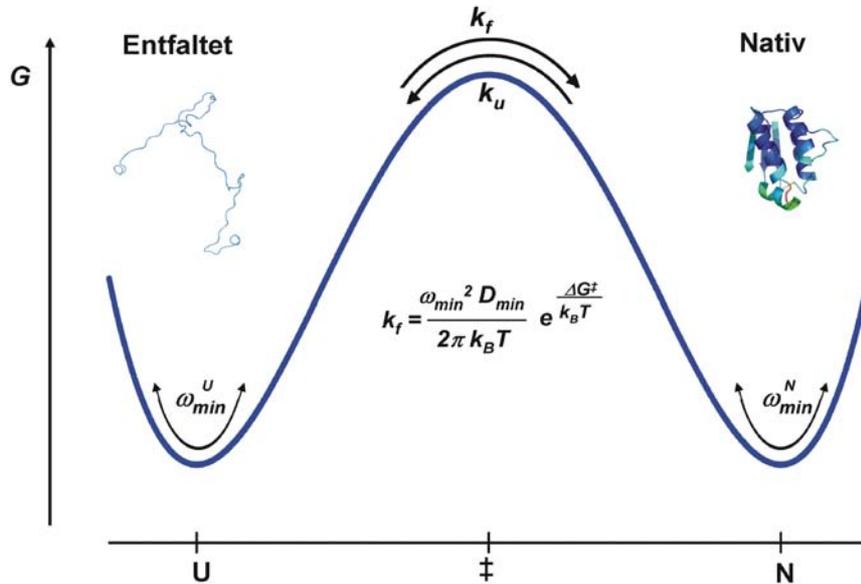


Abbildung 2.3. Schematische Darstellung der freien Reaktionsenthalpie der Proteinfaltung im Rahmen der Kramer'schen Reaktionstheorie.

Geschwindigkeitskonstante  $k$  mit der freien Aktivierungsenthalpie ( $\Delta G^\ddagger$ ) über

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad [2.12]$$

In [2.12] ist  $\kappa$  der Transmissionskoeffizient der maximal einen Wert von 1 erreichen kann. In dichten Medien, z.B. in Lösungen, ist  $\kappa < 1$ . Ursprünglich wurde die TST für einfache Gasphasenreaktionen entwickelt (Eyring, 1935), weshalb der Transmissionsfaktor eine *ad hoc* eingeführte Größe ist. Außerdem wurde für die Herleitung von [2.12] ein unrealistisches quasi-Gleichgewicht zwischen Grund- und Übergangszustand angenommen. Eine Erweiterung der konventionellen TST wurde 1940 von Kramer vorgenommen (Kramer, 1940). Kramer betrachtete ein Partikel in einem Energieminimum, das durch eine Potentialbarriere von einem zweiten Minimum getrennt ist (Abb. 2.3). Er formulierte eine der TST ähnliche Gleichung, um die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion mit der Höhe der Potentialbarriere zu verknüpfen, berücksichtigte dabei jedoch das das Partikel umgebende Medium. Im Gegensatz zur TST wurden keine zusätzlichen Annahmen gemacht. In

$$k = \frac{\omega_{min} \omega_{max} D_{max}}{2\pi k_B T} e^{-\frac{\Delta G^{\ddagger 0}}{k_B T}} = k_0 e^{-\frac{\Delta G^{\ddagger 0}}{k_B T}} \quad [2.13]$$

sind  $\omega_{min}$  und  $\omega_{max}$  Frequenzen, die die Krümmung der Potentialoberfläche im Minimum und im

Maximum, dem Übergangszustand, beschreiben.  $D_{max}$  ist der Diffusionskoeffizient im Übergangszustand. Die durch  $D_{max}$  implizit vorhandene Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante von der Viskosität des Lösungsmittels wurde auch experimentell nachgewiesen (Hagen *et al.*, 1996; Jacob *et al.*, 1999; Perl *et al.*, 2002; Neuweiler *et al.*, 2007 Pradeep und Udgaonkar, 2007). Allerdings bestimmt im Falle von Proteinfaltungsreaktionen nicht nur die Viskosität des Lösungsmittels, sondern auch die Reibung innerhalb der Polypeptidkette, d.h. die intrinsische Viskosität, die Geschwindigkeitskonstante. Um eine möglichst realistische Abschätzung der Potentialbarriere einer Faltungsreaktion zu erreichen wurde versucht den präexponentiellen Faktor in Gleichung [2.12] bzw. [2.13] zu bestimmen. Erste Experimente mittels FRET durch Haas und Mitarbeiter (Haas *et al.*, 1978) lieferten die Relaxationszeiten der Relativbewegung von Donor-Fluorophoren zu Akzeptor-Fluorophoren in kurzen Peptiden. Sie erhielten Diffusionskoeffizienten von  $2.6 \cdot 10^7$  bis  $6.4 \cdot 10^7$   $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$  was Relaxationszeiten im Bereich von 3 bis 9 ns entspricht. Durch Bieri *et al.* (1999) wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Kontaktbildung innerhalb von kurzen unstrukturierten Glycin-haltigen Peptidketten (3 Peptidbindungen) durch Messung des Triplett-Triplett-Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren zu 10-20 ns bestimmt. Erste Aussagen über die intrinsische Dynamik einer entfalteten Polypeptidkette unter verschiedenen Lösungsmittelbedingungen konnten durch Nettels *et al.* (2007) getroffen werden. Für das Kälteschockprotein (*cold shock protein*, Csp) aus *Thermotoga maritima* CspTm wurden mittels FRET-gekoppelter Einzelmolekülspektroskopie Relaxationszeiten der intrinsischen Dynamik der entfalteten Kette von 20 ns bis 60 ns gefunden. Unter der Annahme, dass  $\omega_{min} = \omega_{max}$  sowie  $D_{max} = D_{min}$ , ist der präexponentielle Faktor durch (Abb.2.3)

$$k_0 \approx \frac{\omega_{min}^2 D_{min}}{2 \pi k_B T} \quad [2.14]$$

gegeben. Für CspTm konnte  $k_0$  zu  $2,5 \cdot 10^6$   $\text{s}^{-1}$  bestimmt werden. Zuverlässige Werte des präexponentiellen Faktors für Entfaltungsreaktionen sind bisher nicht bekannt. Sicher ist jedoch, dass die Dynamik des nativen Zustandes zum großen Teil von der intrinsischen Viskosität der gefalteten Polypeptidkette bestimmt wird. Eine Abschätzung unter Nutzung der für Myoglobin bestimmten intrinsischen Viskosität von 4.1 cP ergibt einen präexponentiellen Faktor von  $2 \cdot 10^7$   $\text{s}^{-1}$  (Ansari *et al.*, 1992; Bieri *et al.*, 1999; Bieri und Kiefhaber, 2000). Anhand der Kramer'schen Reaktionstheorie wird deutlich, dass eine exakte Berechnung der freien Aktivierungsenthalpien von Faltungsreaktionen eine genaue Kenntnis der Dynamik des entfalteten Zustandes voraussetzt. Im Folgenden soll deshalb auf die Physik entfalteter Polypeptidketten näher eingegangen werden.

## 2.3. Der entfaltete Zustand

### 2.3.1. Modelle zur Beschreibung des entfalteten Zustandes

Viele Polymere können in erster Näherung als strukturloses Zufallsknäuel (*random coil*) behandelt werden kann. Ob diese Näherung im Falle entfalteter Proteine erlaubt ist, ist Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht restlos geklärt, da für einige Proteine im entfalteten Zustand nativ-ähnliche Reststrukturen nachgewiesen werden konnten (Neri *et al.*, 1992; Shortle und Ackerman, 2001; Klein-Seetharaman *et al.*, 2002). Streng genommen ist die Annahme eines Zufallsknäuels für solche Proteine demnach nicht gerechtfertigt. Allerdings zeigte sich, dass das Vorhandensein rudimentärer Sekundärstrukturen in entfaltenen Proteinen nicht notwendigerweise zu Abweichungen vom globalen Verhalten eines Zufallsknäuels führen muss (Wang *et al.*, 2007). Generell gelten die im Folgenden vorgestellten Modelle jedoch nur für unverzweigte Polymere. Für Proteine deren Polypeptidkette durch Disulfidbrücken verbrückt ist, sind diese Modelle nicht anwendbar.

Das Ziel von Polymermodellen besteht in der Berechnung der Verteilungsfunktion für die End-zu-Endabstände eines Polymeres gegebener Länge. Ein einfaches Modell zur Beschreibung ungeordneter Polymere ist das Gauss'sche Zufallsknäuel (*Gaussian chain model* oder auch *random flight model*). Im Gauss'schen Zufallsknäuel wird ein Polymer, bestehend aus  $N+1$  Monomeren und  $N$  Bindungen, als Sequenz von  $N$  Vektoren mit der Länge  $b$  aufgefasst. Jeder Vektor repräsentiert eine chemische Bindung. Die gestreckte Polymerkette hat damit die Kontourlänge

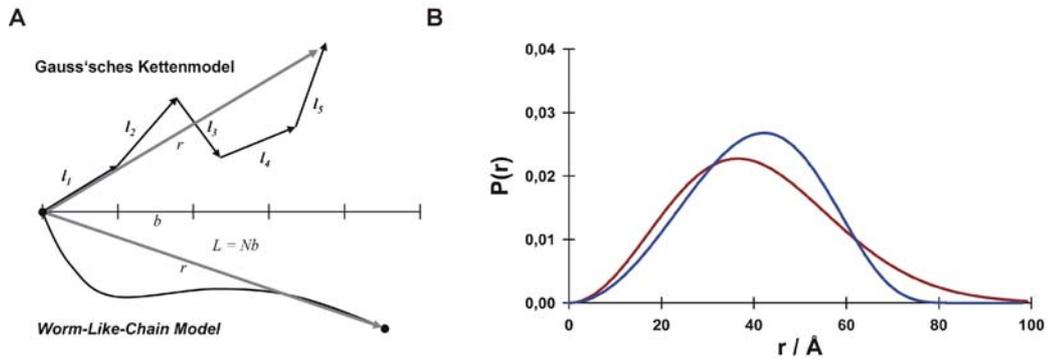
$$L = N \cdot b \quad . \quad [2.15]$$

Der End-zu-End-Abstand ist der Betrag des Vektors der das erste mit dem letzten Monomer verbindet. Im Gegensatz zur Kontourlänge ist der End-zu-End-Abstand von der Konformation der Kette abhängig. Der End-zu-End-Vektor ist die Summe der Bindungsvektoren (Abb.2.4. A),

$$\vec{r} = \sum_{i=1}^N \vec{l}_i \quad . \quad [2.16]$$

Als charakteristisches Maß der Polymerkette wird der mittlere quadrierte End-zu-End-Abstand (*mean-square end-to-end distance, msd*)

$$\langle r^2 \rangle = N \cdot b^2 \quad [2.17]$$



**Abbildung 2.4. Vergleich zwischen Gauss'schem Zufallsknäuel und WLC-Modell.** (A) Schematische Darstellung beider Modelle. (B) Verteilungsfunktionen  $P(r)$  der End-zu-End-Abstände für das Gauss'sche Zufallsknäuel (Rot) und das WLC-Modell (Blau). Als Parameter wurden für das Gauss'sche Zufallsknäuel [2.20]  $b = 1 \text{\AA}$ ,  $N = 100$ ,  $C_N = 20$  und für das WLC-Modell [2.22]  $L = 100 \text{\AA}$ ,  $l_p = 10 \text{\AA}$  verwendet. Beide Parametersätze resultieren in  $\langle r^2 \rangle = 2000 \text{\AA}^2$ .

oder die Wurzel aus dem mittleren quadrierten End-zu-End-Abstand (*root-mean-square end-to-end distance*, rmsd)

$$\langle r^2 \rangle^{1/2} = N^{1/2} \cdot b \quad . \quad [2.18]$$

angegeben. Eine wichtige Konsequenz des Gauss'schen Zufallsknäuels ist, dass der rmsd-Wert der Kette proportional zur Wurzel aus der Anzahl der Monomere ansteigt. [2.18] wird auch als Skalierungsgesetz (*scaling law*) bezeichnet.

In realen Polymeren sind die Richtungen der Vektoren der aufeinander folgenden chemischen Bindungen häufig miteinander korreliert. Dies gibt der Kette eine gewisse Steifheit (*chain stiffness*). Korrelationen zwischen benachbarten Bindungsvektoren werden durch die Einführung eines weiteren Parameters, dem charakteristischen Verhältnis ( $C_N$ ), berücksichtigt (Brant und Flory, 1965a und 1965b). Gleichung [2.17] wird dann zu

$$\langle r^2 \rangle = C_N \cdot N \cdot b^2 \quad . \quad [2.19]$$

Für hinreichend lange Polyalanine wurde von Flory  $C_N = 8$  berechnet während Polyproline  $C_N > 20$  zeigen und damit eine hohe Steifheit der Kette aufweisen (Schimmel und Flory, 1967). Erste experimentelle Bestimmungen von  $C_N$  für Polypeptidketten gelangen anhand von Messungen des hydrodynamischen Radius von Polyglutamat verschiedener Kettenlänge und lieferten eine charakteristische Rate von  $C_N = 8,8$  (Brant und Flory, 1965b). Für entfaltete Polypeptidketten können bei hohen Denaturanzkonzentrationen Werte für  $C_N$  zwischen 4 und 5

erhalten werden (Hoffmann *et al.*, 2007; Sherman und Haran, 2006). Die Verteilungsfunktion für das Gauss'sche Zufallsknäuel ist durch

$$P(r) = 4\pi r^2 \left( \frac{3}{2\pi \langle r^2 \rangle} \right)^{3/2} \exp\left( -\frac{3r^2}{2\langle r^2 \rangle} \right) \quad [2.20]$$

definiert (Abb. 2.4. A und B).

Das Gauss'sche Zufallsknäuel ist vor allem auf flexible Polymere, zu denen auch entfaltete Polypeptidketten zählen, anwendbar. Eine Beschreibung der Eigenschaften von steifen Polymeren wie z.B. doppelsträngiger DNA (dsDNA) ist damit jedoch nicht möglich. Kratky und Porod entwickelten 1949 ein allgemeineres Modell, das *worm-like chain model* (WLC) (Abb. 2.2 A und B). Im WLC werden die Eigenschaften des Polymers durch die Persistenzlänge  $l_p$  beschrieben. Ähnlich  $C_N$  ist  $l_p$  ein Maß für die Korrelationen zwischen aufeinander folgenden Bindungsvektoren. Der mittlere quadrierte End-zu-End-Abstand ist im WLC durch

$$\langle r^2 \rangle = 2l_p L \quad [2.21]$$

charakterisiert. Im Gegensatz zum Gauss'schen Kettenmodell wird die Polymerkette im WLC-Modell als kontinuierlich, d.h. mit den Grenzwerten  $b \rightarrow 0$  und  $N \rightarrow \infty$ , approximiert (Abb. 2.4. A). Die exakte Verteilungsfunktion  $P(r)$  ist für das WLC-Modell nicht bekannt. Jedoch konnte eine Näherung (Abb. 2.4 B) erfolgreich zur Beschreibung der End-zu-End-Abstände einzelstängiger DNA (ssDNA) genutzt werden (Murphy *et al.*, 2004). Sie lautet

$$P(r) = \frac{4\pi A R^2}{(1-R^2)^{9/2}} \exp\left( -\frac{3t}{4(1-R^2)} \right) \quad [2.22]$$

mit  $t = L/l_p$  und  $R = r/L$ .  $A$  ist eine Normierungskonstante.

### 2.3.2. Skalierungsgesetze für entfaltete Proteine

Laut [2.18] steigt  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$  mit  $N^{1/2}$  an. Allerdings wird in dem Modell nicht berücksichtigt, dass sich zwei Monomere der Kette nicht an ein und demselben Ort im Raum befinden können. Diese sterische Einschränkung wird auch als Ausschlussvolumen-Effekt (*excluded volume effect*) bezeichnet. Unter Berücksichtigung des Ausschlussvolumens sollte  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$  mit  $N^{3/5}$  ansteigen (Flory, 1969). Anhand von Messungen des Gyrationradius ( $R_G$ ) von entfalteten Proteinen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (*small angle X-ray scattering*, SAXS) kann

experimentell die Abhängigkeit des rmsd-Wertes von der Anzahl der Aminosäurereste bestimmt werden. Für eine Gauss'sche Kette gilt

$$R_G = \frac{\langle r^2 \rangle^{1/2}}{\sqrt{6}} \quad . \quad [2.23]$$

Die Abhängigkeit des Gyrationradius von der Anzahl der Aminosäurereste sollte empirisch durch

$$R_G = R_G^0 N^\nu \quad [2.24]$$

beschreibbar sein. Aus SAXS-Daten von 12 in 6 M GdmCl entfalten Proteinen erhielten Damaschun *et al.*  $R_G^0 = 4,4 \pm 0,3 \text{ \AA}$  und  $\nu = 0,5 \pm 0,02$  (Damaschun *et al.*, 1998). Kohn *et al.* bestimmten den Gyrationradius für 28 Proteine unter denaturierenden Bedingungen mittels SAXS (Kohn *et al.*, 2004). Eine eigene Analyse dieser Daten lieferte  $R_G^0 = 1,93 \pm 0,023 \text{ \AA}$  und  $\nu = 0,597 \pm 0,014$ . Während der aus den Daten von Kohn *et al.* bestimmte Exponent gut mit dem erwarteten Wert von  $3/5$  (0,6) übereinstimmt, weicht der von Damaschun *et al.* bestimmte Wert von 0,5 signifikant von diesem ab. In Übereinstimmung mit Kohn *et al.* ermittelte Goldenberg aus Monte-Carlo-Simulationen von Peptiden unterschiedlicher Länge einen Exponenten von 0,583 (Goldenberg, 2003). Eine zu [2.24] analoge Gleichung lässt sich auch für den hydrodynamischen Radius einer Polymerkette angeben. Bei Nutzung des hydrodynamischen Radius erhielt Zhou  $\nu = 0,522$  (Zhou *et al.*, 2002). Offensichtlich bestehen einige Unsicherheiten in der korrekten Bestimmung des Exponenten  $\nu$  für entfaltete Polypeptidketten. Die Ursache für die Diskrepanzen zwischen dem berechneten Wert und den experimentell bestimmten Werten für  $\nu$  könnte daran liegen, dass der von Flory theoretisch ermittelte Wert von  $3/5$  streng genommen nur für  $\Theta$ -Bedingungen gilt. Darunter versteht man Bedingungen, unter denen sich die Polypeptidkette wie eine ideale Kette verhält. Sterische Einschränkungen (*excluded volume*) sowie intramolekulare Interaktionen zwischen den Monomeren sind exakt ausgeglichen. Ob und in welchem Maße diese Bedingungen bei hohen Denaturanzkonzentrationen erfüllt sind, ist noch Gegenstand von Diskussionen (Miller *et al.*, 1967; Krieger *et al.*, 2003). Ist die exakte  $\Theta$ -Bedingung für eine Polypeptidkette von deren Aminosäuresequenz abhängig, könnte dies eine Erklärung für die Diskrepanzen zwischen den experimentell bestimmten Exponenten von Gleichung [2.24] sein.

### 2.3.3. Der Kollaps der entfalteten Polypeptidkette

Der Gyrationradius eines Polymers nimmt ab, wenn es von einem "guten" in ein "schlechtes" Lösungsmittel (*good solvent* und *poor solvent*) überführt wird. Die Begriffe "gut" und "schlecht" beziehen sich auf die Fähigkeit des Lösungsmittels, Interaktionen mit dem Polymer einzugehen. Hohe Konzentrationen von GdmCl oder Harnstoff solvatisieren hydrophobe Reste, können direkt an Polypeptidketten binden (Makhadate und Privalov, 1992) und sind deshalb "gute" Lösungsmittel. Unter solchen Bedingungen liegt die Polypeptidkette in einer expandierten Form vor und kommt dem Verhalten einer idealen Kette nahe ( $\Theta$ -Bedingung). Wird die Denaturanzkonzentration gesenkt, werden intramolekulare Interaktionen wieder möglich und der Gyrationradius nimmt ab. Dieser Prozess wird auch als Kollaps der Polypeptidkette bezeichnet.

Modelle zur Beschreibung des Kollaps von Homopolymeren sagen für flexible Ketten einen Phasenübergang 2. Ordnung, voraus (Chan und Dill, 1991). Bei hoher Kettensteifheit existiert jedoch laut dem Modell eine Energiebarriere zwischen dem kollabierten und expandierten Zustand und der Übergang zwischen beiden ähnelt einem Phasenübergang 1. Ordnung (Chan und Dill, 1991).

Für Polypeptidketten wurde der Kollaps experimentell anhand von Amplitudenverlusten innerhalb der Totzeit bei Proteinfaltungsreaktionen vermutet (Park *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2005; Jinsong *et al.*, 2007). Erste direkte Beobachtungen des Kollaps in entfalteten Proteinen gelang mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie für die Proteine Chymotrypsininhibitor 2 (CI2) (Deniz *et al.*, 2000) und Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima* (CspTm) (Schuler *et al.*, 2002). Die Möglichkeit, anhand von FRET direkt zwischen nativen und entfalteten Proteinmolekülen zu unterscheiden, erlaubte die Bestimmung des Gyrationradius der entfalteten Polypeptidkette bis zu sehr geringen Denaturanzkonzentrationen. Seitdem wurde der Kollaps der entfalteten Polypeptidkette auch für Protein L (Sherman und Haran, 2006), Im9 (Tezuka-Kawakami *et al.*, 2006), RNaseH (Kuzmenkina *et al.*, 2005), ACBP (Laurence *et al.*, 2005) und Sup35 (Mukhopadhyay *et al.*, 2007) beobachtet. Die in diesen Studien gefundene nicht-kooperative Abnahme des Gyrationradius läßt auf einen kontinuierlichen Phasenübergang 2. Ordnung schließen. Unklar ist jedoch, ob im kollabierten Zustand schon signifikante Sekundärstrukturen vorhanden sind. Erste Untersuchungen zu dieser Fragestellung an CspTm scheinen dies nicht zu bestätigen (Hoffmann *et al.*, 2007).

## 2.4. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

### 2.4.1. Fluoreszenz organischer Verbindungen

Lumineszenz ist die Emission elektromagnetischer Strahlung aus elektronisch angeregten Molekül-Zuständen. In Abhängigkeit der Spin-Orientierung der Elektronen im angeregten Zustand lassen sich zwei Typen von Lumineszenzen unterscheiden. Hat das Elektron eine Spin-Orientierung die dem Elektron des energetisch niedriger liegenden Orbitals entgegengesetzt ist, so spricht man von Fluoreszenz. Die Rückkehr in den Grundzustand ist ohne Spin-Umkehr möglich und daher quantenmechanisch erlaubt. Typischer Weise haben solche angeregten Singulett-Zustände Lebensdauern im Bereich von  $10^{-9}$  -  $10^{-8}$  s. Im Gegensatz dazu besitzt das Elektron in Triplett-Zuständen dieselbe Spinorientierung wie im Grundzustand. Die Emission von Licht aus einem solchen Triplett-Zustand wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Im Gegensatz zu Singulett-Zuständen sind Triplett-Zustände oft langlebig mit Lebensdauern im Bereich von  $10^{-5}$  -  $1$  s<sup>-1</sup>.

Fluoreszenz wird meist bei chemischen Verbindungen mit delokalisierten Elektronen, wie z.B. in konjugierten  $\pi$ -Orbitalen, beobachtet. Die Anregung, d.h. der Übergang eines Elektrons vom Grundzustand zum angeregten Zustand wird als Absorption bezeichnet und erfolgt typischerweise innerhalb von Femtosekunden. Jedes Energieniveau eines Fluorophors spaltet sich aufgrund von Molekülschwingungen noch in mehrere Schwingungsniveaus auf. Da die thermische Energie nicht ausreicht, um Übergänge in höhere Schwingungsniveaus anzuregen, erfolgt die Absorption immer aus dem energetisch niedrigsten Schwingungsniveau des Grundzustandes. Wird ein Fluorophor angeregt, werden auch höhere Schwingungsniveaus des angeregten Zustandes populierte, die jedoch schnell (1 ps) und strahlungslos in den Schwingungs-Grundzustand des angeregten Zustandes relaxieren. Das ist auch der Grund, warum Emissionsspektren unabhängig von der Anregungswellenlänge sind. Im Gegensatz zur Absorption erfolgt die Emission immer aus dem niedrigsten Schwingungsniveau des angeregten Zustandes und endet in den Schwingungsniveaus des Grundzustandes. Die Energiedifferenz zwischen Anregung und Emission wird auch als Stokes-Verschiebung bezeichnet.

### 2.4.2. Photophysik: Das Drei-Zustandsmodell

Die Interaktion eines Fluorophors mit einem elektromagnetischen Feld wird allgemein durch die quantenmechanischen Bloch-Gleichungen beschrieben. Bei Raumtemperatur ist allerdings ein einfaches 3-Zustandsmodell für die Beschreibung ausreichend (Abb. 2.5. A). Die Geschwindigkeitskonstante der Absorption ist

$$k_{01} = \frac{\sigma I}{\hbar \omega} \quad [2.25]$$

mit dem Absorptionsquerschnitt  $\sigma$ , der Anregungsenergie  $I$  und der Photonenenergie  $\hbar\omega$ . Die Emission erfolgt mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{10}$ . Der Übergang vom angeregten Singulett zum Triplett-Zustand ist  $k_{12}$  und die Relaxation vom Triplett- in den Grundzustand ist  $k_{20}$ . Unter der Annahme, dass alle Kohärenz aufgrund der Störungen durch das Lösungsmittel verloren geht, ist das Differentialgleichungssystem für die Wahrscheinlichkeit  $P_i$ , dass der Zustand  $i$  besetzt ist

$$\begin{aligned} \dot{P}_0 &= -k_{01}P_0 + k_{10}P_1 + k_{20}P_2 \\ \dot{P}_1 &= k_{01}P_0 - k_{10}P_1 - k_{12}P_1 \\ P_2 &= 1 - P_0 - P_1 \end{aligned} \quad [2.26]$$

Die Gleichungen können in ein lineares, inhomogenes Differentialgleichungssystem 1. Ordnung überführt werden (Prummer, 2002),

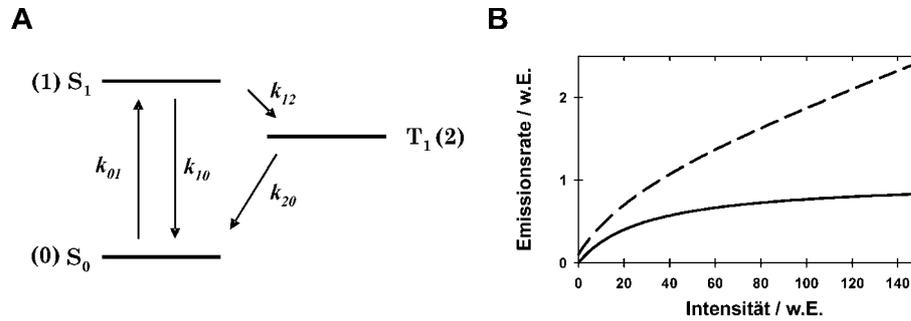
$$\begin{pmatrix} \dot{P}_0 \\ \dot{P}_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{01} - k_{20} & k_{10} - k_{20} \\ k_{01} & -k_{10} - k_{12} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_0 \\ P_1 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} k_{20} \\ 0 \end{pmatrix} . \quad [2.27]$$

Im stationären Fall (*steady-state*), d.h.  $\dot{P}_0 = \dot{P}_1 = \dot{P}_2 = 0$ , und bei Definition der Photonenemissionsrate als  $R = k_{10}P_1$  ergibt sich aus [2.27]

$$R = \frac{k_{10}}{(k_{12}/k_{20}) + 1 + (k_{12} + k_{10})/k_{01}} . \quad [2.28]$$

Im Grenzfall unendlich hoher Anregungsintensität ( $I$ ) zeigt  $R$  eine Sättigung und man erhält

$$R_\infty = \lim_{k_{01} \rightarrow \infty} R = \frac{k_{10}}{1 + k_{12}/k_{20}} . \quad [2.29]$$



**Abbildung 2.5. Das Drei-Zustandsmodell zur Beschreibung der Fluorophordynamik eines Moleküls.** (A) Jablonski-Diagramm des 3-Zustandsmodells.  $S_0$  ist der elektronische Grundzustand,  $S_1$  der angeregte Singulett-Zustand und  $T_1$  ist der Triplet-Zustand. (B) Schematische Darstellung der Emissionsrate als Funktion der Anregungsintensität für das 3-Zustandssystem im idealen Fall, nach [2.31] (durchgezogen), sowie unter Berücksichtigung von Hintergrundfluoreszenz, Streulicht und Detektorrauschen, nach [2.32] (gestrichelt). Für die Berechnung wurden folgende Parameter verwendet:  $I_S = 30$ ;  $A = 0,01$  und  $\xi = 0,1$ .

Mit der Definition

$$I_S = \frac{\hbar \omega k_{20} k_{10} + k_{12}}{\sigma k_{20} + k_{12}} , \quad [2.30]$$

ergibt sich aus [2.25], [2.28] und [2.29]

$$R = R_\infty \frac{I}{I + I_S} . \quad [2.31]$$

Gleichung [2.31] beschreibt eine hyperbole Sättigungsfunktion (Abb. 2.5. B). Die formale Behandlung des 3-Zustandssystems ist allerdings eine idealisierte Darstellung des experimentellen Sachverhaltes. Zusätzlich müssen noch praktische Faktoren wie Streulicht, Hintergrundfluoreszenz und elektronisches Rauschen des Photonendetektors berücksichtigt werden, um die apparente Emissionsrate  $R$  als Funktion der Anregungsintensität zu beschreiben.

Während das elektronische Rauschen des Detektors unabhängig von  $I$  ist, steigen Hintergrundfluoreszenz und Streulicht linear mit der eingestrahelten Intensität. Gleichung [2.31] erweitert sich dadurch zu

$$R_{app} = R_\infty \frac{I}{I + I_S} + A \cdot I + \xi , \quad [2.32]$$

wobei Streulicht und Hintergrundfluoreszenz durch den Term  $A \cdot I$  und das Rauschen des Detektors durch  $\xi$  beschrieben werden (Abb. 2.5. B). Das dargestellte Modell läßt sich problemlos um weitere Einflussfaktoren wie Bleichen des Fluorophors (*photobleaching*) und strahlungslose Relaxation vom  $S_1$ - in den  $S_0$ -Zustand (*internal conversion*) erweitern.

### 2.4.3. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) ist der strahlungslose Transfer der Anregungsenergie eines Fluorophors, dem Donor, zu einem weiteren Fluorophor, dem Akzeptor. Physikalisch beruht FRET auf einer Dipol-Dipol-Interaktion beider Fluorophore. Die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers hängt im wesentlichen von der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors sowie der relativen Orientierung der Übergangsdipole beider Fluorophore ab. Die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers  $k_{FRET}$  ist gegeben durch

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_d} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6, \quad [2.33]$$

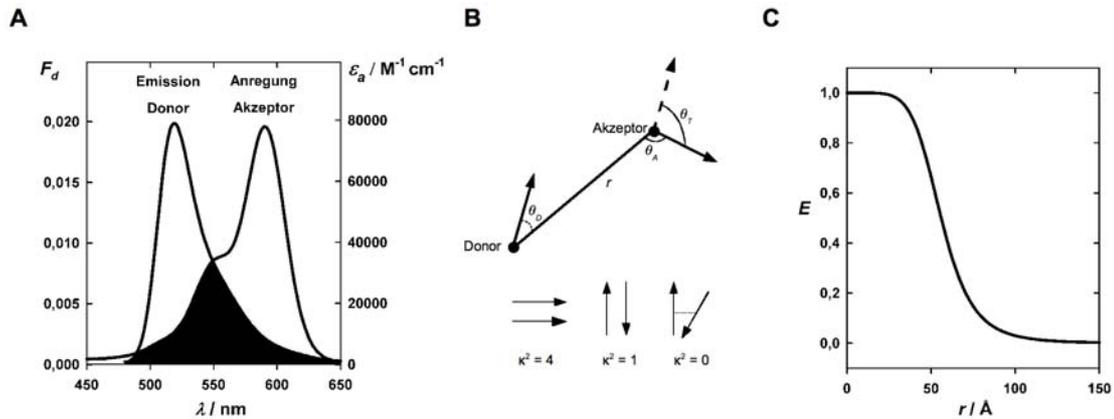
wobei  $\tau_d$  die Fluoreszenzlebensdauer des Donors und  $r$  der Abstand zwischen Donor und Akzeptor ist (Lakowicz, 1983).  $R_0$  ist der charakteristische Abstand, auch Förster-Abstand genannt, bei dem die Effizienz des Energietransfers 50% ist. Die ausgeprägte Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Energietransfers vom Abstand beider Fluorophore macht diesen Mechanismus zu einer idealen Methode der Abstandsmessung im Bereich von 20 bis 100 Å. Der für die Abstandsmessung wichtige Förster-Radius ( $R_0$ ) kann anhand spektroskopisch leicht zugänglicher Größen für ein gegebenes Donor-Akzeptor-Paar bestimmt werden. Es gilt

$$R_0 = 0,2108 \cdot (\kappa^2 n^{-4} \phi_d J)^{1/6} \quad [2.34]$$

mit

$$J = \int_0^{\infty} F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad [2.35]$$

Hierbei ist  $\phi_d$  die Quantenausbeute des Donors,  $\kappa$  beschreibt die relative Orientierung beider Fluorophor-Dipole zueinander,  $n$  ist der Brechungsindex des Medium und  $J$  ist das Überlappungsintegral zwischen dem auf die Fläche von 1 normierten Emissionsspektrums des Donors,  $F_d$ , und dem Absorptionsspektrums des Akzeptors,  $\varepsilon_a$  (Abb. 2.6. A). Neben dem Über-



**Abbildung 2.6. Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer.** (A) Normiertes Emissionsspektrum des in dieser Arbeit verwendeten Donors Alexa Fluor 488 und Absorptionsspektrum des Akzeptors Alexa Fluor 594 (Daten vom Hersteller, 3.1.1.). Die Überlappung beider Spektren wurde als schwarze Fläche hervorgehoben. (B) Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  und den relativen Stellungen der Übergangsdipole von Donor und Akzeptor nach Lakowicz, 1983. (C) Änderung der Transfer-Effizienz  $E$  in Abhängigkeit des Abstandes beider Fluorophore nach [2.37]. Für die Darstellung wurde ein Försterradius von  $R_0 = 56 \text{ \AA}$  gewählt.

lappungsintegral und der Quantenausbeute des Donors wird der Förster-Abstand auch durch die Orientierung beider Übergangsdipole zueinander bestimmt. Aus den Winkeln  $\theta_d$ ,  $\theta_a$  und  $\theta_T$  lässt sich  $\kappa^2$  über

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_d \cos \theta_a)^2 \quad [2.36]$$

berechnen (Abb. 2.6 B). In Gleichung [2.36] ist  $\theta_T$  der Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donors und dem Absorptionsdipols des Akzeptor.  $\theta_d$  sowie  $\theta_a$  sind die Winkel zwischen beiden Dipolen und dem Verbindungsvektor zwischen Donor und Akzeptor (Abb. 2.6. B). Der Orientierungsfaktor kann Werte zwischen 0 und 4 besitzen. Zum Beispiel ist im Falle von parallel zueinander angeordneten Dipolen der Orientierungsfaktor maximal, d.h. 4, während eine orthogonale Anordnung einen Orientierungsfaktor von 0 zur Folge hat. Häufig wird davon ausgegangen, dass beide Fluorophore frei um die Bindungen, durch die sie mit dem Protein verknüpft sind, rotieren können. Dies hat letztlich einen Orientierungsfaktor von  $2/3$  zur Folge. Dieser Wert wird gewöhnlich für eine Berechnung des Förster-Abstandes angenommen. Eine experimentelle Bestätigung dieser Annahme ist durch Fluoreszenz-Anisotropiemessungen möglich (siehe 2.4.4.).

Im Falle eines fixen Abstandes zwischen Donor und Akzeptor ist die Energietransfer-Effizienz ( $E$ ) vollständig über den Förster-Abstand und den tatsächlichen Abstand beider Fluorophore

bestimmt (Abb. 2.6. C). Experimentell läßt sich die Energietransfer-Effizienz anhand der Fluoreszenz-Signale von Donor und Akzeptor bestimmen. Die Energietransfer-Effizienz ist dann

$$E = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6} = \frac{I_a}{I_a + I_d} \quad . \quad [2.37]$$

wobei  $r$  der Abstand zwischen Donor und Akzeptor und  $I_a$  die Fluoreszenz-Intensität des Akzeptors sowie  $I_d$  die des Donors ist.

#### 2.4.4. Fluoreszenz-Polarisation

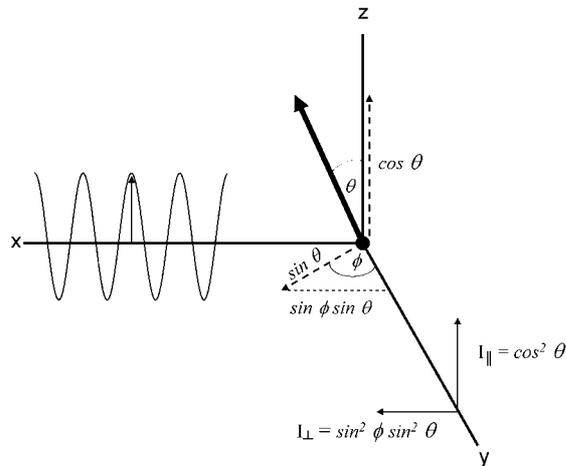
Werden Fluorophore mit polarisiertem Licht angeregt, so ist auch das von ihnen emittierte Licht polarisiert. Diese Polarisation der Emission beruht vor allem darauf, dass die Fluorophore entsprechend ihrer relativen Orientierung zur Polarisationsrichtung selektiv angeregt werden (PhotoSelektion). Sind die Fluorophore jedoch beweglich und nicht starr, so wird das emittierte Licht aufgrund der Rotationsdiffusion der Fluorophore depolarisiert. Polarisationsmessungen geben deshalb Aufschluss über die mittlere Änderung der Orientierung des Fluorophors zwischen Absorption und Emission eines Photons.

Das Messprinzip der Fluoreszenz-Polarisation ist in Abbildung 2.7. dargestellt. Eine Probe wird mit vertikal polarisiertem Licht angeregt. Der elektrische Feldvektor  $\vec{E}$  ist entlang der z-Achse ausgerichtet. Im rechten Winkel zur Anregungsrichtung wird nun die Fluoreszenzintensität ( $I$ ) parallel ( $\parallel$ ) und senkrecht ( $\perp$ ) zur Polarisation der Anregung bestimmt. Die Polarisation ( $P$ ) oder äquivalent die Anisotropie ( $r$ ) sind definiert als

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad \text{und} \quad [2.38]$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 I_{\perp}} \quad . \quad [2.39]$$

Für komplett polarisiertes Licht  $I_{\perp} = 0$  gilt  $P = r = 1$ . Im anderen Grenzfall, d.h. für komplett depolarisiertes Licht gilt  $P = r = 0$ . In der modernen Literatur wird fast ausschliesslich die Anisotropie angegeben. Die Verbindung zwischen Anisotropie und dem mittleren Winkel zwischen dem Vektor des Emissionsdipols des Fluorophors und der z-Achse lässt sich anhand von Abbildung 2.7 herleiten. Die von einem Dipol abgestrahlte Lichtintensität ist proportional



**Abbildung 2.7. Prinzip der Fluoreszenz-Anisotropiemessung.** Die Probe wird mit linear polarisiertem Licht aus x-Richtung angeregt. Die Projektion des Absorptions- und Emissionsdipols des Fluorophors auf die z-Achse ist proportional zu  $I_{\parallel}$  und dessen Projektion auf die x-Achse ist proportional zu  $I_{\perp}$ . Der Emissionsdipolvektor hat den Betrag 1.

zum Quadrat des auf die Beobachtungsachse (z) projizierten Dipolvektors. Daraus ergibt sich

$$I_{\parallel}(\theta, \phi) = \cos^2 \theta \quad [2.40]$$

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \sin^2 \theta \sin^2 \phi \quad [2.41]$$

Erfolgt die Anregung aus Richtung der x-Achse, so werden alle Moleküle mit gleichem  $\theta$  auch mit gleicher Wahrscheinlichkeit angeregt (Photo Selektion). Sind alle angeregten Fluorophore rotationssymmetrisch zur z-Achse angeordnet, werden alle Werte  $\phi$ , von 0 bis  $2\pi$ , mit gleicher Wahrscheinlichkeit eingenommen. Gleichung [2.41] vereinfacht sich dann zu

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \frac{1}{2} \sin^2 \theta \quad [2.42]$$

Bei Annahme, dass alle Fluorophore vollkommen zufällig angeordnet sind, wofür die Wahrscheinlichkeitsdichte  $p(\theta)d\theta$  angenommen wird, sind die gemessenen Intensitäten

$$I_{\parallel}(\theta, \phi) = \int_0^{\pi/2} p(\theta) \cos^2 \theta d\theta = \overline{\cos^2 \theta} \quad [2.43]$$

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \frac{1}{2} \int_0^{\pi/2} p(\theta) \sin^2 \theta d\theta = \frac{1}{2} \overline{\sin^2 \theta} \quad [2.44]$$

Mit Gleichung [2.39] und  $\sin^2 \theta = 1 - \cos^2 \theta$  erhält man aus [2.43] und [2.44]

$$r = \frac{3}{2} \overline{\cos^2 \theta} - \frac{1}{2} . \quad [2.45]$$

Die Anisotropie ist demzufolge ein direktes Maß für  $\overline{\cos^2 \theta}$ . Unter der Annahme, dass die Dipole der Absorption und Emission kollinear sind und alle Moleküle zufällig in der Lösung angeordnet sind, kann aus [2.43]  $\overline{\cos^2 \theta} = 3/5$  berechnet werden. Dies ergibt einen maximalen Wert der Anisotropie von 0,4 für Fluorophore in Lösung. Werte  $> 0,4$  müssen aus Streulicht resultieren, das vollständig polarisiertes Licht darstellt.

Im Gegensatz zu *steady-state*-Messungen der Anisotropie, erlauben zeitaufgelöste Anisotropiemessungen direkte Aussagen über die Rotationskorrelationszeit eines Fluorophors. In [2.39] sind die Terme  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  dann zeitabhängige Größen. Nach einem kurzen Anregungspuls fallen beide Intensitäten aufgrund der Rotation des Fluorophors ab. Der sich daraus ergebende Abfall der Anisotropie kann als Summe mehrerer Exponentialfunktionen dargestellt werden,

$$r(t) = r_0 \sum_i g_i e^{-t/\varphi_i} . \quad [2.46]$$

In [2.46] ist  $r_0$  die Anisotropie ohne Depolarisierung durch die Rotationen des Fluorophors. Sie wird nur durch den Winkel zwischen Absorptionsdipol und Emissionsdipol bestimmt.  $g_i$  ist die Amplitude der Komponente  $i$  des Anisotropie-Abfalls und  $\varphi_i$  ist die Rotationskorrelationszeit der Komponente  $i$ . Ist ein Fluorophor an ein Makromolekül gebunden, so sind mindestens zwei Korrelationszeiten, die durch die eingeschränkte Mobilität des Fluorophors ( $\varphi_F$ ) und die durch die Rotation des Makromoleküls ( $\varphi_M$ ), zu erwarten. Ist die direkte Fluorophorbewegung unabhängig von der Rotation des Makromoleküls, ist der Anisotropieabfall

$$r(t) = r_0 [a e^{-t/\varphi_F} + (1-a)] e^{-t/\varphi_M} . \quad [2.47]$$

## 2.5. Grundlagen der Einzelmolekülspektroskopie

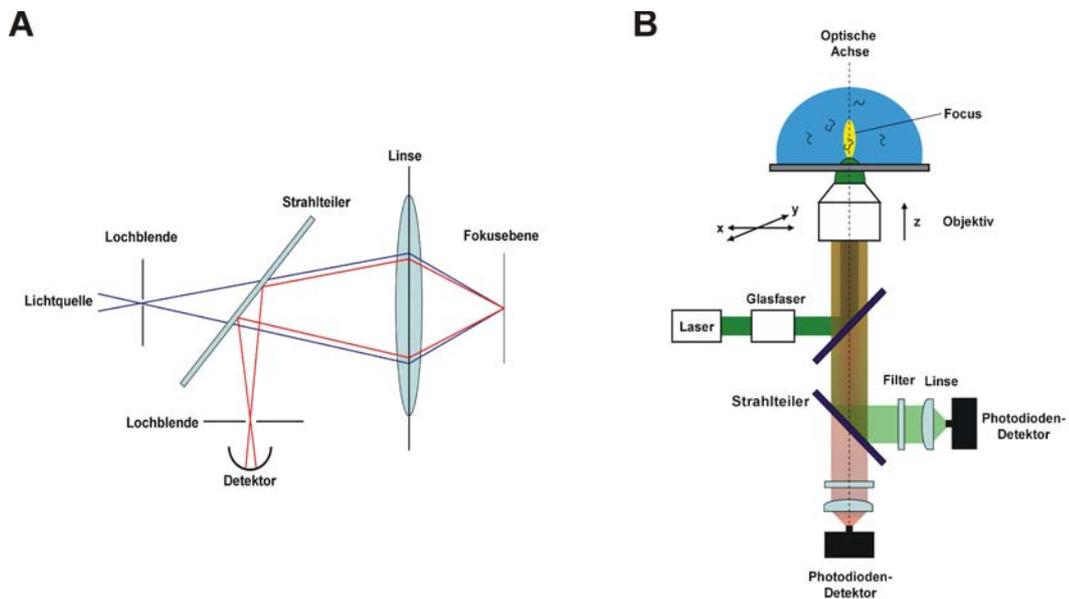
### Das konfokale Prinzip

Die Stärke der Einzelmolekülspektroskopie liegt vor allem darin, dass einzelne Moleküle in einer heterogenen Mischung direkt untersucht werden können. Besonders im Bereich biologischer Anwendungen, wo statische und dynamische Heterogenität Bestandteil jedes Experiments sind, kann die Einzelmolekülspektroskopie wichtige Informationen liefern.

Die Geschichte der Einzelmolekülspektroskopie beginnt 1976 mit der Detektion eines einzelnen Antikörpers (Hirschfeld, 1976). Obwohl der Antikörper mit 80 bis 100 Fluorophoren modifiziert war, stellte dies den Beginn der Einzelmolekülspektroskopie dar. Einen weiteren Höhepunkt stellte 1990 die Detektion eines einzelnen Fluorophors unter physiologischen Bedingungen dar (Shera *et al.*, 1990). Unabhängig voneinander gelang zur selben Zeit Moerner und Orrit die Detektion eines Fluorophors in einem Gastkristall bei kryogenen Temperaturen (Moerner *et al.*, 1989; Moerner und Orrit, 1990).

Weite Verbreitung finden mittlerweile sogenannte Diffusionsexperimente, in denen die mit Farbstoffen markierten Biomoleküle frei durch das konfokale Volumen eines Lasers diffundieren (Deniz *et al.*, 1999). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Biomoleküle nicht an Oberflächen immobilisiert werden müssen. Damit werden Artefakte, z.B. durch eine Interaktion des Moleküls mit der Oberfläche, vermieden. Um einzelne Moleküle in solchen Experimenten detektieren zu können ist es erforderlich, die Konzentration an Molekülen so gering wie möglich zu halten. Eine erste Anwendung dieser Technik auf die Faltung von Proteinen gelang in der Gruppe von Weiss (Deniz *et al.*, 2000). Mittels FRET konnte im Einzelmolekülmaßstab gezeigt werden, dass im Gleichgewicht tatsächlich nur 2 Populationen an Molekülen, native und entfaltete, vorliegen.

Neben der sehr geringen Konzentration an Molekülen ist weiterhin ein möglichst kleines Anregungsvolumen für die Detektion einzelner Moleküle erforderlich. Dies wird durch das konfokale Prinzip ermöglicht (Abb. 2.8. A). Eine punktförmige Lichtquelle, die kohärentes monochromatisches Licht aussendet, wird in das Probevolumen fokussiert. Das emittierte Licht aus der Fokusebene passiert vor der Detektion durch eine Photodiode (*avalanche photodiode detektor*, apd) zusätzlich eine Lochblende.



**Abbildung 2.8. Allgemeine Funktionsweise des Konfokal-Mikroskops.** (A) Schematischer Aufbau eines Konfokal-Mikroskops. (B) Darstellung eines Konfokal-Mikroskops zur Detektion von FRET im Einzelmolekülmaßstab.

Auf diese Weise wird eine Abbildung der punktförmigen Lichtquelle in der Probe ermöglicht. Licht außerhalb der Fokusebene wird durch zwei Effekte unterdrückt. Einerseits wird durch die Nutzung einer punktförmigen Lichtquelle nur ein sehr kleines Volumen angeregt, andererseits wird sämtliches Licht außerhalb der Fokusebene von der Lochblende zurückgehalten. Das geringe Detektionsvolumen ermöglicht außergewöhnlich hohe Signal-zu-Rausch-Verhältnisse. Der prinzipielle Aufbau des in dieser Arbeit eingesetzten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) ist in Abbildung 2.8. B dargestellt. Das Anregungslicht eines Lasers wird in eine Glasfaser, spezifisch für nur eine Lasermode (*single mode glassfiber*), gekoppelt und anschließend über einen Spiegel und das Objektiv in die Probe fokussiert. Um möglichst viel Photonen detektieren zu können, werden Objektive mit hoher numerischer Apertur verwendet. Das emittierte Licht der durch den Fokus diffundierenden Moleküle wird über dasselbe Objektiv gesammelt und passiert den für das Laserlicht undurchlässigen Spiegel. Sind die zu untersuchenden Moleküle mit zwei verschiedenen Farbstoffen markiert, so können beide Komponenten des emittierten Lichtes über einen weiteren wellenlängenspezifischen Spiegel voneinander getrennt werden. Nachdem das Licht beider Komponenten nochmals wellenlängenspezifische Filter und eine Lochblende passiert hat, wird es über Linsen in die Detektoren fokussiert.

## 2.6. Protonenaustausch und NMR- Spektroskopie

### 2.6.1. Amidprotonenaustausch

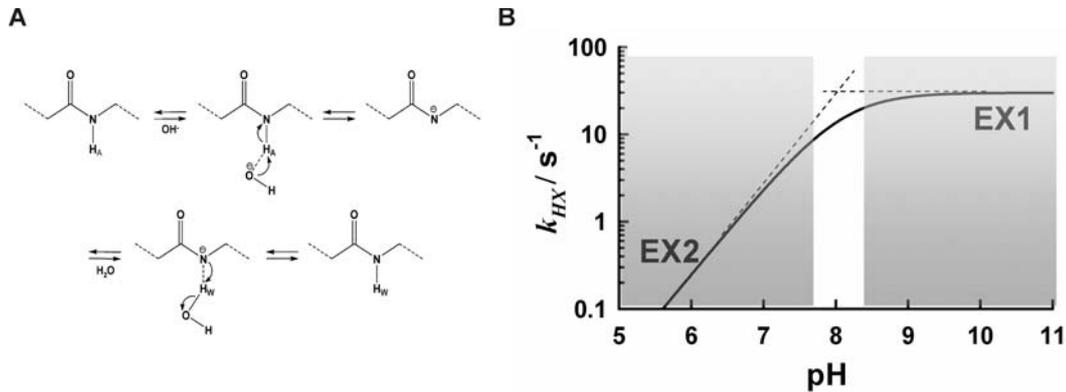
Der Austausch von Amidprotonen des Proteins gegen Protonen des Lösungsmittels wurde schon früh zur Analyse von Proteinfaltungsreaktionen genutzt (Wagner und Wüthrich, 1982; Wand *et al.*, 1986). Nicht alle Amidprotonen eines Proteins können gleichermaßen gut ausgetauscht werden. Amidprotonen können z.B. aufgrund von Wasserstoffbrücken und/oder einer schlechten Lösungsmittel-Zugänglichkeit vor einem Austausch mit den Protonen des Lösungsmittels geschützt sein. Die Berechnung von Schutzfaktoren für einzelne Amidprotonen erlaubt die Bestimmung thermodynamischer Parameter ( $\Delta G^0$ ) und ermöglicht Aussagen über die Stabilität lokaler Strukturbereiche des Proteins (Roder *et al.*, 1988; Bai *et al.*, 1995). Dieser Analyse liegt jedoch ein Modell für den Austauschmechanismus zu Grunde (Linderstrøm-Lang, 1955; Hvidt, 1966). Durch die lokale oder globale Entfaltung des Proteins wird die Lösungsmittel-Zugänglichkeit einiger oder aller Amidprotonen drastisch erhöht. Das einfachste Modell zur Beschreibung von Austauschreaktionen basiert auf dem Zwei-Zustandsmodell der Proteinfaltung (siehe 2.2.2, [2.3]). Für jedes Amidproton werden zwei Konformationen, eine geschlossene (C) und eine offene (O) Konformation, postuliert. Per Definition ist nur die offene Konformation austauschkompetent und es resultiert ein Drei-Zustandsmodell



In [2.48] entspricht **C** der geschlossenen Konformation (*closed state*), während **O** die offene Konformation (*open state*) darstellt. Ausgehend von **O** kann das entsprechende Amidproton mit der intrinsischen Geschwindigkeitskonstante  $k_{intr}$  basenkatalysiert gegen ein Proton des Lösungsmittels ausgetauscht werden (Abb. 2.9. A). Die Öffnungsreaktion erfolgt nach [2.48] mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{op}$ . Die Geschwindigkeitskonstante der Schließreaktion ist  $k_{cl}$ . Die apparente Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion ( $k_{HX}$ ) von [2.48] ist

$$k_{HX} = \frac{k_{op} \cdot k_{intr} \cdot [\text{OH}^-]}{k_{op} + k_{cl} + k_{intr} \cdot [\text{OH}^-]} \quad [2.49]$$

Aus [2.49] lassen sich verschiedene Grenzfälle konstruieren. Bei niedrigen pH-Werten und



**Abbildung 2.9. Darstellung des basenkatalysierten Amidprotonenaustausches.** (A) Reaktionsschema des Austausches freier Amidprotonen H<sub>A</sub> gegen Protonen des Lösungsmittels H<sub>W</sub>. (B) Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{HX}$  vom pH-Wert des Lösungsmittels. Die beiden Grenzbedingungen, EX2 und EX1, sind grau unterlegt.

unter nativen Bedingungen ist  $k_{cl} \gg (k_{intr}[OH] + k_{op})$  und [2.49] reduziert sich zu  $k_{HX} = (k_{op}/k_{cl})k_{intr}[OH]$  (EX2-Bedingungen) (Abb. 2.9 B). Die Gleichgewichtskonstanten  $K_{eq} = k_{op}/k_{cl}$  und damit auch die freien Enthalpien ( $\Delta G_{HX}$ ) der Öffnungs-Schließgleichgewichte für die betreffenden Amidprotonen können somit bei Kenntnis der intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{intr}$ ), die denen der freien ungeschützten Amidgruppen entsprechen, bestimmt werden. Jedoch haben sowohl die N-terminal, wie auch die C-terminal vom Amidproton gelegenen Aminosäuren einen Einfluss auf  $k_{intr}$  (Bai *et al.*, 1993; Cornelli *et al.*, 1993). Über die Denaturanzabhängigkeit von  $\Delta G_{HX}$  konnten z.B. für Cytochrom C die Amidprotonen ermittelt werden, deren Austausch eine lokale bzw. globale Entfaltung erfordern (Bai *et al.*, 1995).

Bei hohen pH-Werten ist  $k_{intr}[OH] \gg (k_{op} + k_{cl})$  und jedes Öffnungsereignis führt zu einer Austauschreaktion (EX1-Bedingungen) (Abb. 2.9 B). Gleichung [2.49] wird dann zu  $k_{HX} = k_{op}$ . Unter diesen Bedingungen sind die Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungsreaktion direkt zugänglich. Häufiger wird der Amidprotonenaustausch jedoch genutzt, um unter EX2-Bedingungen Schutzfaktoren ( $P = 1/K_{eq}$ ) zu ermitteln. Eine Gesamtanalyse (Linderström-Lang-Analyse) um  $\Delta G_{HX}^0$  und  $k_{op}$  zu erhalten, wurde bis jetzt nur für wenige Proteine beschrieben (Pedersen *et al.*, 1993; Kragelund *et al.*, 1998; Arrington *et al.*, 1997; Sivaraman *et al.*, 2001; Houliston *et al.*, 2002; Roudriguez *et al.*, 2002).

Konventionell wird der Amidprotonenaustausch durch den Austausch von Protonen gegen Deuteronen, gekoppelt mit NMR-Spektroskopie, realisiert.

### 2.6.2. NMR-Spektroskopie

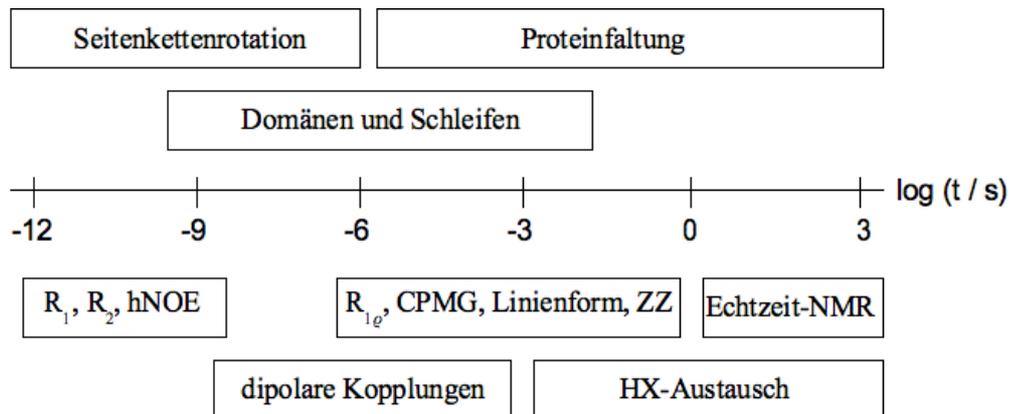
In Gegenwart eines externen Magnetfeldes mit der Feldstärke  $B_0$ , bildet die Summe aller Kernspins in z-Richtung die makroskopische Magnetisierung ( $\vec{M}$ ) einer NMR-Probe. Der Vektor  $\vec{M}$  rotiert mit einer spezifischen Frequenz, der Larmorfrequenz  $\omega_L$ , um die z-Achse des Koordinatensystems. Das grundsätzliche NMR-Experiment basiert auf einer Auslenkung dieser makroskopischen Magnetisierung aus ihrer Gleichgewichtslage durch einen Radiofrequenzpuls (rf-Puls). Die Pulslänge bestimmt den Winkel, um den  $\vec{M}$  ausgelenkt wird. So dreht ein  $90^\circ$ -Puls  $\vec{M}$  aus der z-Richtung in die xy-Ebene. Danach relaxiert das System zurück in seine Gleichgewichtslage. Dieser Prozess ist durch zwei Geschwindigkeitskonstanten,  $R_1$  und  $R_2$ , oder äquivalent durch zwei Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$ , gekennzeichnet. Die longitudinale oder auch Spin-Gitter Relaxation  $R_1$ , beschreibt die Rückkehr der Spins in die Gleichgewichtslage. Der zweite Relaxationsprozess, charakterisiert durch  $R_2$ , beschreibt den Verlust der Kohärenz der Spins in der xy-Ebene. Der Zeitverlauf des Relaxationsprozesses wird aufgezeichnet und bildet den freien Induktionsabfall (FID), aus welchem durch Fouriertransformation das NMR-Spektrum erhalten wird. In Abhängigkeit ihrer chemischen Umgebung, der Elektronenhülle, unterscheidet sich das effektive Magnetfeld am Atomkern vom externen Magnetfeld. Da die Resonanzfrequenz der Kerne direkt proportional zur angelegten Magnetfeldstärke ist, führen verschiedene elektronische Umgebungen zu verschiedenen Resonanzfrequenzen. Solche chemischen Verschiebungen werden meist relativ zu der einer Referenzsubstanz über

$$\delta = \frac{\nu_{ref} - \nu}{\nu_{ref}} \cdot 10^6 \quad . \quad [2.50]$$

angegeben. Hier sind  $\nu$  und  $\nu_{ref}$  die Resonanzfrequenzen des interessierenden Signals und des Referenzsignals. Der Vorteil von [2.50] liegt darin, dass die so dargestellten chemischen Verschiebungen,  $\delta$  in ppm, unabhängig von der Magnetfeldstärke sind und Messungen an verschiedenen Instrumenten miteinander verglichen werden können.

### 2.6.3. Die NMR-Zeitskala

Neben den Möglichkeiten der Strukturaufklärung von Proteinen ist die NMR-Spektroskopie insbesondere geeignet, um die Dynamik von Proteinen und anderen Makromolekülen über einen großen Zeitbereich hochaufgelöst zu untersuchen.



**Abbildung 2.10. Logarithmische NMR-Zeitskala.** Die Art der Proteindynamik ist oberhalb der Zeitachse dargestellt. Unterhalb der Zeitachse sind einige Methoden der NMR-Spektroskopie und die durch sie zugänglichen Zeitbereiche gezeigt.  $R_1$ ,  $R_2$  und hNOE stehen für  $R_1$ -Relaxation,  $R_2$ -Relaxation und heteronuklearen NOE-Effekt.  $R_{1\rho}$  steht für die longitudinale Relaxation im rotierenden Koordinatensystem, CPMG für die Dispersion der transversalen Relaxationzeit unter Nutzung der Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Spinocho-Sequenzen, Linienform für eindimensionale Linienform-Analysen und ZZ für zweidimensionale Austauschspektroskopie. HX-Austausch steht für Amidprotonenaustausch. Die Abbildung wurde nach Zeeb (2004) erstellt.

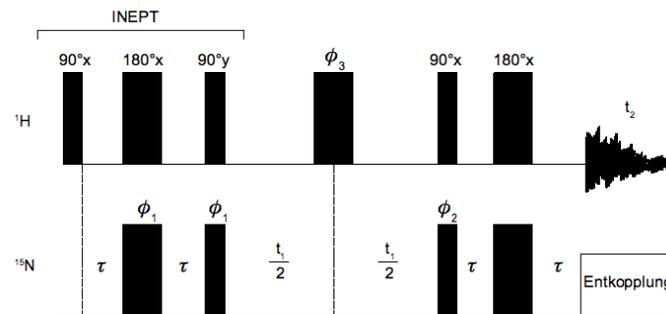
Mittels Verfahren zur schnellen Mischung von Lösungen im NMR-Probenkopf konnte die Faltungskinetik von Proteinen hochaufgelöst beobachtet werden (Frieden *et al.*, 1993; McGee und Parkhurst, 1990). In der Echtzeit-NMR können mittlerweile Reaktionen mit Geschwindigkeitskonstanten von  $2 \text{ s}^{-1}$  untersucht werden (Mok *et al.*, 2003) (Abb. 2.10). In Kombination mit verbesserten Pulssequenzen, wie SOFAST, die eine schnelle Aufnahme von 2-dimensionalen NMR-Spektren erlauben, konnte die Faltung von Lactalbumin sowie der schnelle H/D-Austausch bei Ubiquitin untersucht werden (Schanda *et al.*, 2007). Nichtsdestotrotz sind die meisten Faltungsreaktionen noch immer zu schnell um mittels Echtzeit-NMR untersucht werden zu können.

Grundsätzlich ist der aus dem NMR-Spektrum direkt zugängliche Zeitbereich durch die Magnetfeldstärke  $B_0$  und damit vom Instrument abhängig. Die Zeitauflösung in NMR-Experimenten ist durch die Resonanzfrequenz  $\nu_0$  (z.B.  $\nu_0 = 500 \text{ MHz}$  für  $^1\text{H}$  bei  $B_0 = 11.74 \text{ T}$ ) gegeben. Prozesse mit Geschwindigkeitskonstanten von  $10^{-12}$  bis  $10^{-7} \text{ s}$  haben deshalb einen direkten Einfluss auf die Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  (Abb. 2.10). Langsamere Prozesse, wie chemische Reaktionen und Konformationsänderungen von Proteinen, die zum Austausch eines NMR-aktiven Kerns zwischen zwei verschiedenen chemischen Umgebungen führen, ändern das NMR-Spektrum in charakteristischer Weise. Dieser Effekt wird bei der Linienbreitenanalyse

(*line shape analysis*) sowie der 2-dimensionalen ZZ-Austausch-Spektroskopie (Abb. 2.10) genutzt, um Geschwindigkeitskonstanten im Mikro- bis Milli-Sekunden-Zeitbereich im thermodynamischen Gleichgewicht zu bestimmen (Farrow *et al.*, 1994; Montelione und Wagner, 1989; Wider *et al.*, 1991; Burton *et al.*, 1996; Huang und Oas, 1995). Sogar eines der am schnellsten faltenden Proteine, eine Subdomäne des Villin *headpiece* mit einer Geschwindigkeitskonstante der Faltung von  $2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ , konnte mit dieser Methode untersucht werden (Wang *et al.*, 2003). Eng verwandt mit der *line shape analysis*, die auf  $^1\text{H}$ -Spektroskopie beschränkt ist, sind die CPMG Relaxationsmethoden (nach Carr-Purcell-Meiboom-Gill). Diese erlauben eine direkte Bestimmung der Zeit, in der ein NMR-aktiver Kern von einer chemischen Umgebung in eine andere überführt wird (Tollinger *et al.*, 2001). Generell liegt der besondere Vorteil der NMR-Spektroskopie vor allem in der Möglichkeit, die zeitaufgelösten Informationen für prinzipiell alle Aminosäurereste eines Proteins zu erhalten. Da die in der NMR-Spektroskopie am häufigsten genutzte Kernsorte  $^1\text{H}$  jedoch bei komplexen Proteinen nur selten Spektren mit einer Auflösung bis hin zu einzelnen Resten ermöglicht, werden häufig 2-dimensionale Spektren unter zusätzlicher Nutzung von Hetero-Kernen, wie z.B.  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$ , genutzt.

#### 2.6.4. Das HSQC-Spektrum

Im zweidimensionalen HSQC-NMR Experiment (*heteronuclear single quantum coherence*) wird die skalare Kopplung zwischen  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kernen genutzt, um hochaufgelöste und einfach interpretierbare Spektren zu erhalten. Das HSQC-Spektrum liefert für jedes Amidproton des Proteins jeweils ein Signal. Dies wird über die sogenannte INEPT-Pulssequenz möglich. Die INEPT-Pulssequenz (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) ermöglicht den Transfer der Magnetisierung von  $^1\text{H}$ -Kernen auf die insensitiveren  $^{15}\text{N}$ -Kerne unter Nutzung der skalaren Kopplung zwischen beiden Kernsorten. Zunächst werden die Protonen über einen  $90^\circ$ -Puls aus x-Richtung angeregt (Abb. 2.11). Der Magnetisierungstransfer auf die  $^{15}\text{N}$ -Kerne wird durch einen gleichzeitigen  $180^\circ$ -Puls auf die  $^1\text{H}$ - wie auch die  $^{15}\text{N}$ -Kerne induziert. Nach Magnetisierungstransfer entwickelt sich die chemische Verschiebung der  $^{15}\text{N}$ -Kerne während der Zeit  $t_1$ . Eine weitere INEPT-Pulssequenz transferiert die Magnetisierung zurück auf die  $^1\text{H}$ -Kerne und die Detektion erfolgt während der Zeit  $t_2$ . Werden mehrere eindimensionale NMR-Spektren für verschiedene Zeiten  $t_1$  aufgenommen, erhält man nach Fouriertransformation ein zweidimensionales Spektrum mit den Frequenz-Achsen F1 für die  $^{15}\text{N}$ -Kerne und F2 für die  $^1\text{H}$ -Kerne.



**Abbildung 2.11. Pulssequenz des HSQC-Experimentes.** Die Radiofrequenz-Pulse sind als vertikale Balken gekennzeichnet. Die Pulse sind wie folgt gekennzeichnet: ein  $90^\circ$ -Puls aus x-Richtung ist mit  $90^\circ_x$ , ein  $90^\circ$ -Puls aus y-Richtung mit  $90^\circ_y$  und ein  $180^\circ$ -Puls aus x-Richtung entsprechend mit  $180^\circ_x$  bezeichnet. Die Phasenzyklen im HSQC-Experiment sind  $\phi_1 = x, -x$ ;  $\phi_2 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\phi_3 = 4(x), 4(-x)$ .

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1. Materialien

#### 3.1.1. Chemikalien

Acetonitril (ACN)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alexa Fluor 488 C <sub>5</sub> maleimide (A488)	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
Alexa Fluor 594 C <sub>5</sub> maleimide (A594)	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
Acrylamid	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid	Eurisotop, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
Ampicillin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Atto 700	AttoTec, Siegen, Deutschland
Calciumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Coomassie-Brilliant-Blue R250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Kraemer und Martin, Siegburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,4-Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumethyldiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Guanidiniumchlorid (GdmCl)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Deuteriumoxid 99,9%	Eurisotop, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
D-(+)-Glucose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Harnstoff	ICN Biomedicals, Irvine, USA
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid	USB, Cleveland, USA
Magnesiumsulfat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Thiamindiphosphat	PD Dr. Golbik, MLU-Halle-Wittenberg
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

### 3.1.2. Molekularbiologische Enzyme und Reagenzien

Hefe-Extrakt	Difco, Augsburg, Deutschland
Trypton	Difco, Augsburg, Deutschland
Select Agar	Difco, Augsburg, Deutschland
Pfu-Turbo DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
DpnI-Endonuklease	Biolabs Inc. New England, Ipswich, USA
Oligonukleotide	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Sequenzierungs-Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

### 3.1.3. Bakterienstämme, Plasmide und Primer

<i>Escherichia (E.) coli</i> XL1-Blue	Stamm zur Plamidpräparation
<i>Escherichia (E.) coli</i> JM109	Stamm zu Proteinexpression
pKK223-3-pWT	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor mit der Sequenz von Barstar pWT, Ampicillin-Resistenz-Gen von PD Dr. Globik zur Verfügung gestellt (Golbik, <i>et al.</i> , 1999)
pKK5 Vorwärts-Sequenzier-Primer	5'-GGT TCT GGC AAA TAT TCT GA-3'
pKK5 Rückwärts-Sequenzier-Primer	5'-GAA AAT CTT CTC TCA TCC GCC AAA ACA-3'

<b>S12C-Vorwärts-Primer</b>	5'-GGG AAC AAA TCA GAA GTA TCA GCG ACC TCC ACC-3'
<b>S12C-Rückwärts-Primer</b>	5'-GGT GGA GGT CGC TGA TAC TTC TGA TTT GTT CCC-3'
<b>S89C-Vorwärts-Primer</b>	5'-CAC CAT CAT CCT TTG CTA ATA CGA TCA ATG GG-3'
<b>S89C-Rückwärts-Primer</b>	5'-CCC ATT GAT CGT ATT AGC AAA GTA TGA TGG TG-3'

### 3.1.4. Reagenzien und Lösungen

<b>Standardpuffer</b>	50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8,0; entgast und durch einen Cellulose-Acetat-Filter (Satorius, Göttingen, Deutschland) 0,45 µm filtriert.
-----------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### Lösungen für Zellaufschluß und *inclusion body* Präparation

Zell-Aufschlusspuffer	0,1 M TrisHCl pH 8,0; 1 mM PMSF; 1 mM EDTA
Solubilisierungslösung	60 mM EDTA; 6 % Trition X-100; 1,5 M NaCl
Waschpuffer	0,1 M TrisHCl pH 8,0; 20 mM EDTA

#### Puffer für Resolubilisierung und Renaturierung

Resolubilisierungspuffer	8 M Harnstoff; 50 mM TrisHCl pH 8,0; 1 mM EDTA
Renaturierungspuffer	50 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA

#### Chromatographie-Puffer

Ionenaustauschpuffer A	50 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 M NaCl
Ionenaustauschpuffer B	50 mM TrisHCl pH 8,0; 1 M NaCl
Gelfiltrationspuffer	50 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 M NaCl

**Puffer für die Fluoreszenzmarkierung von pWT-S12C/S89C und pWT-S12C**

*labelling*-Puffer 4 M Harnstoff; 50 mM Natriumphosphat-Puffer  
pH 7,3; 1 mM EDTA

**Puffer und Lösungen für die Elektrophorese**

**SDS-Probenpuffer** 125 mM TrisHCl pH 6,8; 2 % (w/w) SDS;  
25 % (v/v) Gyzerin; 10 mM DTT;  
Bromphenolblau

**Coomassie-Färbelösung**

Lösung A 0,05 % (w/v) Coomassie R250; 25 % Isopro-  
panol; 10 % Eisessig  
Lösung B 0,005 % (w/v) Coomassie R250; 10 % Isopro-  
panol; 10 % Eisessig  
Lösung C 0,002 % Coomassie R250; 10 % Eisessig  
Lösung D 10 % Eisessig

**3.1.5. Nährmedien**

LB-Amp-Medium (Luria-Bertani) 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10 g/l NaCl;  
100 µg/ml Ampicillin  
LB-Amp-Agar LB-Amp-Medium; 1,5 % (w/v) Select Agar  
M9-Mineralsalzkonzentrat (5x) 42,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl;  
2,5 g NaCl auf 1 L  
M9-Mineralsalzmedium 200 ml M9-Konzentrat (5x); 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>;  
100 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>; 100 µl 0,5% (w/v) Thiamin-  
diphosphat; 20 ml 20% (w/v) Glucose; add 1 L

## 3.2. Methoden

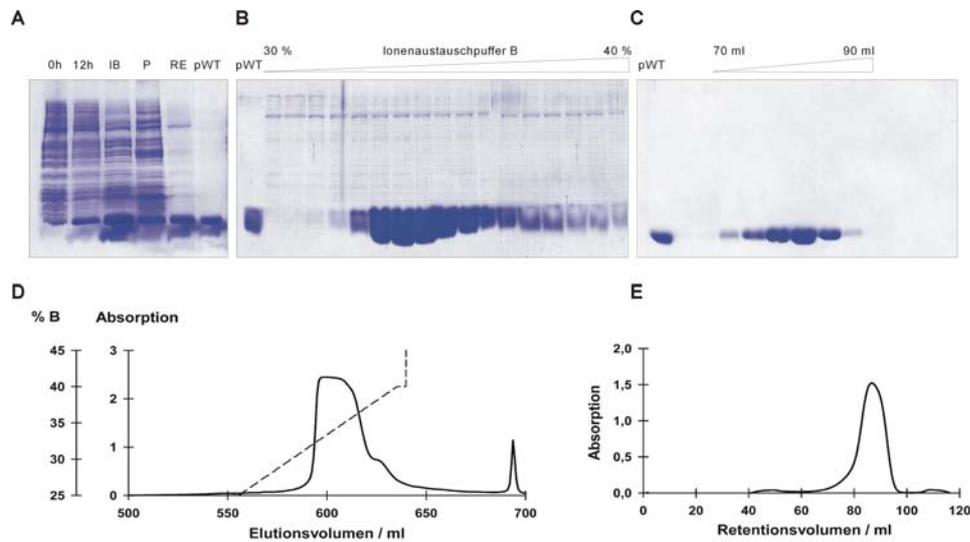
### 3.2.1. Molekularbiologische Methoden

Die Mutagenesen zur Erzeugung der Barstarvarianten pWT-S12C, pWT-S89C und pWT-S12C/S89C erfolgten mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Matrize diente das Plasmid pKK223-3-pWT (3.1.3.) mit der Sequenz von Barstar-pWT. Als Mutagenese-Primer wurden die Vorwärts- und Rückwärts-Primer für S12C oder S89C (3.1.3.) eingesetzt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie der DpnI-Verdau wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden chemokompetente XL1-Blue-Zellen mit dem PCR-Produkt transformiert. Es wurde auf Ampicillin-Resistenz bei 37°C selektiert. Die gewählten Klone wurden bei 37°C in LB-Amp-Medium (3.1.6.) angezogen. Nach Zentrifugation wurde die Plasmid-DNA mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll isoliert. Die Sequenz der mutierten DNA-Fragmente wurde mittels Fermentas Sequenzier-Kit (3.1.2.) und einem LI-COR DNA Sequencer (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) nach Herstellerangaben bestimmt. Anschließend wurden chemokompetente JM109-Zellen mit den mutierten Plasmiden transformiert und nach Anzucht als Glyzerinkultur bei -80°C gelagert. Die Variante pWT-S12C/S89C wurde durch eine zweite Mutagenese aus der Variante pWT-S12C hergestellt.

### 3.2.2. Expression, Renaturierung und Reinigung

#### 3.2.2.1. Expression

Nach Ausstreichen der Glyzerinkultur der JM109-Zellen mit dem Plasmid für die jeweiligen Barstar-Varianten auf LB-Amp-Agar und Inkubation über Nacht bei 37°C, wurden 2 x 50 ml LB-Amp-Medium als Vorkultur mit den auf Agar angezogenen Zellen angeimpft. Die Vorkulturen wurden 12 h bei 30°C im Schüttelkolben inkubiert. Anschließend wurden die Zellen der Vorkultur geerntet und in je 30 ml frischem LB-Amp-Medium vorsichtig resuspendiert. Die Hauptkulturen (12 x 1 l) wurden jeweils mit 5 ml der resuspendierten Vorkultur angeimpft und bei 30°C im Schüttelkolben angezogen. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1,2. Die Hauptkulturen wurden nach 10 bis 12 h bei 9000 g für 20 min zentrifugiert. Die Expression von <sup>15</sup>N-pWT in M9-



**Abbildung 3.1. Expression und Reinigung am Beispiel von pWT-S12C.** (A) Verfolgung der Expression und Renaturierung mittels SDS-PAGE: vor Induktion (0 h), 12 h nach Induktion (12 h), inclusion bodies (IB), Präzipitate nach Renaturierung (P), Rohextrakt (RE), Größenkontrolle Barstar-pWT (pWT). (B) SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Ionenaustauschchromatographie im Bereich von 30-40% Ionenaustauschpuffer B. (C) SDS-PAGE der pWT-S12C-haltigen Fraktionen der Gelfiltration. (D) Chromatogramm nach der Ionenaustauschchromatographie (durchgezogene Linie) sowie Gradient des Ionenaustauschpuffers B (gestrichelte Linie). (E) Chromatogramm nach der Gelfiltration. Die Absorption wurde bei 280 nm bestimmt.

Mineralsalzmedium erfolgte in Analogie zur dargestellten Prozedur.

### 3.2.2.2. Renaturierung

Die Zellen (45 g) wurden in 80-100 ml Zell-Aufschlusspuffer (3.1.4.) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Hochdruck-Dispersion (Gaulin, APV, Frankreich). Anschließend wurden 50 ml Solubilisierungslösung (3.1.4.) zugegeben. Nach 2-stündigen rühren bei 5°C wurde die Suspension für 20 min bei 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die *inclusion bodies* in 40 ml Waschpuffer (3.1.4.) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die *inclusion bodies* wurden insgesamt 4x gewaschen.

Die gewaschenen *inclusion bodies* wurden anschließend in 50 ml Resolubilisierungspuffer (3.1.4.) gelöst. Nach erneuter Zentrifugation für 20 min bei 100.000 g wurde der Überstand bei Raumtemperatur 2x gegen je 5 l Renaturierungspuffer (3.1.4.) über 12 h dialysiert. Die während der Renaturierung anfallenden Präzipitate von Fremdproteinen wurden durch Zentrifugation bei

100.000 g entfernt. Der erhaltene Rohextrakt wurde zur weiteren Reinigung verwendet. Abbildung 3.1.A demonstriert die Verfolgung der Expression und Reinigung mittels SDS-PAGE am Beispiel von pWT-S12C. Bei der Präparation der Cystein-haltigen Barstar-pWT-Varianten wurde allen Lösungen 10 mM DTT zugesetzt.

### 3.2.2.3. Reinigung

Der Rohextrakt wurde auf eine mit Ionenaustauschpuffer A (3.1.4.) prä-equilibrierte HiLoad™ 26/10 Q-Sepharose HP-Säule (V = 60 ml) (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) mit einem Fluß von 2 ml/min aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde die Säule bei einem Fluß von 2 ml/min mit 2 Säulenvolumina des Ionenaustauschpuffers A gewaschen. Die Elution erfolgte über einen NaCl-Gradienten (Gradientlänge: 4 Säulenvolumina) unter Nutzung von Ionenaustauschpuffer B (3.1.4.). Das Protein eluierte bei 35 – 40 % Ionenaustauschpuffer B. Die Barstar-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und bei einem Fluß von 0,75 ml/min über eine mit Ionenaustauschpuffer A prä-equilibrierte HiLoad™ 26/60 Superdex G75-Säule (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) weiter gereinigt. Das Protein eluierte nach einem Volumen von 80 - 90 ml. Die gesamte Reinigung erfolgte bei 5°C. Abbildung 3.1.B-E demonstriert den Reinigungsverlauf exemplarisch für pWT-S12C. Im Falle der Cystein-haltigen Barstar-pWT-Varianten wurde allen Puffern 10 mM DTT und 1 mM EDTA zugesetzt. Die Reinheit des Proteins wurde mittels Gel-Elektrophorese (Abb.3.1. C) überprüft.

### 3.2.3. Fluoreszenzmarkierung der Variante pWT-S12C/S89C

Für die Fluoreszenzmarkierung wurde die Variante pWT-S12C/S89C mit einer molaren Masse von 10285 g/mol, im weiteren mit pWT<sub>SS</sub> abgekürzt, innerhalb von 60 min 4x gegen 1 l 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,3 / 1 mM EDTA dialysiert. Insgesamt wurden 2 Präparationen von doppelt-markiertem pWT<sub>SS</sub> durchgeführt. In der ersten Präparation wurden 5 ml pWT<sub>SS</sub> (190 µM) in *labelling*-Puffer (3.1.4.) mit 65 µl einer 10 mM Lösung des FRET-Donors Alexa Fluor 488 C<sub>5</sub>-Maleinimid, im weiteren mit A488 abgekürzt, in DMSO versetzt. Dies entspricht einem 1,5-fachen Überschuss von Protein und minimiert die Menge an pWT<sub>SS</sub> mit zwei Donor-Farbstoffen pWT<sub>SS</sub>-(A488)<sub>2</sub>, im weiteren mit pWT<sub>SS</sub><sup>DP</sup> abgekürzt. Die molare Masse von A488 wird vom Hersteller mit 720 g/mol angegeben. Die Reaktion erfolgte für 4 h bei 25°C. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von DTT (Endkonzentration 10 mM) abgestoppt. Das markierte Protein wurde mittels Gelfiltration (HiLoad™ 26/60 Superdex G75) bei einem Fluß von 0,75 ml/min in Standardpuffer unter Zusatz von 10 mM DTT und 1 mM EDTA bei 25°C

rückgefaltet. Gleichzeitig wurde dadurch nicht umgesetzter Farbstoff entfernt. Um  $pWT_{SS}$  sowie  $pWT_{SS}^{DD}$  von einfach-markiertem Protein,  $pWT_{SS}^D$ , zu separieren, wurde als zweiter Schritt eine Ionenaustauschchromatographie, wie in 3.2.2. beschrieben, durchgeführt. Den Ionenaustauschpuffern A und B wurde 10 mM DTT und 1 mM EDTA zugesetzt. Das erhaltene  $pWT_{SS}^D$  wurde mittels VIVASPIN-20 Konzentrierungsröhrchen (VIVASCIENCE, Stonehouse, UK) konzentriert und erneut 4x gegen 1 l 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,3 mit 1 mM EDTA dialysiert. In einem zweiten Kopplungsschritt wurde 4 ml  $pWT_{SS}^D$  (28  $\mu$ M) in *labelling*-Puffer ein 10-facher molarer Überschuss des FRET-Akzeptors Alexa-Fluor 594 C5-Maleinimid, im weiteren mit A594 abgekürzt, zugesetzt. Die molare Masse von A594 ist laut Herstellerangaben 904 g/mol. Der Ansatz wurde für 10 h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von DTT (Endkonzentration 10 mM) abgestoppt. Das Protein wurde mittels Gelfiltration, wie oben beschrieben, rückgefaltet. Schließlich wurde Material erhalten, bei dem 100 % der Moleküle A488- und 32 % der Moleküle A594-Farbstoffe tragen, im weiteren mit  $pWT_{SS}^{DA}$  abgekürzt, (siehe auch 3.2.4.).

In einer zweiten Präparation wurde das Protein zuerst mit A594 und danach mit A488 markiert. Ansonsten waren alle Schritte zu den eben aufgeführten identisch. In dieser Präparation konnte reines, doppelt-markiertes Protein erhalten werden, im weiteren mit  $pWT_{SS}^{AD}$  abgekürzt. Die molare Masse der markierten Proteine wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie kontrolliert. Für  $pWT_{SS}^{AD}$  wurde eine molare Masse von 11883 g/mol erhalten. Erwartet wurden 11913 g/mol. Die Differenz von 30 g/mol liegt im Fehler der Bestimmung der molaren Masse durch MALDI-Massenspektrometrie.

### 3.2.4. Bestimmung der Kopplungsausbeuten

Absorptionsspektren wurden von 250 – 700 nm an einem Ultrospec 3000 UV-Spektrophotometer (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) aufgenommen. Die Küvettendicke betrug 1 cm. Die Kopplungsausbeute wurde anhand der Absorptionen bei 280 nm, 493 nm und 588 nm bestimmt. Es wurden folgende Extinktionskoeffizienten genutzt:

$$\begin{array}{ll}
 pWT_{SS}: \epsilon_{280}^{pWT_{SS}} & = 22690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} & (\text{Golbik et al., 1999}) \\
 A488: \epsilon_{280}^{A488} & = 8640 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} & (\text{siehe Text}) \\
 A488: \epsilon_{493}^{A488} & = 72000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} & (\text{Invitrogen}) \\
 A594: \epsilon_{588}^{A594} & = 96000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} & (\text{Invitrogen}).
 \end{array}$$

Der Extinktionskoeffizient von A488 bei 280nm wurde anhand von mit DTT gekoppelten A488

relativ zum bekannten Extinktionskoeffizienten bei 493 nm ermittelt. Um abzuschätzen wieviel unmarkiertes Protein nach dem ersten Kopplungs- und Reinigungsschritt im Verhältnis zu markiertem Protein vorlag, wurde die Protein- und Farbstoffkonzentration durch Bestimmung der Absorption bei 280 nm und 493 nm unter Nutzung von

$$E_{493} = \epsilon_{493}^{A488} \cdot [A488] \quad \text{und} \quad [3.1]$$

$$E_{280} = \epsilon_{280}^{pWT_{ss}} \cdot [pWT_{ss}] + \epsilon_{280}^{A488} \cdot [A488] \quad [3.2]$$

ermittelt. Nach dem ersten Kopplungsschritt und anschließender Reinigung wurde mittels [3.1] und [3.2] ein Verhältnis von Farbstoff zu Protein von 1,09 bestimmt. Das Verhältnis aus einfach- und doppelt-markierter  $pWT_{ss}^D$  und  $pWT_{ss}^{DA}$  wurde durch Messung der Absorption bei 493 nm und 588 nm unter Nutzung der angegebenen Extinktionskoeffizienten von A488 und A594 bestimmt.

### 3.2.5. Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie

#### 3.2.5.1. Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Alle Fluoreszenzspektren wurden an einem FluoroMax2-Fluorimeter (Jobin Yvon spec., Grasbrunn, Deutschland) aufgenommen. Die Anregungs- und Emissionsspaltbreite betrug jeweils 5 nm. Jedes Spektrum wurde gegen die Emissionsmonochromator-Kennlinie korrigiert. Das Basislinienspektrum des Puffers wurde grundsätzlich von den Probespektren abgezogen. Es wurde in 100- $\mu$ l-Küvetten (1 cm x 0,5 cm) bzw. in rührbaren und verschliessbaren 1-cm-Küvetten gemessen.

Für Intensitätsmessungen der intrinsischen Proteinfluoreszenz wurde eine Anregungswellenlänge von 280 nm genutzt. Die Emission wurde bei 320 nm gemessen. Die Messungen der Fluoreszenz von A488 erfolgte über eine Anregungswellenlänge von 493 nm. Die Fluoreszenz von A594 wurde bei einer Wellenlänge von 594 nm angeregt. Für FRET-basierte Messungen wurde der Donor A488 bei 493 nm angeregt und die Emission des Akzeptors wurde bei 610 nm oder 615 nm aufgezeichnet.

#### 3.2.5.2. Bestimmung der Quantenausbeuten

Die Quantenausbeute von A488 wurde an  $pWT_{ss}^D$  und die von A594 an  $pWT_{ss}^{DA}$  jeweils relativ zu einer Referenzsubstanz bestimmt. Im Falle von A488 war die Referenzsubstanz Fluorescein

in 0,1 N NaOH für das eine Quantenausbeute von  $0,925 \pm 0,015$  beschrieben ist (Magde *et al.*, 2002). Als Referenzsubstanz für A594 wurde der Farbstoff Atto700 (AttoTec, Siegen, Deutschland), gekoppelt mit DTT, genutzt. Für diesen wird vom Hersteller eine Quantenausbeute von 0,25 in Wasser angegeben.

Zur Bestimmung der Quantenausbeute der an das Protein gekoppelten Farbstoffe A488 und A594 wurden von  $pW_{ss}^D$ ,  $pWT_{ss}^{DA}$ , Fluoreszein und Atto 700 Verdünnungsreihen in Standardpuffer hergestellt. Die Absorptionen von Fluoreszein und  $pWT_{ss}^D$  wurden bei 460 nm und die von Atto 700 und  $pWT_{ss}^{DA}$  bei 600 nm bestimmt. Anschließend wurden alle Proben 1:10 verdünnt und es wurden für Fluoreszein und  $pWT_{ss}^D$  Fluoreszenzspektren nach Anregung bei 460 nm von 470 - 700 nm und für Atto 700 und  $pWT_{ss}^{DA}$  nach Anregung bei 600 nm von 610 - 800 nm aufgenommen. Alle Fluoreszenzspektren wurden integriert und die Intensitäten gegen die jeweiligen Absorptionsintensitäten aufgetragen (Anhang I). Die Quantenausbeute der Probe  $\phi_x$  wurde nach

$$\phi_x = \phi_{ref} \cdot \frac{f_x}{f_{ref}} \quad [3.3]$$

mit  $\phi_{ref}$  als Quantenausbeute der Referenz, sowie  $f_x$  und  $f_{ref}$  als Anstiege der Integralfluoreszenz als Funktion der Absorption bei der Anregungswellenlänge, bestimmt (Tab. 3.1.). Die Quantenausbeuten der Farbstoffe A488 ( $\phi_d$ ) und A594 ( $\phi_a$ ) zeigten leichte Änderungen bei Zugabe von GdmCl und Harnstoff (Anhang II), jedoch keine bei Zugabe von KCl (Anhang III).

**Tabelle 3.1. Ergebnisse der Quantenausbeutebestimmung nach [3.3].** Die Quantenausbeuten der an  $pWT$ -S12C/S89C gekoppelten Farbstoffe sind hervorgehoben.

	Fluoreszein	$pWT_{ss}^D$	Atto 700	$pWT_{ss}^{DA}$
$f$	51610 ± 1474	44020 ± 760	22110 ± 777	17270 ± 540
$\phi$	0,925 ± 0,015	<b>0,79 ± 0,03</b>	0,25*	<b>0,20 ± 0,04</b>

- \*vom Hersteller kein Fehler angegeben

### 3.2.5.3. Fluoreszenz-Anisotropie

*Steady-state*-Anisotropiemessungen wurden an dem Fluoreszenzspektrometer PC1 (ISS, Urbana, USA) bei einer Proteinkonzentration von 0,5  $\mu$ M in Standardpuffer bei 25°C durchgeführt. Die Anregungswellenlänge für den Donor an  $pWT_{ss}^D$  betrug 488 nm und die

Anisotropie wurde bei 520 nm bestimmt. Der Akzeptor A594 wurde an  $\text{pWT}_{\text{SS}}^{\text{DA}}$  bei 594 nm angeregt und dessen Anisotropie bei 620 nm bestimmt. Die Spaltbreite betrug 1 nm. Zeitaufgelöste Anisotropiemessungen wurden am Konfokal-Mikroskop (3.2.6.1.) in Standardpuffer bei einer Proteinkonzentration von 1 nM durchgeführt.

#### 3.2.5.4. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem JASCO-CD-Spektrophotometer (J-800) bei 20°C in Standardpuffer aufgenommen. Für die Aufnahme von CD-Spektren im fernen ultravioletten Bereich (UV)-Bereich (180 – 250 nm) wurden Quartzküvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 mm und für den nahen UV-Bereich (250 – 320 nm) mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die Spaltbreite betrug 0,1 nm und die Zeitkonstante 1 s. Es wurden 20 Einzelspektren akkumuliert. Zu jeder Probe wurde ein Pufferspektrum aufgenommen und vom Spektrum der Probe abgezogen. Intensitätsmessungen zur Bestimmung von Stabilitäten wurden bei 222 nm in einer 1 cm Küvette durchgeführt. Die erhaltenen Messwerte wurden in molare Elliptizitäten pro Aminosäurerest  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  nach

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot 0,1 \cdot M}{d \cdot c \cdot N} \quad [3.4]$$

mit  $\Theta$  als gemessener Intensität in mdeg,  $M$  der molaren Masse des Proteins in g/mol,  $d$  der Schichtdicke der Küvette in cm,  $c$  der Proteinkonzentration in mg/ml und  $N$  der Anzahl der Aminosäuren im Molekül umgerechnet.

#### 3.2.6. Einzelmolekülspektroskopie

Alle Einzelmolekül-Experimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian G. Hübner, Institut für Physik, Universität Lübeck, durchgeführt.

##### 3.2.6.1. Instrument-Aufbau

Die Einzelmolekül-Experimente wurden an einem selbstgebauten Konfokal-Mikroskop ausgeführt (Abb. 2.8.). In *steady-state*-Fluoreszenz-Experimenten wurde ein 488 nm cw-Laser (Sapphire, Coherent Inc.) bzw. für zeitaufgelöste Fluoreszenz-Experimente ein gepulster Laser mit einer Wellenlänge von 470 nm (PicoQuant GmbH, Berlin) eingesetzt. Für die räumliche

Filterung wurde das Laserlicht in eine Einzel-Moden-Glasfaser (Schäfter und Kirchhoff, Hamburg, Deutschland) gekoppelt und danach über ein apochromatisches Mikroskopobjektiv kollimiert. Ein wellenlängen-spezifischer Strahlteiler (z488/568, AHF Analystechnik, Tübingen, Deutschland) richtete das Laserlicht in das Mikroskopobjektiv (CFI Plan Apochromat 60x WI, Nikon). Die Fluoreszenz der Probe wurde durch dasselbe Mikroskopobjektiv gesammelt und nach Passieren des wellenlängen-spezifischen Strahlteilers in die Donor- und Akzeptor-Komponenten über einen dichroischen Spiegel (BS570DCXR, AHF Analystechnik) separiert. Donor- und Akzeptorlicht wurden zusätzlich gefiltert (HQ532/70 oder HQ500LP und HQ650/100, AHF Analystechnik). Jede Komponente wurde über eine achromatische Linse auf eine Avalanche-Photodiode (SPCM-AQ 14, Perkin Elmer) fokussiert. Die Ankunftszeiten jedes detektierten Photons wurden mittels PC-basierter Zähl Elektronik (PCI-6602, NI) aufgenommen. Zeitaufgelöste Anisotropiemessung wurden durch Einsatz einer  $\lambda/2$  und einer  $\lambda/4$  Phasenplatte (Melles Griot, USA) vor der Glasfaser durchgeführt.

### 3.2.6.2. Probenvorbereitung und Datenanalyse

Für Einzelmolekül-Experimente wurden die Proben auf eine Konzentration von 130 pM in unfiltriertem Standardpuffer (3.1.4.) mit den jeweiligen Konzentrationen an GdmCl, Harnstoff oder KCl verdünnt. Zur Verhinderung von Oberflächenadhesionen enthielten alle Proben zusätzlich 0,01% (w/v) Tween 20. In Standardpuffer betrug die Sättigungsleistung 60  $\mu$ W für A488 und 36  $\mu$ W für A594 (via FRET) an pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> (Anhang IV).

Alle Einzelmolekül-Zeitspuren (Bin-Zeit 500  $\mu$ s) wurden gegen die Photonenzählrate der entsprechenden Puffer korrigiert. Eine weitere Korrektur erfolgte durch Division der Zeitspuren durch die Quantenausbeuten der beiden Farbstoffe A488 ( $\phi_d$ ) und A594 ( $\phi_a$ ) (3.2.5.2.) sowie die Detektionseffizienzen für beide Kanäle ( $\eta_d = 0,33$  und  $\eta_a = 0,44$ ). Der Verlust von Donorfluoreszenz an den Akzeptorkanal wurde über

$$I_d = D + \beta D \quad [3.5]$$

$$I_a' = A - \beta D \quad [3.6]$$

berücksichtigt.  $D$  und  $A$  sind die gegen die Quantenausbeuten und Detektoreffizienzen korrigierten Intensitäten im Donor- bzw. Akzeptorkanal und  $\beta$  ist der relative Verlust von Donorfluoreszenz an den Akzeptorkanal.  $\beta$  wurde aus den normierten Emissionsspektren für A488 und A594, den bekannten Transmissionskennlinien aller Spiegel und Filter sowie den wellenlängenabhängigen Detektionseffizienzen der Detektoren zu 0,02 bestimmt. Die Direktanregung des Akzeptors wurde aus den Extinktionskoeffizienten für freies A488 und

A594 bei 488 nm zu 0,055 bestimmt und über

$$I_a = I_a' - 0,055(I_a' + I_d) \quad [3.7]$$

berücksichtigt. Die korrigierten Fluoreszenzintensitäten,  $I_d$  und  $I_a$ , für jeden Bin wurden genutzt um mittels [2.37] die FRET-Effizienzen zu berechnen. Überstieg die Photonenzahl innerhalb eines Bins den Schwellenwert ( $T$ ) von 250 bis 300, wurde der Bin als Einzelmolekül-Ereignis gewertet. Für jeden selektierten Bin wurde mittels [2.37] die FRET-Effizienz berechnet. Aus den FRET-Effizienzen aller Ereignisse wurden anschließend Histogramme erstellt. Typischer Weise sind in den FRET-Histogrammen 1000 – 3000 Ereignisse (d.h. Bins) enthalten. Die FRET-Histogramme wurden mit einer Beta-Funktion (Weiss, 1999) für die nativen Moleküle und einer Gauss-Funktion für die entfaltenen Moleküle angepasst. Die mittlere, aus den FRET-Histogrammen bestimmte Transfer-Effizienz ( $\langle E_m \rangle$ ) der entfaltenen Moleküle wurde zusätzlich gegen die Änderung der Quantenausbeute als Funktion der Konzentration von GdmCl und Harnstoff über

$$\langle E \rangle = \langle E_m \rangle / (\langle E_m \rangle + \alpha(1 - \langle E_m \rangle)) \quad [3.8]$$

korrigiert (Merchant *et al.*, 2006). In [3.8] ist  $\langle E_m \rangle$  die gemessene mittlere Transfer-Effizienz, während  $\langle E \rangle$  die korrigierte Transfer-Effizienz darstellt.  $\alpha$  ist das Verhältnis  $\phi_a / \phi_d$ . Für verschiedene GdmCl- und Harnstoffkonzentrationen wurde  $\phi_a$  bei pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup> durch Direktanregung des Akzeptors bei 594 nm und Emission bei 610 nm, und  $\phi_d$  bei pWT<sub>SS</sub><sup>D</sup> durch Anregung bei 470 nm und Emission bei 530 nm bestimmt (Anhang II).

Der Förster-Radius des FRET-Paares A488 und A594 wurde nach [2.34] und [2.35] aus den Spektren der freien Farbstoffe unter Berücksichtigung von  $\phi_d$ , dem Brechungsindex des Standardpuffers (3.1.4.) von 1,334 und einem  $\kappa^2 = 2/3$  (2.4.3.) zu  $R_0 = 56 \text{ \AA}$  bestimmt. Bei Messungen in Harnstoff oder GdmCl wurde die Änderung des Brechungsindex bei der Bestimmung von  $R_0$  berücksichtigt.

### 3.2.7. NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Experimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Biophysik (Prof. Jochen Balbach) des Institutes für Physik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg von Dipl.-Biochem. Ulrich Weininger oder mir persönlich durchgeführt.

#### 3.2.7.1. Schneller Amidprotonenaustausch

Die Kinetiken des Amidprotonenaustausches wurden mittels zweidimensionaler <sup>15</sup>N-HSQC-

NMR-Spektroskopie unter Nutzung einer modifizierten MEXICO-Pulssequenz (Gemmecker *et al.*, 1993), der New-MEXICO-Pulssequenz (Koide *et al.*, 1995), gemessen. MEXICO ist ein Akronym aus *Measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds*. Die New-MEXICO-Pulssequenz verzichtet auf den Einsatz von Deuteriumoxid zur Detektion des Amidprotonenaustausches. Die Diskriminierung zwischen Lösungsmittelprotonen und Amidprotonen erfolgt, im Gegensatz zum konventionellen Amidprotonenaustausch mittels Deuteriumoxid, durch eine Sequenz aus rf-Pulsen und Gradienten. Die Magnetisierung der Amidprotonen wird unmittelbar vor der Austauschreaktion vollständig durch einen heteronuklearen  $^{15}\text{N}$ -Filter beseitigt. Danach sind keine Amidprotonensignale mehr im HSQC-NMR-Spektrum vorhanden. Durch den chemischen Austausch der Amidprotonen gegen Protonen des Lösungsmittels Wasser, erlangen die Amidprotonen ihre Magnetisierung zurück. Der chemische Austausch der Amidprotonen gegen Wasserprotonen führt demzufolge zu einem erneuten Anstieg der Signale im NMR-Spektrum aus welchem die Geschwindigkeitskonstante  $k_{HX}$  (Anhang V) der Austauschreaktion über

$$\frac{S(t)}{S_{ref}} = \left( \frac{k_{HX}}{R_1 + R_W} \right) [\exp(-R_W t) - \exp(-(R_1 + k_{HX})t)] \quad [3.9]$$

mit  $S(t)$  als dem Signal nach der Austauschzeit  $t$ ,  $S_{ref}$  als dem Signal vor der New-MEXICO-Pulssequenz,  $R_W$  als der Geschwindigkeitskonstante der Relaxation der Wasserprotonen ( $0,42 \text{ s}^{-1}$ , persönliche Mitteilung Prof. Dr. Jochen Balbach, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und  $R_1$  als der Geschwindigkeitskonstante der longitudinalen Relaxation der Amidprotonen bestimmt werden kann. Die New-MEXICO-Technik ermöglicht die Detektion von Austauschreaktionen in einem Zeitfenster von 10 - 300 ms. Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von  $0,2 \text{ s}^{-1}$  bis  $100 \text{ s}^{-1}$  sind damit einer Analyse zugänglich.

Da die Amidprotonen ihre Magnetisierung nicht nur durch die Austauschreaktion mit dem Wasser, sondern auch durch Nuclear-Overhauser-Effekte (NOE) mit den an den  $^{12}\text{C}$ -Atomen gebundenen Protonen wiedererlangen können, wird die Magnetisierung aller Protonen, darunter auch die  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen sowie die Wasserprotonen, durch einen  $90^\circ$  rf-Puls sowie einen Gradienten zerstört. An diesen Puls schliesst sich eine 55 ms lange Wartezeit an. Wasserprotonen besitzen aufgrund des *radiation damping*-Effekts eine drastisch verkürzte longitudinale Relaxationszeit, so dass diese sehr schnell innerhalb von 55 ms in das thermische Gleichgewicht zurückkehren. Erst daran schliesst sich die oben erwähnte Unterdrückung der Magnetisierung der Amidprotonen durch den heteronuklearen  $^{15}\text{N}$ -Filter an.

Die Experimente bei pH 6,5; 7,0 und 8,0 wurden an einem Bruker Avance II 500 NMR-Spektrometer und die bei pH 9,0 und 10,0 an einem Bruker Avance II 600 NMR-Spektrometer

bei 25°C und einer Proteinkonzentration von 1 mM  $^{15}\text{N}$ -pWT in 50 mM Natriumphosphat-Puffer durchgeführt. Alle NMR-Proben enthielten 10 % (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Spektren wurden mittels NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) prozessiert und mit NMRView (Johnson, 2004) ausgewertet. Die Volumina der Kreuzsignale wurden durch Integration bestimmt. Die exakte Pulssequenz des New-MEXICO-Experimentes sowie des verwendeten HSQC-Experimentes ist in Anhang VII ausgeführt.

### 3.2.7.2. Harnstoff-induzierte Übergangskurven mittels 2D $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-NMR

2D  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance II 600 NMR-Spektrometer bei einer Proteinkonzentration von 1 mM  $^{15}\text{N}$ -pWT und verschiedenen Konzentrationen an Harnstoff in Standardpuffer (3.1.4.) mit 10 % (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen. Die Temperatur betrug 25°C. Zur Herstellung von 1 mM Proteinlösungen in verschiedenen Harnstoffkonzentrationen wurden zunächst zwei Lösungen, 1 mM  $^{15}\text{N}$ -pWT in Standardpuffer und 1 mM  $^{15}\text{N}$ -pWT in Standardpuffer und 5 M Harnstoff, hergestellt. Nach Aufnahme der NMR-Spektren für beide Lösungen wurden definierte Aliquots beider Lösungen entnommen, zur jeweils anderen Lösung zugegeben und NMR-Spektren der daraus resultierenden Lösungen aufgenommen. Auf diese Weise wurden in Schritten von 0,2 M Harnstoff NMR-Spektren in allen Harnstoffkonzentrationen zwischen 0 M und 5 M messbar. Von jeder Harnstoffkonzentration wurde zusätzlich ein Aliquot zur Bestimmung der exakten Harnstoffkonzentration anhand des Brechungsindex entnommen. Stabilitätsparameter (Anhang VI) wurden nach [3.10] (3.2.8.) aus den erhaltenen Übergangskurven bestimmt. Die exakte Pulssequenz des 2D  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-NMR-Experimentes ist in Anhang VIII ausgeführt.

### 3.2.8. Denaturanz-induzierte Übergangskurven

Denaturanz-induzierte Übergangskurven von pWT und pWT<sub>SS</sub> wurden mittels intrinsischer Fluoreszenz bei 320 nm in Standardpuffer an einem FluoroMax2-Fluorimeter (Jobin Yvon spec., Grasbrunn, Deutschland) bei 25°C bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug 2  $\mu\text{M}$ . Denaturanz-induzierte Übergangskurven von pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup> wurden in Standardpuffer unter Zusatz von 0,01 % (w/v) Tween 20 anhand von FRET durch Anregung bei 493 nm und Emission bei 610 nm bestimmt. Einer 2 ml-Probe des Proteins wurde sukzessive eine konzentrierte Harnstoff- oder GdmCl-Lösung zugegeben. Die Wartezeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Denaturanz-Zugaben betrug 2-3 min. Das Fluoreszenzsignal wurde anschließend gegen die mit dieser Methode verbundene Verdünnung der Proteinlösung korrigiert. Die Proteinkonzentration

betrug 0,5  $\mu\text{M}$ . Alle Übergangskurven wurde unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modells mit

$$S = \frac{(y_N + m_N [D]) + (y_U + m_U [D]) \exp\left(\frac{-m_{eq}([D] - [D]_{1/2})}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-m_{eq}([D] - [D]_{1/2})}{RT}\right)} \quad [3.10]$$

angepasst (Fersht, 1999).  $S$  ist das bei der jeweiligen Denaturanzkonzentration gemessene Fluoreszenzsignal. Weiterhin sind  $y_N$  das Signal des nativen Proteins bei 0 M Denaturanz,  $m_N$  der Anstieg des Signals nativer Moleküle mit der Denaturanzkonzentration  $[D]$ ,  $y_U$  das Signal des entfalteten Proteins bei 0 M Denaturanz,  $m_U$  der Anstieg des Signals der entfalteten Moleküle mit der Denaturanzkonzentration  $[D]$ ,  $m_{eq}$  die Kooperativität (2.2.2.) und  $[D]_{1/2}$  die Denaturanzkonzentration bei der 50% der Moleküle denaturiert vorliegen.

### 3.2.9. pH-induzierte Übergangskurven

pH-induzierte Übergangskurven wurden bei einer Proteinkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  pWT im pH-Bereich von 1,6 bis 13 mittels intrinsischer Fluoreszenz bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm und mittels CD-Spektroskopie bei 222 nm aufgenommen. Zur Herstellung der Proteinlösungen bei verschiedenen pH-Werten wurde eine pWT-Stammlösung (200  $\mu\text{M}$ ) gegen reines bi-distilliertes Wasser dialysiert. Weiterhin wurde der pH-Wert einer 50 mM Phosphorsäure-Lösung ( $V = 500$  ml; pH 1,64) mit konzentrierter NaOH schrittweise erhöht. Nach jeweils 0,2-pH Einheiten wurde ein 990  $\mu\text{l}$  Aliquot entnommen und mit 10  $\mu\text{l}$  der pWT-Stammlösung gemischt. Insgesamt war ein NaOH-Volumen von ca. 10 ml nötig, um die Phosphorsäure von pH 1,64 auf pH 13,0 einzustellen. Die Gesamtkonzentration an Phosphat-Ionen-Spezies ist also für alle pH-Werte nahezu identisch. Die pH-Werte der einzelnen Proben wurden nach der Messung erneut bestimmt.

Die pH-Abhängigkeit der Proteinstabilität wurde nach Tanford mittels

$$\Delta G(pH) = -RT \ln(K_0) - RT \ln \frac{(1 + K_D 10^{pH})^n}{(1 + K_N 10^{pH})^m} \quad [3.11]$$

mit  $K_0$  als Gleichgewichtskonstante des Faltungs-Entfaltungsgleichgewichtes,  $K_D$  und  $K_N$  als den Dissoziationskonstanten der protonierbaren Gruppen im entfalteten bzw. nativen Zustand und  $n$  und  $m$  als der Anzahl isoacider Gruppen im entfalteten bzw. nativen Zustand angepasst (Tanford, 1968).

### 3.2.10. Stopped-Flow-Fluoreszenz-Kinetik

Kinetische Messungen wurden an einem SX-20MV *stopped-flow*-Instrument (Applied Photophysics) in Standardpuffer mit unterschiedlichen Konzentrationen an Harnstoff durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Es wurde die Integralfluoreszenz oberhalb von 320 nm detektiert. Wenn nicht anders gekennzeichnet wurden die Messungen bei 25°C durchgeführt. Für jede Kinetik wurden mindestens fünf Messungen akkumuliert.

#### 3.2.10.1. Entfaltungskinetik in Harnstoff

Die Proteinlösung (55  $\mu\text{M}$  pWT) wurde mit 10 Volumina Harnstofflösung gemischt, so dass die Endkonzentration an pWT 5  $\mu\text{M}$  betrug. Die Totzeit des Experiments war 5 ms. Die Fluoreszenzabnahme wurde für 3 - 5 s aufgezeichnet. Die Entfaltungskinetik wurde mit der Summe aus zwei Exponentialfunktionen nach [2.2.] angepasst.

#### 3.2.10.2. Rückfaltungskinetik in Harnstoff

In einfachen Rückfaltungsexperimenten wurde entfaltetes Protein (55  $\mu\text{M}$  pWT) in Standardpuffer / 5 M Harnstoff mit 10 Volumina Rückfaltungspuffer gemischt. Die Fluoreszenz-Zunahme wurde für 1 s aufgezeichnet.

Doppelsprung-Experimente wurden genutzt, um die Rückfaltungskinetik aus dem entfalteten Zustand mit der Tyr47-Pro48 Peptidylprolyl-Bindung in einer *cis*-Konformation zu verfolgen. Dazu wurde pWT für 3 s in 4,3 M Harnstoff entfaltet, bevor die Rückfaltungsreaktion durch Mischung mit dem Rückfaltungspuffer mit variierenden Harnstoffkonzentrationen gestartet wurden. Die Zunahme der Fluoreszenz während der Rückfaltung wurde für 1 s aufgezeichnet. Die Endkonzentration betrug 2  $\mu\text{M}$  pWT.

#### 3.2.10.3. pH-induzierte Rückfaltungs-Kinetik

Zur Messung der pH-induzierten Rückfaltungs-Kinetik wurde die Proteinlösung (55  $\mu\text{M}$  pWT) in bi-destilliertem Wasser / NaOH pH 13 mit 10 Volumina 50 mM Natriumphosphat-Puffer / 50 mM Natriumborat-Puffer, mit dem angegebenen pH-Wert gemischt (Endkonzentration 5  $\mu\text{M}$  pWT). Die Fluoreszenz-Zunahme während der Rückfaltung wurde für 1 s aufgezeichnet.

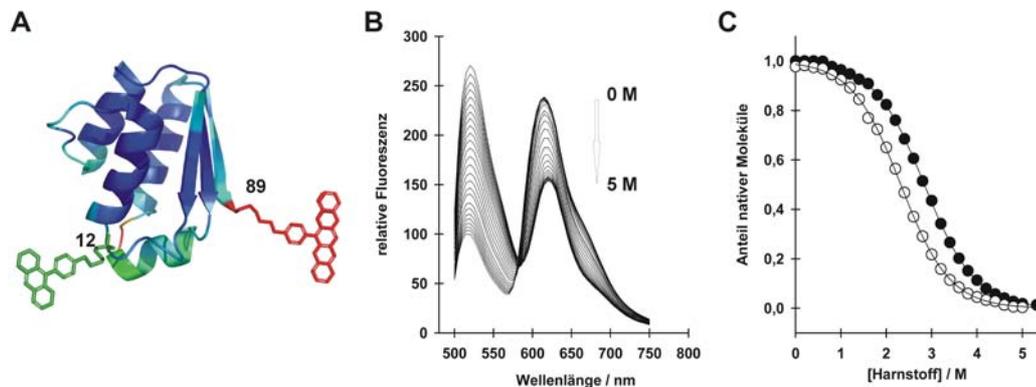
## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Charakterisierung des entfalteten Zustandes von Barstar-pWT

#### 4.1.1. Stabilität des Fluoreszenz-markierten Proteins pWT<sub>SS</sub><sup>AD</sup>

Zur Untersuchung des entfalteten Zustandes von Barstar-pWT wurde die Variante pWT-S12C/S89C (pWT<sub>SS</sub>) mit Alexa Fluor 488 (A488) und Alexa Fluor 594 (A594) (3.2.3.) an Position 12 und 89 markiert (Abb. 4.1.A). Die Überlappung des Emissionsspektrums von A488 mit dem Absorptionsspektrum von A594 sollte einen effektiven Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen beiden Farbstoffen (2.4.3. Abb. 2.6.) ermöglichen.

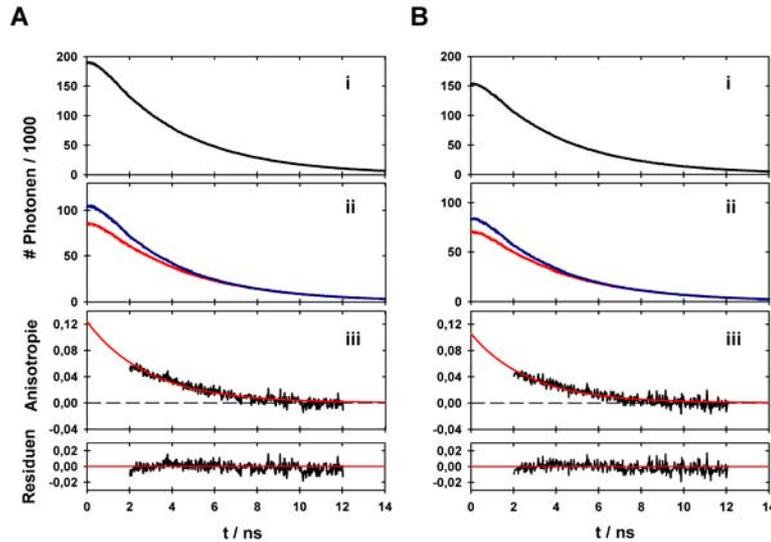
Die Anregung des nativen doppelt-markierten Proteins pWT<sub>SS</sub><sup>AD</sup> bei der für den Donor spezifischen Anregungswellenlänge von 493 nm, liefert neben der erwarteten Donorfluoreszenz auch eine starke Akzeptorfluoreszenz. Dies ist charakteristisch für FRET. Aus dem Spektrum von komplett doppelt-markiertem pWT<sub>SS</sub><sup>AD</sup> lässt sich mit [2.37] und den Quantenausbeuten von A488 und A594 eine Transfereffizienz ( $E$ ) von 0,9 für das gefaltete Protein berechnen. Eine Zugabe des Denaturanz Harnstoff führt zu einem Anstieg der Donor-Fluoreszenz und einem Abfall der Akzeptor-Fluoreszenz (Abb. 4.1.B). Die Stabilität (2.2.2. und 3.2.8.) von pWT<sub>SS</sub><sup>AD</sup> unter nativen Bedingungen beträgt  $10,9 \pm 0,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $m_{eq} = 4,7 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ;  $[D]_{1/2} = 2,33 \pm 0,03 \text{ M}$ ) im Vergleich zu  $12,6 \pm 0,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $m_{eq} = 4,5 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ;  $[D]_{1/2} = 2,84 \pm 0,02 \text{ M}$ ) für das unmarkierte Protein pWT<sub>SS</sub>. Die Markierung des Proteins mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen führt demzufolge nur zu einer leichten Destabilisierung.



**Abbildung 4.1. Struktur von pWT<sub>ss</sub><sup>AD</sup> sowie dessen Stabilität gegenüber Harnstoff im Vergleich zu pWT<sub>ss</sub>.** (A) Struktur von Barstar (pdb-Datei 1BTA). Die Positionen der Farbstoffe sind mittels schematischer Farbstoff-Strukturen gekennzeichnet. (B) Emissionsspektren von 100 % doppelt-markiertem pWT<sub>ss</sub><sup>AD</sup> nach Anregung bei 493 nm bei Harnstoffkonzentrationen von 0 M bis 5 M. (C) Normierte Harnstoff-induzierte Übergangskurven von pWT<sub>ss</sub><sup>AD</sup> und pWT<sub>ss</sub>. Die Experimente wurden in Standardpuffer unter Zusatz von 0,01 % (w/v) Tween 20 und im Falle von pWT<sub>ss</sub> in Gegenwart von 1 mM DTT bei 25°C durchgeführt. Die Proteinkonzentration von pWT<sub>ss</sub><sup>AD</sup> betrug 0,5 µM, die von pWT<sub>ss</sub> 2 µM.

#### 4.1.2. Beweglichkeit beider Fluorophore

Ohne die genaue Kenntnis des Orientierungsfaktors  $\kappa^2$  (2.4.3.) sind Abstandsbestimmungen zwischen den Fluorophoren sehr fehlerbehaftet. Der häufig genutzte Wert von  $\kappa^2 = 2/3$  setzt jedoch voraus, dass beide Fluorophore frei beweglich sind und nicht mit dem Protein interagieren. Dass die Farbstoffe das Protein gering destabilisieren (4.1.1.), ist ein Indiz für eine schwache Protein-Fluorophor-Interaktion. Die Bestimmung der Fluoreszenz-Anisotropie beider Farbstoffe (3.2.5.3.) ermöglicht jedoch detaillierte Aussagen über deren Beweglichkeit (2.4.4.). Für den Donor wurde eine Anisotropie von  $r = 0,105 \pm 0,003$  (für pWT<sub>ss</sub><sup>D</sup>) und für den Akzeptors von  $r = 0,132 \pm 0,007$  (für pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup>) bestimmt. In Gegenwart von 3 M GdmCl wurde für beide Fluorophore ein Wert von  $r = 0,07 \pm 0,01$  gefunden. Aus der Abnahme der Anisotropie in Gegenwart von Denaturanz lässt sich schließen, dass die Beweglichkeit der Fluorophore im nativen Protein verglichen mit dem entfalteten Protein eingeschränkt ist. Da im Gegensatz zum entfalteten Protein die Fluorophore am nativen Protein jedoch nur innerhalb eines durch die Oberfläche des Proteins vorgegebenen Konus frei beweglich sind (Abb. 4.1.A), ist dieser Effekt nicht unerwartet. Verglichen mit CspTm (Schuler *et al.*, 2002) lässt sich sagen, dass die Anisotropiewerte für entfaltetes pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> im zulässigen Bereich für die Annahme von  $\kappa^2 = 2/3$  liegen.



**Abbildung 4.2. Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauern und Rotations-Korrelations-Zeiten des Donor-Fluorophors.** (A) Fluoreszenz-Abfall der Gesamtintensität (i), der parallelen (Blau) und senkrechten (Rot) Komponente der Gesamtintensität (ii) sowie Anisotropie-Abfall (iii) von A488 bei pWT<sub>S12</sub><sup>D</sup>. (B) Fluoreszenz-Abfall der Gesamtintensität (i), der parallelen (Blau) und senkrechten (Rot) Komponente der Gesamtintensität (ii) sowie Anisotropie-Abfall (iii) von A488 bei pWT<sub>SS</sub><sup>D</sup>. Die Messungen wurden in Standardpuffer in Gegenwart von 0,01 % (w/v) Tween 20 bei 25°C, einer Proteinkonzentration von 1 nM und einer Laserleistung von 50  $\mu$ W durchgeführt.

Messungen des zeitaufgelösten Anisotropie-Abfalls können zusätzliche Informationen über die Beweglichkeit der Fluorophore geben. Für die Variante pWT<sub>S12</sub><sup>D</sup> wurde für A488 eine Fluoreszenz-Lebensdauer von  $\tau = 3,92 \pm 0,01$  ns und eine Rotationskorrelations-Zeit von  $\phi = 2,87 \pm 0,10$  ns gefunden (Abb. 4.2 A). Der Fluoreszenz-Abfall wie auch der Anisotropie-Abfall konnten mit einer einfachen Exponentialfunktion angepasst werden. Aus der Fluoreszenz des im hydrophoben Kern des Proteins verborgenen Trp 53 der Proteinvariante W38F/W44F erhielten Swaminathan *et al.* (1996)  $\phi = 4,1$  ns für das native Protein und 1,6 ns für das entfaltete Protein in 4,2 M GdmCl. Wong *et al.* (1997) fanden anhand von NMR-Relaxationsexperimenten an pWT\* einen Wert von  $\phi = 5,5$  ns. Die anhand der A488-Fluoreszenz gefundene Rotations-Korrelations-Zeit ist demnach signifikant geringer als die von Swaminathan *et al.* und Wong *et al.* für das native Protein gefundene. Dies kann als Indiz für die größere Beweglichkeit von A488 an der Oberfläche angesehen werden kann. Eine völlig freie Bewegung von A488 scheint jedoch nicht gegeben zu sein, da die gefundene Rotations-Korrelations-Zeit signifikant größer als die für Trp53 im entfalteten Protein gefundene ist. Abstandsmessungen in nativem pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup> sind demzufolge fehlerbehaftet.

Um Unterschiede in der Beweglichkeit des Fluorophors zwischen den beiden Positionen 12 und

89 auszuschließen, wurden die Messungen mit der Variante pWT<sub>SS</sub><sup>D</sup>, die den Donor zu gleichen Teilen an Position 12 oder 89 trägt (3.2.3.), wiederholt (Abb. 4.2. B). Ein Vergleich der Rotations-Korrelations-Zeiten sowie der Fluoreszenz-Lebensdauer beider Varianten gibt demnach Aufschluss über eventuelle Unterschiede zwischen beiden Regionen. Tabelle 4.1. zeigt einen Vergleich der Parameter beider Varianten.

**Tabelle 4.1. Parameter der zeitaufgelösten Fluoreszenz- und Anisotropiemessungen**

Position	$\phi$ / ns	$\tau$ / ns
12	$2,87 \pm 0,10$	$3,94 \pm 0,01$
12 oder 89	$2,73 \pm 0,10$	$3,92 \pm 0,01$

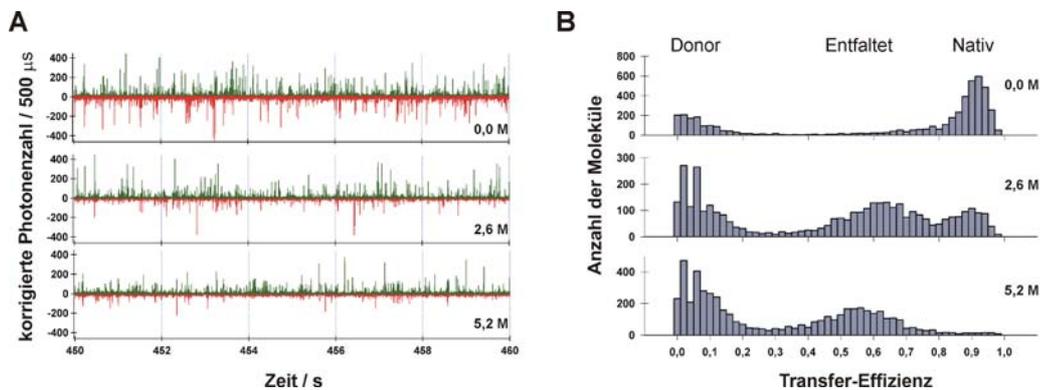
Da sowohl die Fluoreszenz-Lebensdauern wie auch die Rotations-Korrelations-Zeiten beider Varianten sehr ähnlich sind, können sowohl Unterschiede in der Quantenausbeute wie auch Unterschiede in der Beweglichkeit von A488 zwischen beiden Positionen ausgeschlossen werden.

Aus den Anisotropie-Messungen kann geschlossen werden, dass für das entfaltete Protein der Orientierungsfaktor von  $\kappa^2 = 2/3$  für beide Farbstoffe an beiden Positionen gerechtfertigt ist.

#### 4.1.3. FRET-basierte Einzelmolekülspektroskopie mit pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup>

Wie in 2.4.3. ausgeführt, charakterisiert der Förster-Radius den Abstand zwischen Donorfarbstoff und Akzeptorfarbstoff, bei dem die Transfer-Effizienz ( $E$ ) genau 50 % ist. Bei  $R_0$  ist der FRET am sensitivsten gegenüber Abstandsänderungen zwischen den beiden Farbstoffmolekülen. Für das Farbstoffpaar A488/A594 ist  $R_0 = 56 \text{ \AA}$ .

In Abbildung 4.3. sind ausgewählte Zeitspuren von Einzelmolekül-Experimenten dargestellt. In eine hochverdünnte Lösung des markierten Proteins (130 pM) wurde der Laserstrahl eines 488 nm cw-Lasers fokussiert (3.2.6.). Diffundiert ein einzelnes Molekül pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup> durch das fokale Volumen des Lasers, wird der Donor-Farbstoff A488 angeregt. Befindet sich der Akzeptor-Farbstoff in unmittelbarer Nähe zum Donor, wird die Anregungsenergie strahlungslos auf den Akzeptor übertragen, der die Energie in Form von Fluoreszenz wieder abgibt (2.4.3.). Bei jedem Transit eines Moleküls durch den Fokus, wird ein Bündel (*burst*) Photonen von den jeweiligen Farbstoffen abgegeben. In entfaltenen Proteinen ist der Abstand zwischen beiden Farbstoffen größer als im nativen Protein. Entsprechend geringer ist die Transfer-Effizienz. In diesem Fall gibt der Donorfarbstoff den Großteil der Anregungsenergie in Form von Fluoreszenz wieder ab.



**Abbildung 4.3. Zeitspuren (A) und FRET-Histogramme (B) ausgewählter Einzelmolekülexperimente.** Die Zeitspuren in (A) zeigen die korrigierte Photonenzahl im Donor-Kanal (Grün) und Akzeptor-Kanal (Rot) bei den angegebenen Harnstoffkonzentrationen. Aus den Zeitspuren wurden FRET-Histogramme (B) mittels [2.37] berechnet. „Nativ“ bezeichnet die Population an nativen und „Entfaltet“ die Population an entfalteten Molekülen. „Donor“ steht für Moleküle die keinen Akzeptor tragen. Die Proteinlösung enthielt 130 pM pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup> in Standardpuffer unter Zusatz von 0,01 % (w/v) Tween 20. Die Laserleistung betrug 25 µW und die Temperatur 25°C.

Dieser Effekt ist anhand der Zeitspuren deutlich erkennbar (Abb. 4.3. A). Während bei 0 M Harnstoff sowohl im Donor-Kanal wie auch im Akzeptor-Kanal Einzelmolekül-Ereignisse detektierbar sind, sinkt deren Anzahl im Akzeptorkanal mit steigender Harnstoffkonzentration. In den FRET-Histogrammen spiegelt sich dieser Effekt wider. Bei 0 M Harnstoff liegen zwei Populationen an Molekülen vor. In Übereinstimmung mit dem aus den Fluoreszenzspektren erhaltenen Wert zeigt die Population nativer Moleküle eine mittlere Transfer-Effizienz von 0,9 (Abb. 4.1.B). Bei sehr niedrigen Transfer-Effizienzen ( $E < 0,2$ ) findet sich die Population an Molekülen, die keinen Akzeptor-Farbstoff tragen. Bei Erhöhung der Harnstoffkonzentration auf 2,6 M entsteht eine dritte Population bei mittleren Transfer-Effizienzen (Abb. 4.1. B). Diese resultiert aus entfaltenen Molekülen mit einem größeren Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Bei 5,2 M Harnstoff liegen schließlich alle Moleküle entfaltet vor.

#### 4.1.4. FRET-Histogramme von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> in Harnstoff und GdmCl

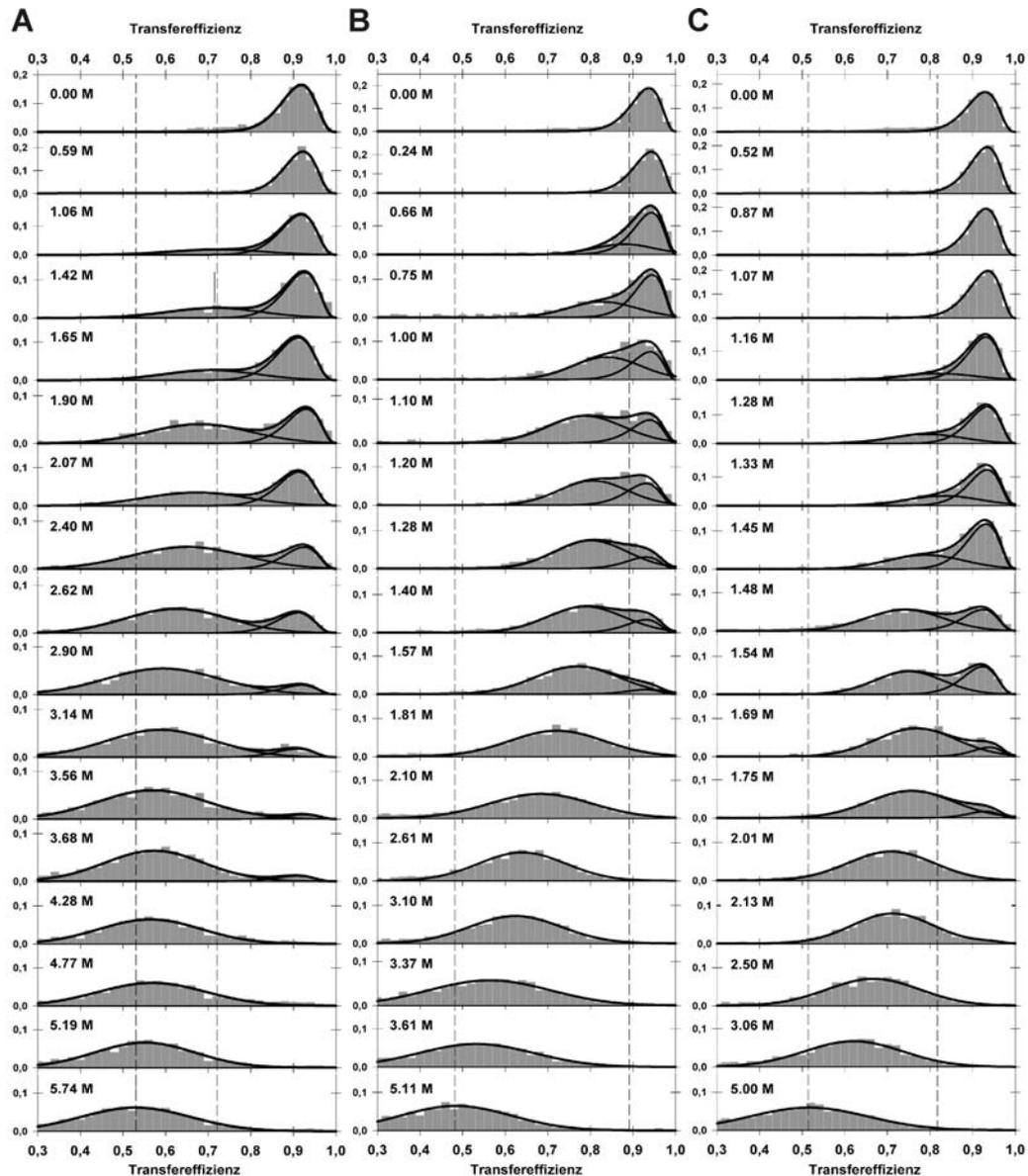
Die Entfaltung von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> wurde sowohl in Harnstoff als auch in GdmCl untersucht. Abbildung 4.4. zeigt die normierten FRET-Histogramme bei verschiedenen Konzentrationen an Harnstoff und GdmCl. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Verteilung von Molekülen die ausschließlich den Donor-Fluorophor tragen, weggelassen.

Mit dem Anstieg beider Denaturanzien sinkt die Population an nativen Molekülen, während die zweite Population der entfalteten Moleküle bei niedrigeren Transfer-Effizienzen zunimmt (Abb. 4.4. A und B). Insgesamt wurden nur native und entfaltete Moleküle detektiert. Im thermodynamischen Gleichgewicht verhält sich pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> demnach wie ein Zwei-Zustandsfalter. Das steht im Einklang mit dem Verhältnis aus van't Hoff-Enthalpie und kalorimetrischer Enthalpie ( $\Delta H_{\text{van't Hoff}}/\Delta H_{\text{cal}}$ ) von 1 für WT (Schöppe *et al.*, 1997).

Um zu testen, ob pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> in der Lage ist, an seinen biologischen Interaktionspartner, Barnase, zu binden, wurde pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> in Gegenwart von Barnase mit GdmCl denaturiert (Abb. 4.4.C). Da beide Proteine im Komplex durch die intermolekularen Interaktionen stabilisiert werden (Martinez *et al.*, 1995), sollte die Denaturierung von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> bei höheren GdmCl-Konzentrationen erfolgen. In der Tat ist pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> in Gegenwart von Barnase bei 1 M GdmCl noch vollständig nativ. In Abwesenheit von Barnase denaturiert pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> jedoch schon bei 0,75 M GdmCl. Rein qualitativ kann der Schluss gezogen werden, dass pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> seine Fähigkeit an Barnase zu binden nicht eingebüsst hat.

Da sich die Position der Verteilung nativer Moleküle mit steigender Konzentration an Harnstoff oder GdmCl nicht ändert, kann geschlossen werden, dass die Quantenausbeuten beider Farbstoffe nicht wesentlich durch die Denaturanzien beeinflusst werden. Eine unabhängige Bestimmung der Quantenausbeuten beider an das Protein gekoppelter Fluorophore bestätigt dieses Ergebnis (Anhang II). Da auch Änderungen der Beweglichkeit der Fluorophore eine Änderung des  $\kappa^2$ -Wertes und damit eine scheinbare Änderung der Transfereffizienz bewirken würde, kann aus der Unabhängigkeit der Position der Verteilung nativer Moleküle geschlossen werden, dass auch die Beweglichkeit beider Farbstoffe im nativen Protein durch die Denaturanzien nicht beeinflusst ist. Eine Interaktion der Farbstoffe mit der Proteinoberfläche ist daher unwahrscheinlich.

Die Denaturanz-Unabhängigkeit der mittleren Transfer-Effizienz der nativen Moleküle war jedoch unerwartet, da Lakshmikanth *et al.* (2001) für die nativen Moleküle in zeitaufgelösten FRET-Experimenten ab Denaturanzkonzentrationen > 3 M Harnstoff und > 1,5 M GdmCl einen kontinuierlichen Anstieg des Abstandes zwischen W53 und C82 in der Variante W38F/W44F/C40A fanden.



**Abbildung 4.4. Normierte FRET-Histogramme von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> in Harnstoff und GdmCl.**

(A) FRET-Histogramme bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen. (B) FRET-Histogramme bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen. (C) FRET-Histogramme in GdmCl in Gegenwart von 90 nM unmarkierter Barnase. Die Histogramme wurden wie in 3.2.6.2. beschrieben angepasst. Die Proteinlösung enthielt 130 pM pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> in Standardpuffer in Gegenwart von 0,01 % (w/v) Tween 20. Die Laserleistung betrug 25  $\mu$ W und die Temperatur 25°C.

Aufgrund der geringeren Stabilität von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> im Vergleich zu der von Lakshmikanth *et al.* genutzten Variante (W38F/W44F/C40A), konnte dieser Effekt weder in Harnstoff noch in GdmCl beobachtet werden. Die nativen pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup>-Moleküle sind ab 3 M Harnstoff bzw. 1,5 M GdmCl stark unterrepräsentiert, so dass geringe Änderungen der mittleren Transfer-Effizienz

nicht sicher bestimmt werden können. Die Stabilisierung von  $pWT_{ss}^{DA}$  durch die Bindung an Barnase erhöht den Anteil nativer Moleküle  $< 1,75 \text{ M GdmCl}$ . Bis zu einer GdmCl-Konzentration von  $1,75 \text{ M}$  konnte jedoch keine Änderung der mittleren Transfer-Effizienz beobachtet werden. Da die Eigenschaften von nativem Barstar im Komplex mit Barnase jedoch sicherlich nicht mit denen des freien Barstars identisch sind, kann keine Aussage über das Verhalten des freien nativen Proteins bei höheren Denaturanzkonzentrationen getroffen werden.

#### 4.1.5. Vergleich der Stabilität aus Ensemble- und Einzelmolekülexperimenten

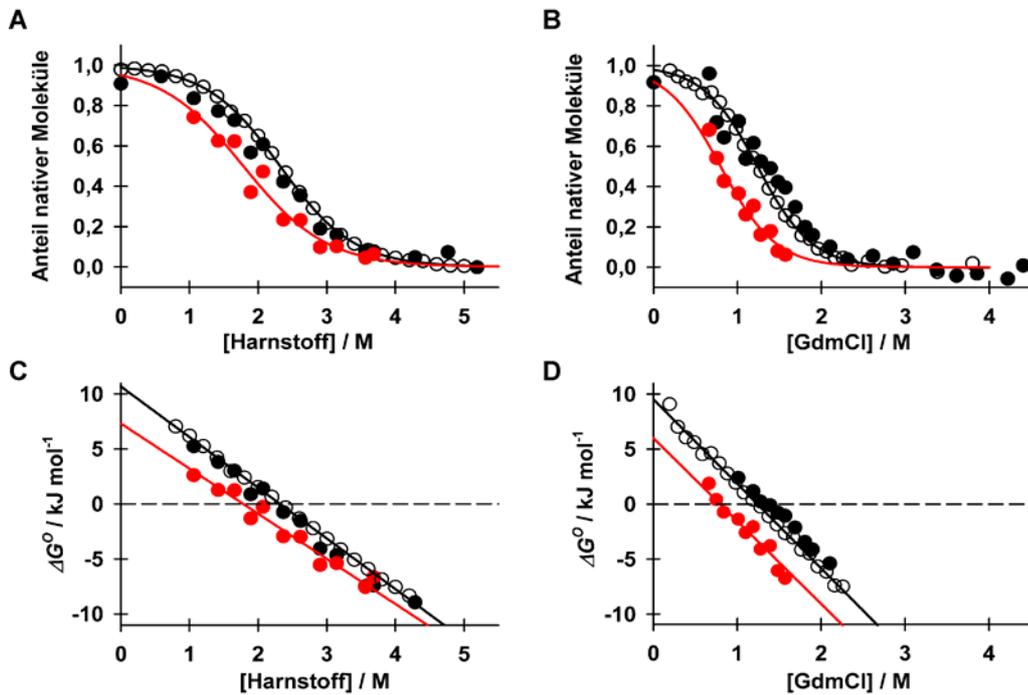
Aus den Einzelmolekülexperimenten ist die Stabilität von  $pWT_{ss}^{DA}$  direkt aus dem Verhältnis der Flächen der Verteilungen nativer und entfalteter Moleküle über [2.7] zugänglich. Zusätzlich können die im Ensemble-Experiment erhaltenen Denaturanz-induzierten Übergangskurven aus den FRET-Verteilungen berechnet werden. Bei jeder Denaturanzkonzentration sollte das Ensemble-Signal dem Mittelwert der Transfer-Effizienz jedes FRET-Histogrammes über

$$\langle E \rangle_{Ensemble} = \sum_i h_i E_i \quad [4.1]$$

mit  $h_i$  als der relativen Häufigkeit des Bins  $i$  und  $E_i$  als dessen Transfer-Effizienz entsprechen. Ein Vergleich der mittels Ensemble-Messungen erhaltenen Übergangskurven mit denen aus den Einzelmolekülexperimenten über [4.1] erhaltenen, liefert eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden (Tab. 4.2., Abb. 4.5.).

**Tabelle 4.2. Vergleich der mit verschiedenen Methoden erhaltenen Stabilitätsparameter von  $pWT_{ss}^{DA}$ .** Aus Ensemble-Experimenten (I), und den aus den Einzelmolekül-Experimenten mittels [4.1] berechneten Ensemble-Daten (II) sowie aus den relativen Flächen nativer und entfalteter Moleküle der FRET-Histogramme (III) berechnete Stabilitätsparameter.

Denaturanz	Methode	$[D]_{1/2} / \text{M}$	$m_{eq} / \text{kJ} \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-2}$	$\Delta G^O / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
<b>Harnstoff</b>	I	$2,33 \pm 0,03$	$4,7 \pm 0,2$	$10,9 \pm 0,6$
	II	$2,20 \pm 0,14$	$4,8 \pm 0,2$	$10,5 \pm 0,5$
	III	$1,79 \pm 0,22$	$4,3 \pm 0,3$	$7,7 \pm 0,8$
<b>GdmCl</b>	I	$1,24 \pm 0,13$	$7,7 \pm 0,5$	$9,8 \pm 0,8$
	II	$1,35 \pm 0,10$	$7,2 \pm 0,3$	$9,7 \pm 0,4$
	III	$0,84 \pm 0,12$	$8,5 \pm 0,7$	$7,1 \pm 0,8$



**Abbildung 4.5. Vergleich der mit Ensemble- und Einzelmolekülspektroskopie detektierten Harnstoff- und GdmCl-induzierten Entfaltung.** Übergangskurven von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> aufgenommen mittels Akzeptorfluoreszenz im Ensemble (weiß) (I), mittels Einzelmolekülspektroskopie und [4.1] (II) sowie aus den relativen Flächen der FRET-Histogramme (III) in Harnstoff (A) und GdmCl (B). Freie Enthalpien der Entfaltung von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> in Harnstoff (C) und GdmCl (D). Alle Messungen wurden in Standardpuffer in Gegenwart von 0,01 % (w/v) Tween 20 bei 25°C durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug im Ensemble-Experiment 0,5 μM und im Einzelmolekülexperiment 130 pM.

Allerdings sind die über die relativen Flächen der Verteilungen in den FRET-Histogrammen bestimmten Stabilitäten systematisch niedriger (Tab. 4.2, Abb. 4.5.). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass entfaltete Moleküle aufgrund ihrer Größe langsamer durch das fokale Volumen diffundieren als native Moleküle. Die Anzahl der von einem entfaltenen Molekül stammenden Photonen ist deshalb größer als die von einem nativen Molekül stammenden. Aus diesem Grunde ist die Verteilung entfalteter Moleküle im FRET-Histogramm überrepräsentiert. Allerdings sollte sich dieser Effekt auch im Falle der über [4.1] bestimmten Übergangskurven niederschlagen. Um Stabilitäten aus dem Ensemble-Signal wie auch dem nach [4.1] berechneten Ensemble-Signal mittels [3.10] zu bestimmen, wird eine lineare Abhängigkeit der Signale für die nativen und entfaltenen Moleküle von der Denaturanzkonzentration angenommen. Ein Blick auf die FRET-Histogramme zeigt jedoch, dass dies nicht gerechtfertigt

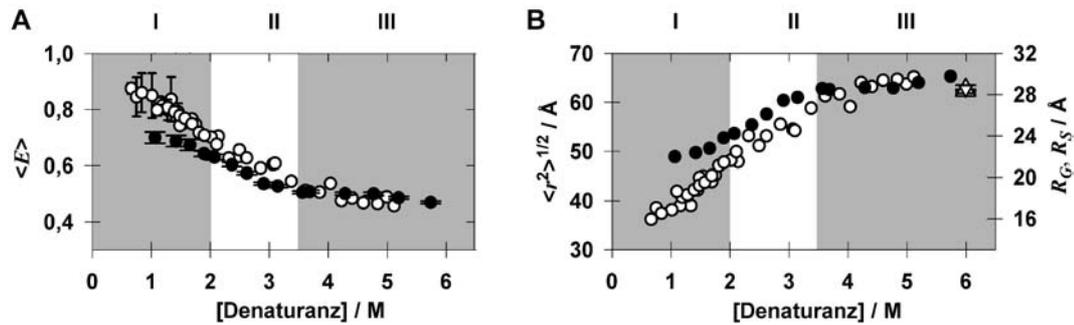
ist. Die mittlere Transfer-Effizienz  $\langle E \rangle$  der Verteilung der entfalteten Moleküle verschiebt sich mit steigenden Konzentrationen an Harnstoff und GdmCl signifikant und nicht-linear zu niedrigeren Werten (Abb. 4.4 und 4.6). Diese Verschiebung kann bei der Auswertung der Ensemble-Signale mittels [3.10] nicht von einem Entfaltungsprozess unterschieden werden. Eine Überschätzung der Stabilität des Proteins ist die Folge und könnte die Diskrepanz zwischen beiden Auswertungsmethoden erklären. Die Stabilität von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> sollte zwischen der aus den Ensemble- und der aus den relativen Flächen der FRET-Histogramme ermittelten liegen.

#### 4.1.6. Der entfaltete Zustand von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> in Harnstoff und GdmCl

Die Verschiebung der mittleren Transfer-Effizienz der Verteilung entfalteter Moleküle in Harnstoff und GdmCl (Abb. 4.4.) kann nicht auf einer Änderung der Quantenausbeute der Donor- und Akzeptorfluorophore bei Zugabe von Denaturanz beruhen (Anhang II). In Einzelmolekülexperimenten wurde dieser Effekt auch bei anderen Proteinen wie CI2 (Deniz *et al.*, 2000), CspTm (Schuler *et al.*, 2002), Protein L (Sherman und Haran, 2006), Im9 (Tezuka-Kawakami *et al.*, 2006), RNaseH (Kuzmenkina *et al.*, 2005 und 2006), ACBP (Laurence *et al.*, 2005) und Sup35 (Mukhopadhyay *et al.*, 2007) beobachtet. Überdies ist im Gegensatz zu den Polypeptidketten entfalteter Proteine die mittlere Transfer-Effizienz von rigiden Polyprolylpeptiden, die ebenfalls mit A488 und A594 markiert wurden, von der Denaturanzkonzentration unabhängig (Schuler *et al.*, 2002). Das Verhalten der entfalteten Moleküle kann demzufolge nur als Expansion der entfalteten Polypeptidkette bei Zugabe von Denaturanz und umgekehrt, als Kollaps bei Abnahme der Denaturanzkonzentration interpretiert werden.

In Abbildung 4.6. A sind die aus den Histogrammen (Abb. 4.4.) ermittelten und korrigierten (3.2.6.2.) mittleren Transfer-Effizienzen  $\langle E \rangle$  der Verteilung entfalteter Moleküle als Funktion der Konzentration an Harnstoff und GdmCl dargestellt. Oberhalb von 3,5 M Denaturanz sind die Transfer-Effizienzen der entfalteten Moleküle in beiden Denaturanzien identisch (Region III). Mit Abnahme der Konzentrationen an Harnstoff und GdmCl steigt  $\langle E \rangle$  jedoch an (Region II). Ab 2 M Denaturanz divergieren die Werte in Harnstoff von denen in GdmCl, so dass bei 1 M Denaturanz  $\langle E \rangle$  in Harnstoff 0,7 und in GdmCl 0,8 ist (Region I). Die Divergenz resultiert aus dem Plateau in das  $\langle E \rangle$  ab 1,5 M Harnstoff mündet, während die Werte für  $\langle E \rangle$  in GdmCl weiter ansteigen.

Zur Berechnung von intramolekularen Abständen aus den mittleren Transfer-Effizienzen kann [2.37] nicht genutzt werden, da der Abstand zwischen beiden Fluorophoren starr ist. Die direkte



**Abbildung 4.6.** Effekt der Denaturanzkonzentration auf die korrigierte mittlere Transfer-Effizienz (A) sowie auf die Dimensionen der Polypeptidkette (B). GdmCl (Weiß) und Harnstoff (Schwarz).  $R_G$  sowie  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$  wurden mittels [2.20], [2.23], [2.37] und [2.38] berechnet. Der hydrodynamische Radius  $R_S$  (aufrechtes Dreieck) und der Gyrationenradius (umgekehrtes Dreieck) wurden der Literatur entnommen (Gast *et al.*, 2003; Kohn *et al.*, 2005).

Verteilungsfunktion der End-zu-End-Abstände lässt sich jedoch auch nicht direkt aus der FRET-Verteilung entfalteter Moleküle bestimmen, da auch Faktoren wie zufällige Intensitätsfluktuationen (*shot noise*), *photobleaching* oder die Photodynamik der Fluorophore (Triplet-Zustände) die Form der FRET-Verteilung beeinflussen (Gopich und Szabo, 2003; Gopich und Szabo, 2005; Antonik *et al.*, 2006; Nir *et al.*, 2006). Unter der Bedingung, dass die Dynamik der entfalteten Polypeptidkette wesentlich schneller ist als die Zeitauflösung des Experimentes, kann die mittlere Transfereffizienz  $\langle E \rangle$  jedoch über

$$\langle E \rangle = \frac{\int_0^L E(r) P(r) dr}{\int_0^L P(r) dr} \quad [4.2]$$

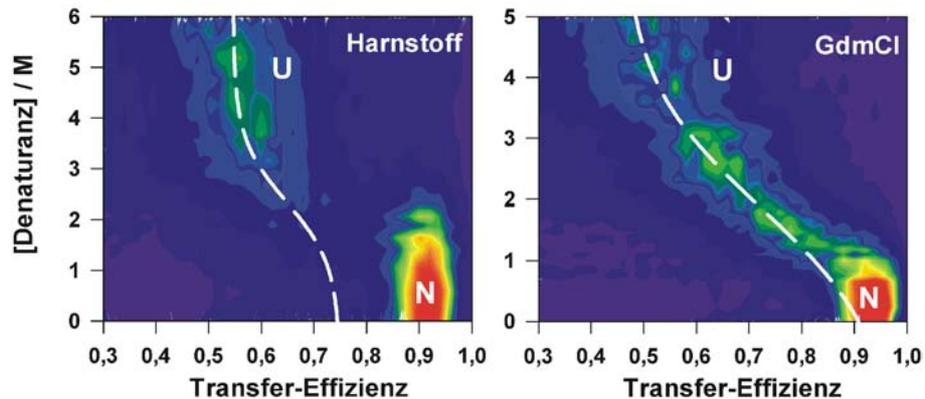
mit  $P(r)$  als Verteilungsfunktion der möglichen End-zu-End-Abstände der Polypeptidkette und  $L$  als deren Kontourlänge berechnet werden (Gopich und Szabo, 2003). Bei Annahme des Gauss'schen Zufallsknäuels [2.20] als Modell für die entfaltete Polypeptidkette (siehe 2.3.) kann  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$  und mit [2.19] und [2.23] auch der Gyrationenradius  $R_G$  der gesamten Polypeptidkette mittels [2.37] und [2.38] aus  $\langle E \rangle$  berechnet werden (Abb. 4.6 B). Bei hohen Denaturanzkonzentrationen (5 M Harnstoff und 5 M GdmCl) wird mit dieser Analyse ein Gyrationenradius  $28,4 \pm 0,3 \text{ \AA}$  gefunden (Abb. 4.6. B). Aus dem Skalierungsgesetz von Kohn *et al.* (2004) wird für ein Polypeptid bestehend aus 90 Aminosäureresten ein Wert von  $28,4 \pm 0,4 \text{ \AA}$  in hohen Denaturanzkonzentrationen erwartet. Diese hervorragende Übereinstimmung demonstriert die

Zuverlässigkeit der Methode zur Bestimmung von Abständen in entfaltenen Proteinen. Für in 6 M Harnstoff denaturierten Barstar-pWT wurde mittels dynamischer Lichtstreuung ein hydrodynamischer Radius ( $R_S$ ) von  $28,3 \pm 0,7 \text{ \AA}$  bestimmt. Daraus resultiert ein Verhältnis für  $R_G/R_S$  von 1. Laut Theorie (Tanford, 1961) wäre allerdings ein Wert von 1,51 erwartet worden. Diese Abweichung von der Theorie wurde experimentell ebenfalls für andere Proteine gefunden (Sherman und Haran, 2006; Wilkins *et al.*, 1999) und könnte ein Hinweis für die generelle Präsenz von Reststrukturen in entfaltenen Proteinen darstellen. In der Tat gibt es experimentelle Hinweise für das Vorhandensein von instabilen Reststrukturen im entfaltenen Barstar (Nölting *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1996; Bhavesh *et al.*, 2004).

Wie schon im Verhalten von  $\langle E \rangle$  angedeutet, sinkt auch  $R_G$  der entfaltenen Kette mit sinkender Denaturanzkonzentration (Region II, Abb. 4.6. B). Als physikalische Triebkraft dieses Kollapses wurde häufig die Zunahme des hydrophoben Effektes mit sinkender Denaturanzkonzentration diskutiert (Dill *et al.*, 1995). Kürzlich gelang jedoch der Nachweis, dass auch unstrukturierte Polypeptide ohne bemerkenswerte hydrophobe Oberflächen wie (Ser-Gly)<sub>16</sub> mit sinkenden Denaturanzkonzentrationen kollabieren (Möglich *et al.*, 2006). Die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrücken erscheint deshalb als Hauptursache für den Kollaps. Schon früh wurde die Fähigkeit von Harnstoff und GdmCl erkannt, als Wasserstoffbrücken-Donoren und Akzeptoren zu wirken und an Polypeptidketten zu binden (Schellman, 1987; 2002; Makhatadze und Privalov, 1995). Eine Senkung der Denaturanzkonzentration könnte damit zu freien Wasserstoffbrücken-Donoren oder Akzeptoren führen, die durch intramolekulare Wasserstoffbrücken in der Polypeptidkette ausgeglichen werden.

Bei sehr niedrigen Denaturanzkonzentrationen (Region I, Abb. 4.6. B) ist der Gyrationradius des entfaltenen pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> in GdmCl verglichen mit dem in Harnstoff wesentlich geringer. Aus Abb. 4.6. B geht hervor, dass das entfaltete Protein in 1 M GdmCl einen Gyrationradius ähnlich dem des nativen Proteins von 16 Å besitzt. In 1 M Harnstoff dagegen ist  $R_G = 22 \text{ \AA}$ . Werden die Werte für  $R_G$  oder auch für  $\langle E \rangle$  mit einer sigmoiden Funktion angepasst und auf 0 M Denaturanz extrapoliert, erhält man paradoxer Weise zwei völlig verschiedene Werte für  $\langle E \rangle$  oder  $R_G$  (Abb. 4.7). Dies ist anhand der FRET-Histogramme in Abb. 4.7. dargestellt. Die Anpassung der Werte für  $\langle E \rangle$  würde für Bedingungen ohne Denaturanz, d.h. [Harnstoff] = 0 M und [GdmCl] = 0 M, unterschiedliche Transfer-Effizienzen für den entfaltenen Zustand in Harnstoff im Vergleich zu GdmCl liefern. Während bei 0 M Harnstoff  $\langle E \rangle = 0,75$  erwartet würde, erhält man im Falle von GdmCl  $\langle E \rangle = 0,9$ . Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die empirische Anpassung bei niedrigen Denaturanzkonzentrationen versagt.

Die Ursache der Diskrepanz zwischen Harnstoff und GdmCl bei niedrigen Denaturanzkonzentrationen kann nur auf dem Ladungsunterschied der beiden Denaturanzien Harnstoff und

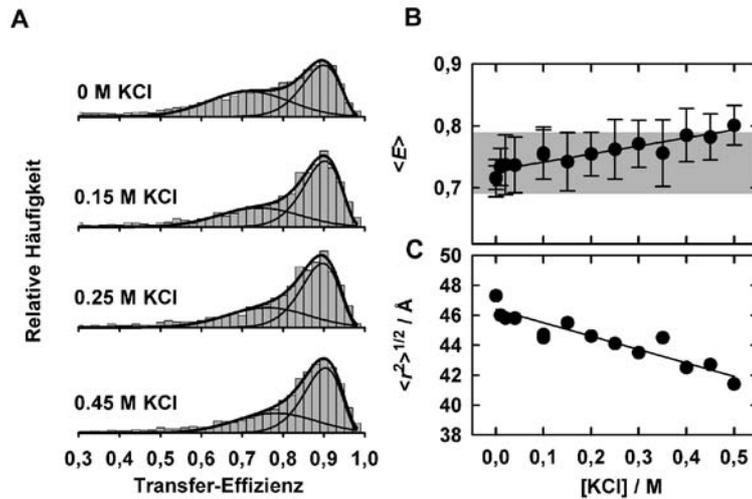


**Abbildung 4.7. Kontour-Diagramm der FRET-Histogramme in Harnstoff und GdmCl.** Die Farbskala entspricht den relativen Häufigkeiten der FRET-Histogrammen in Abb. 4.4. ( $h_i = 0 - 0,14$ ; blau bis rot). Populationen an entfalten und nativen Molekülen sind mit (U) und (N) gekennzeichnet. Die weiße Linie entspricht einer sigmoiden Anpassung der mittleren Transfer-Effizienzen der entfalten Moleküle mittels  $y = a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$ . Die Abbildung für Harnstoff enthält 630 und die für GdmCl 875 Datenpunkte.

GdmCl beruhen, denn beide Substanzen sind sich strukturell sehr ähnlich. Im Gegensatz zu Harnstoff ist GdmCl jedoch ein Salz. Bei pH 8,0 enthält Barstar pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup> 18 negative (11 Glu, 4 Asp, A488, A594,  $\alpha\text{COOH}$ ) sowie 10 positive Ladungen (6 Lys, 3 Arg,  $\alpha\text{NH}_2$ ). Da die Netto-Ladung der Kette -8 ist, sollten elektrostatische Abstoßungen dominieren. In niedrigen Harnstoffkonzentrationen ist dann eine Balance zwischen den attraktiven Kollaps-treibenden Kräften (Wasserstoffbrücken und hydrophober Effekt) und den abstoßenden elektrostatischen Kräften vorstellbar. Aus Molekular-Dynamik-Simulationen ist jedoch bekannt, dass ionische Interaktionen in Peptiden durch GdmCl stark destabilisiert werden (O'Brien *et al.*, 2007). Dieser Effekt resultiert aus der Präferenz des Guanidiniumions Wasserstoffbrücken mit vorwiegend negativ geladenen Aminosäureresten der Polypeptidkette auszubilden. Zusätzlich ist durch die Ionen des GdmCl ein Abschirmungs-Effekt (*screening*) der intrinsischen Ladungen der Kette zu erwarten. Diese Interpretation der Daten basiert auf der Theorie von Alonso, Stigter und Dill (Stigter und Dill, 1990; Alonso *et al.*, 1991; Stigter *et al.*, 1991), die eine Abnahme des Gyrationradius der entfalten Kette mit steigender Ionenstärke vorraussagt.

#### 4.1.7. Der Einfluss von KCl auf den entfalten Zustand von pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup>

Die in 4.1.6. gegebene Interpretation der Diskrepanz zwischen den Gyrationradien in Harnstoff und GdmCl ist experimentell überprüfbar. In 1,4M Harnstoff erreicht der Gyrationradius der



**Abbildung 4.8. Effekt von KCl auf entfaltenen Barstar pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> bei 1,4 M Harnstoff.** (A) FRET-Histogramme bei verschiedenen KCl-Konzentrationen. (B) Mittlere Transfer-Effizienz  $\langle E \rangle$  von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> als Funktion der KCl-Konzentration sowie Unterschied in  $\langle E \rangle$  zwischen 1,4 M Harnstoff und 1,4 M GdmCl (grau schattiert). (C)  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$  als Funktion der KCl-Konzentration. Die Berechnung erfolgte unter Nutzung von [2.20], [2.37] und [2.38]. Durchgezogene Linien sind lineare Fits der Daten. Das Experiment wurde in Standardpuffer in Gegenwart von 0,01 % (w/v) Tween 20 und 50  $\mu$ W Laser-Leistung bei 25°C durchgeführt.

Kette ein Plateau (Abb. 4.6. B) und elektrostatische Interaktionen sollten die Größe der Kette determinieren. Eine Zugabe des Salzes KCl sollte diese Interaktionen durch eine Abschirmung (*screening*) der intrinsischen Ladungen der Polypeptidkette vermindern und den Gyrationradius senken. Bei 1,4 M Harnstoff wurden Einzelmolekülexperimente bei verschiedenen KCl-Konzentrationen durchgeführt (Abb. 4.8. A und B). Vorher wurde sichergestellt, dass die Quantenausbeute der Farbstoffe unabhängig von der KCl-Konzentration ist (Anhang III). Abbildung 4.8. A zeigt einen geringen, jedoch signifikanten Anstieg der mittleren Transfer-Effizienz der Verteilung entfalteter Molekül mit steigender KCl-Konzentration. Ein Vergleich der Transfer-Effizienzen bei 1,4 M Harnstoff ( $\langle E \rangle = 0,7$ ) mit denen bei 1,4 M GdmCl ( $\langle E \rangle = 0,8$ ) (Abb. 4.6. A) zeigt einen Unterschied von  $\Delta \langle E \rangle = 0,1$  zwischen den Werten mit und ohne postulierte elektrostatische Abstoßungen.

Mit steigender KCl-Konzentration wird ein Anstieg von 0,7 auf 0,8 für  $\langle E \rangle$  beobachtet. Da pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> zusätzlich durch KCl stabilisiert wird, konnte  $\langle E \rangle$  bei KCl-Konzentrationen  $> 0,5$  M aufgrund der nur noch gering populierten Verteilung entfalteter Moleküle nicht mehr sicher bestimmt werden. Der Anstieg in  $\langle E \rangle$  entspricht einem Abfall in  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$  von 6 Å. Die

Tatsache, dass der erwartete Anstieg von 0,7 auf 0,8 schon mit 0,5 M KCl erreicht wurde, während dafür 1,4 M GdmCl nötig waren, beruht voraussichtlich auf der höheren Ladungsdichte des Kalium-Ions im Vergleich zum Guanidinium-Ion. Der Abschirmungs-Effekt eines Ions sollte umso größer sein, je höher dessen Ladungsdichte ist (O'Brien, 2007). Die Abnahme des Gyrationradius mit steigender KCl-Konzentration ist ein starkes Argument für elektrostatische Abstoßungen innerhalb der entfalteten Polypeptidkette, schließt jedoch alternative Erklärungsmöglichkeiten nicht aus. So ist z.B. bekannt, dass so genannte kosmotrope Salze der Hofmeister-Reihe, wie KCl, zu einer Verstärkung des hydrophoben Effektes führen. Ein abnehmender Gyrationradius mit steigender KCl-Konzentration könnte deshalb auch als Indiz für einen verstärkten hydrophoben Effekt gewertet werden. Da hydrophobe Reste jedoch durch Denaturanzien wie Harnstoff solvatisiert werden, erscheint diese Alternativ-Hypothese aufgrund der in den Experimenten eingesetzten Konzentration von 1,4 M Harnstoff eher unwahrscheinlich.

#### 4.1.8. Abschätzung der Coulomb-Energie des entfalteten Zustandes

Die energetischen Beiträge aller im entfalteten Zustand unter nativen Bedingungen wirkenden physikalischen Kräfte zu bestimmen, ist für das Verständnis der Dynamik entfalteter Polypeptidketten unerlässlich. Dieses Ziel kann mit der vorgelegten Arbeit nicht erreicht werden. Aus der getroffenen qualitativen Aussage, dass die Elektrostatik der entfalteten Polypeptidkette von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> deren Gyrationradius unter nativen Bedingungen determiniert, kann jedoch eine grobe Abschätzung der in der Kette wirkenden Coulomb-Kräfte gegeben werden.

Ein elegantes Modell zur Berechnung der in entfalteten Proteinen wirkenden elektrostatischen Kräfte wurde durch Zhou (2002a) vorgeschlagen. Darin wird angenommen, dass die entfaltete Polypeptidkette als Gauss'sches Zufallsknäuel betrachtet werden kann. Bei Kenntnis der Positionen ( $a_i$  und  $a_j$ ) der geladenen Aminosäuren in der Sequenz des Proteins können die End-zu-End-Abstände ( $\Delta_{ij}$ ) von jeder Ladung ( $i$ ) zu jeder anderen Ladung ( $j$ ) mittels [2.19] berechnet werden. Bei insgesamt 28 Ladungen in der Kette erhält man eine 28 x 28 – Matrix  $\mathbf{M}$  für die End-zu-Endabstände

$$\mathbf{M} = \begin{pmatrix} 0 & \Delta_{12} & \Delta_{13} & \Delta_{14} & \cdots & \Delta_{1,28} \\ 0 & 0 & \Delta_{23} & \Delta_{24} & \cdots & \Delta_{2,28} \\ 0 & 0 & 0 & \Delta_{34} & \cdots & \Delta_{3,28} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \cdots & \Delta_{4,28} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad \text{mit} \quad \Delta_{ij} = \sqrt{C_N (a_j - a_i)^2 + s} \quad [4.3]$$

Die Länge der Seitenketten wurde durch Zhou mit einer durchschnittlichen Länge von  $s = 5 \text{ \AA}$

abgeschätzt (Zhou, 2002a) und  $b = 3,8 \text{ \AA}$  (2.3.1.). Die Ladungszustände ( $z_i$  oder  $z_j$ ) jeder Aminosäure, der Farbstoffe, sowie der N-terminalen Amino-Gruppe und C-terminalen Carboxy-Gruppe sind bei pH 8,0 näherungsweise entweder +1 oder -1. Für die Berechnung der Coulomb-Energie ist das Produkt der Ladungszustände der miteinander interagierenden Aminosäuren entscheidend. Dieses kann ebenfalls in Form einer Matrize (**C**) dargestellt werden

$$\mathbf{C} = \begin{pmatrix} 0 & z_1 z_2 & z_1 z_3 & z_1 z_4 & \cdots & z_1 z_{28} \\ 0 & 0 & z_2 z_3 & z_2 z_4 & \cdots & z_2 z_{28} \\ 0 & 0 & 0 & z_3 z_4 & \cdots & z_3 z_{28} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \cdots & z_4 z_{28} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} . \quad [4.4]$$

Unter Berücksichtigung des Einflusses der Ionenstärke der Lösung durch die Debye-Hückel-Theorie, ist die mittlere Coulomb-Energie ( $w_{ij}$  in kcal mol<sup>-1</sup>) zweier vollständig solvatisierter Ladungen in einem Gauss'schen Zufallsknäuel nach Zhou (2002a und 2003)

$$w_{ij} = 332 z_i z_j \int_0^{\infty} p(r) \frac{\exp(-\kappa r)}{\varepsilon r} dr = 332 z_i z_j \sqrt{\frac{6}{\pi}} \left[ \frac{1 - \sqrt{\pi} x \exp(x^2) \operatorname{erfc}(x)}{\varepsilon \Delta_{ij}} \right] \quad [4.5]$$

$$\text{mit } x = \frac{\kappa \Delta_{ij}}{\sqrt{6}} \quad \text{und} \quad \kappa = \sqrt{\frac{8\pi I e^2}{\varepsilon k_B T}} = \frac{\sqrt{I}}{3,04} \quad [\text{\AA}^{-1}].$$

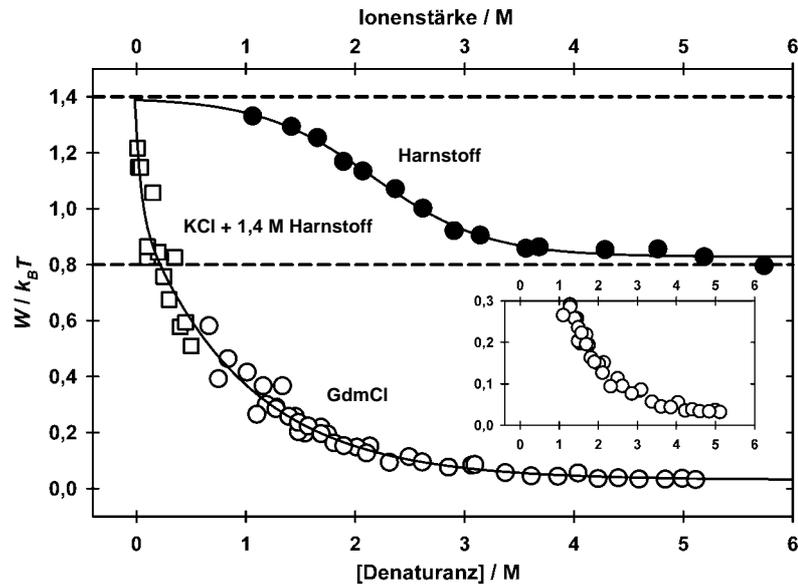
In [4.4] ist  $\operatorname{erfc}$  die komplementäre Fehlerfunktion,  $I$  ist die Ionenstärke der Lösung und  $e$  ist die Elementarladung ( $1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ ). Die Dielektrizitätskonstante von Wasser bei 25°C ist  $\varepsilon = 78,5$ . Da die komplementäre Fehlerfunktion keine geschlossen darstellbare Funktion ist, wurde für die Berechnung deren Reihenentwicklung

$$\operatorname{erfc}(x) = \frac{\pi^{-1/2} \exp(-x^2)}{x + \frac{1}{2x + \frac{2}{x + \frac{3}{2x + \frac{4}{\dots}}}}} \quad [4.6]$$

bis zum 14. Glied gewählt. Die Summe aller Einzelbeiträge ergibt die Netto-Coulomb-Energie ( $W$ ) der Polypeptidkette zu

$$W = \sum_i \sum_j w_{ij} . \quad [4.7]$$

Für jeden Gyrationradius und jede Ionenstärke lässt sich so die zugehörige Netto-Coulomb-Energie der Polypeptidkette berechnen. Allerdings versagt die Näherung der Debye-Hückel-



**Abbildung 4.9.** Abschätzung der Netto-Coulomb-Energie im entfalteten Zustand von  $pWT_{SS}^{DA}$ . Netto-Coulomb-Energie in Einheiten der Raumtemperatur-Energie der Polypeptidkette in GdmCl ( $\circ$ ), Harnstoff ( $\bullet$ ) und KCl + 1,4 M Harnstoff ( $\square$ ). Die Achsenbeschriftung [Denaturanz] gilt für Harnstoff ( $\bullet$ ) und GdmCl ( $\circ$ ) und die Achsenbeschriftung Ionenstärke für KCl + 1,4 M Harnstoff ( $\square$ ) und GdmCl ( $\circ$ ). Die Ionenstärke des Standardpuffers (0,1145 M bei pH 8,0) wurde in der Berechnung berücksichtigt. Es wurde jedoch nur die, zusätzlich zur Ionenstärke des Standardpuffers vorliegende Ionenstärke aufgetragen. Ausschnitt: Datenpunkte für GdmCl mit geänderter Skalierung der Netto-Coulomb-Energie.

Theorie bei sehr hohen Ionenstärken, so dass insbesondere bei hohen GdmCl-Konzentrationen keine sehr zuverlässigen Werte erhalten werden können. Hinzu kommt, dass GdmCl nicht nur durch elektrostatische Abschirmung, sondern vor allem durch Wasserstoffbrücken zu negativ geladenen Aminosäuren die Coulomb-Energie senkt (O'Brien, 2007). Eine analytische Behandlung dieses Effektes ist jedoch nicht bekannt, so dass hier nur der Einfluss der Ionenstärke berücksichtigt wird.

In hohen Harnstoffkonzentrationen wird eine positive Netto-Coulomb-Energie von  $\approx 0,8 k_B T$  ( $2 \text{ kJ mol}^{-1}$  bei  $T = 298 \text{ K}$ ) gefunden (Abb. 4.9). Im Gegensatz dazu ist, aufgrund der hohen Ionenstärke, die Netto-Coulomb-Energie in Gegenwart hoher GdmCl-Konzentrationen sehr gering. Da jedoch  $R_G$  der Kette bei  $> 4 \text{ M}$  GdmCl mit dem bei  $> 4 \text{ M}$  Harnstoff identisch ist (4.1.6.), scheinen elektrostatische Abstoßungen unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf den Gyrationradius zu haben.

Wird die Harnstoffkonzentration gesenkt, kollabiert die Polypeptidkette und die Netto-Coulomb-Energie steigt um  $\approx 0,6 k_B T$  ( $1,5 \text{ kJ mol}^{-1}$  bei  $T = 298 \text{ K}$ ) auf einen Wert von  $\approx 1,4 k_B T$

(3,5 kJ mol<sup>-1</sup> bei  $T = 298$  K) an. Aus dem erreichten Plateau des  $R_G$  bei Harnstoffkonzentrationen  $< 1,5$  M wurde eine Balance zwischen den attraktiven und abstoßenden Interaktionen innerhalb der Kette postuliert (4.1.6.). Ist diese Vermutung zutreffend, können die attraktiven Wechselwirkungen innerhalb der Kette unter nativen Bedingungen zu  $1,4 k_B T$  (3,5 kJ mol<sup>-1</sup> bei  $T = 298$  K) abgeschätzt werden.

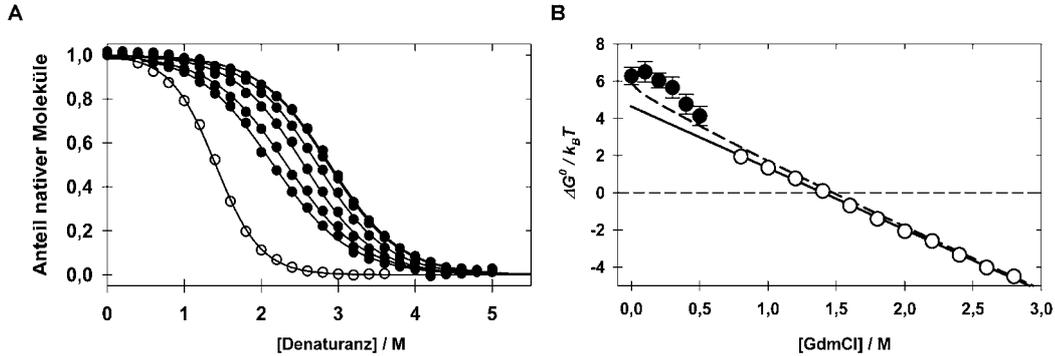
In GdmCl treten bei Konzentrationen  $> 1$  M keine wesentlichen elektrostatischen Abstoßungen auf. In Kombination mit den Experimenten in Gegenwart von KCl und 1,4 M Harnstoff ist jedoch ein drastischer Anstieg der elektrostatischen Abstoßungen bei Ionenstärken  $< 1$  M zu verzeichnen. Bei Erreichen der Ionenstärke des Standardpuffers (0,1145 M bei pH 8,0) wird ebenfalls annähernd ein Wert von  $1,4 k_B T$  für die Netto-Coulomb-Energie extrapoliert (Abb. 4.9).

Da, wie oben beschrieben, der elektrostatische Anteil der freien Reaktionsenthalpie der entfalteten Kette in GdmCl nichtlinear von der Denaturanzkonzentration abhängt, ist die für die Stabilitätsbestimmung von Proteinen verwendete lineare Extrapolation [2.8] äußerst fragwürdig. In der Tat wurde für Ubiquitin bei pH 2, d.h. unter Bedingungen starker elektrostatischer Abstoßung innerhalb der Kette, eine enorme Abweichung der Stabilität von der GdmCl-Konzentration gefunden (Makhatadze, 1999). Ein Einfluss der Elektrostatik des entfaltenen Zustandes auf die Stabilität von Barstar wurde anhand von Mutationsstudien, in denen geladene gegen neutrale Aminosäuren ausgetauscht wurden, schon früher vermutet (Pradeep und Udgaonkar, 2004). Aus Abb. 4.9 geht hervor, dass im Falle von Barstar tatsächlich Abweichungen von [2.8] bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen erwartet werden.

#### 4.1.9. Die lineare Extrapolation bei pWT in GdmCl

Aufgrund der sehr geringen Stabilität von Barstar-pWT sind in GdmCl-Konzentrationen  $< 1$  M Stabilitäten für Barstar-pWT nur sehr unsicher bestimmbar. Abweichungen von [2.8], wie sie in diesen GdmCl-Konzentrationen erwartet werden ( $1,4 k_B T$ ), liegen deshalb im Rahmen des Fehlers. Obwohl die Netto-Coulomb-Energie der entfalteten Kette auch in Harnstoff geändert wird (Abb. 4.9), ist aufgrund der geringen Änderung bei  $< 1$  M Harnstoff keine signifikante Abweichung von der Linearität nach [2.8] zu erwarten. Aus diesem Grunde wurden Harnstoff-induzierte Übergangskurven in Gegenwart von 0 – 0,5 M GdmCl aufgenommen. Da bei hohen GdmCl-Konzentrationen keine elektrostatische Abstoßung innerhalb der Kette zu erwarten ist (Abb. 4.9), wurde eine GdmCl-induzierte Übergangskurve genutzt um die Stabilitäten von pWT im Bereich des Übergangsmittelpunktes, d.h.  $\Delta G^0 = 0$ , zu erhalten.

Die lineare Extrapolationsmethode geht von der Annahme aus, dass sich die freie Reaktions-



**Abbildung 4.10. Aus Harnstoff- und GdmCl-induzierten Übergangskurven bestimmte Stabilitäten von Barstar pWT.** (A) Harnstoff-induzierte Übergangskurven (Schwarz) in Gegenwart steigender Konzentrationen von GdmCl (0, - 0,5 M in Schritten von 0,1 M) sowie GdmCl-induzierte Übergangskurve (Weiß). (B)  $\Delta G^0$  von Barstar-pWT als Funktion der GdmCl-Konzentration (Symbole wie in A). Durchgezogene Linie ist die Extrapolation der Stabilitäten auf 0 M GdmCl basierend auf der linearen Extrapolationsmethode. Gestrichelt ist die nach [4.9] erwartete Abhängigkeit bei Berücksichtigung der Netto-Coulomb-Energie des entfalteten Zustandes (Abb. 4.9).

enthalpie des nativen ( $G_N^0$ ) und entfalteten Zustandes ( $G_U^0$ ) linear mit der Denaturanzkonzentration ändert.  $\Delta G^0$  ist definiert durch

$$\begin{aligned}\Delta G^0 &= G_U^0 - G_N^0 = (H_U - T \cdot S_U) - G_N^0 = (W_U + H_U' - T \cdot S_U) - G_N^0 \\ \Delta G^0 &= W_U + G_U^{0'} - G_N^0\end{aligned}\quad [4.8]$$

mit  $W_U$  als der Coulomb-Energie des entfalteten Zustandes (4.1.8.). Wird wie in der ursprünglichen linearen Extrapolationsmethode angenommen, dass  $G_N^0$  und  $G_U^{0'}$  linear von der Denaturanzkonzentration abhängen, läßt sich die Denaturanz-abhängige Stabilität durch

$$\Delta G^0 = W_U - m_{eq}'[D] + \Delta G^0'(H_2O)\quad [4.9]$$

mit  $[D]$  als Denaturanzkonzentration darstellen. Laut [4.9] sollte die freie Reaktionsenthalpie der Entfaltung linear von der Denaturanzkonzentration abhängen wenn die Coulomb-Energie gering ist. Dies sollte z.B. in GdmCl-Konzentrationen  $> 1$  M der Fall sein. Abb. 4.10 A zeigt die erhaltenen Übergangskurven in Harnstoff und GdmCl. Diese wurden durch Zugabe des jeweiligen Denaturanz zur Proteinlösung erhalten (3.2.8.). Anhand der Harnstoff-induzierten Übergangskurven läßt sich eine Destabilisierung mit steigenden Konzentrationen an GdmCl beobachten. Wie schon angedeutet, kann die Basislinie des Signals nativer Moleküle der

GdmCl-induzierten Übergangskurve nicht vollständig erreicht werden. Für deren Anpassung wurde deshalb die aus den Harnstoff-Übergangskurven gut bestimmte Basislinie verwendet (Abb. 4.10 A). Wird  $\Delta G^{\circ}$  gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen, ist dessen lineare Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration bei Konzentrationen  $> 1$  M erkennbar (Abb. 4.10 B). Bei GdmCl-Konzentrationen  $< 1$  M ist  $\Delta G^{\circ}$  jedoch signifikant höher als von der linearen Extrapolation aus GdmCl-Konzentrationen nahe des Übergangsmittelpunktes erwartet. Das durch elektrostatische Effekte nach [4.9] erwartete  $\Delta G^{\circ}$  ist geringer als das tatsächlich gefundene (Abb. 4.10 B). Dies kann zum einen auf der Unsicherheit in der Bestimmung von  $\Delta G^{\circ}$  oder auf einer zusätzlichen Stabilisierung des nativen Zustandes bei geringen GdmCl-Konzentration beruhen. Anhand einer Variante von Barstar (W38F/W44F/C40A) wurde tatsächlich nachgewiesen, dass der Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung bei GdmCl-Konzentrationen  $< 1$  M signifikant geringer ist als von dessen linearer Extrapolation aus hohen GdmCl-Konzentrationen zu erwarten gewesen wäre (Srivedi und Udgaonkar, 2002). Der native Zustand wird demnach bei geringen GdmCl-Konzentrationen zusätzlich stabilisiert. Eine nichtlineare Abhängigkeit der logarithmierten Geschwindigkeitskonstante der Entfaltungsreaktion von der GdmCl-Konzentration wurde anhand von  $R_2$ -Dispersionsmessungen (2.6.3.) auch für das Acyl-CoA-Bindeprotein ACBP erhalten (Teilum *et al.*, 2006).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die anhand des Modelles von Zhou (2002a und 2003) erhaltenen Netto-Coulomb-Energien einen Teil der höheren Stabilität von Barstar-pWT in niedrigen GdmCl-Konzentrationen erklären können. Die experimentell gefundene Abweichung von der linearen Extrapolationsmethode kann jedoch nicht allein über die Elektrostatik des entfalteten Zustandes erklärt werden. Da auch das verwendete Modell eines Gauss'schen Zufallsknäuels nur eine Näherung ist und überdies nur der Ionenstärke-Effekt von GdmCl berücksichtigt wurde, bleibt eine detaillierte Analyse der die Protein-Stabilität bestimmenden Faktoren späteren Arbeiten vorbehalten. Nichtsdestotrotz ergeben sich Implikationen im Zusammenhang für die Faltung von Proteinen allgemein. Für eine spezielle Gruppe von Proteinen, den nativ-entfalteten Proteinen (*natively unfolded proteins*) ist bekannt, dass sie sich durch einen hohen Anteil geladener Aminosäuren und durch eine geringe Hydrophobizität auszeichnen (Uversky *et al.*, 1999). Im Zusammenhang mit den gefundenen elektrostatischen Abstoßungen im entfalteten Protein erscheint die Annahme sinnvoll, dass die Energielandschaft der Proteinfaltung zu einem Großteil von der Elektrostatik der Polypeptidkette bestimmt wird.

#### 4.1.10. Dynamik im entfalteten Zustand von pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup> ?

Neben der mittleren Transfer-Effizienz der Verteilung entfalteter Moleküle ist die Breite der

Verteilung ein weiterer Parameter, der Informationen über den entfalteten Zustand liefern kann. Befinden sich beide Fluorophore in einem festen Abstand zueinander und kann die Photodynamik der Farbstoffe ausgeschlossen werden, wird die Breite der FRET-Verteilung nur durch zufällige Fluktuationen der Intensitäten  $I_a$  und  $I_d$  in [2.37] um ihren Mittelwert (*shot noise*) bestimmt. Bei Annahme, dass die Intensitäten oder äquivalent, die Photonenzahl pro Bin, in beiden Kanälen durch eine Poissonverteilung charakterisiert sind, gilt für die Streuung

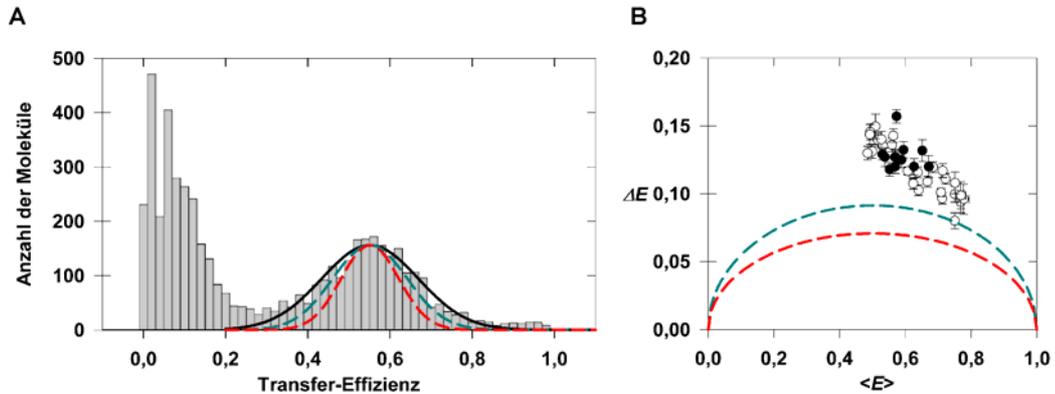
$\Delta I_a = \sqrt{I_a}$  sowie  $\Delta I_d = \sqrt{I_d}$ . Die Varianz der FRET-Verteilung ist danndurch die Gleichung der Fehlerfortpflanzung zu

$$\Delta E^2 = \left| \frac{\partial E}{\partial I_a} \Delta I_a \right|^2 + \left| \frac{\partial E}{\partial I_d} \Delta I_d \right|^2 \quad [4.10]$$

gegeben. Unter Nutzung von [2.37] ergibt sich daraus

$$\Delta E = \frac{1}{\sqrt{I_a + I_d}} \sqrt{E(1-E)} \leq \frac{1}{\sqrt{T}} \sqrt{E(1-E)} \quad [4.11]$$

(Dahan *et al.*, 1999). Um eine obere Abschätzung der *shot noise*-limitierten Breite der FRET-Verteilung zu erhalten, kann die Summe ( $I_a + I_d$ ) durch den Schwellenwert ( $T$ ) ersetzt werden. Im Falle der Einzelmolekül-Experimente in GdmCl und Harnstoff wurden die Intensitäten  $I_a$  und  $I_d$  der beiden Kanäle jedoch vor Berechnung von  $E$  gegen die Quantenausbeuten und Detektoreffizienzen korrigiert. Da die korrigierten Intensitäten demnach nicht den tatsächlich detektierten Photonenzahlen der unkorrigierten Zeitspuren entsprechen, kann der sich daraus ergebende Schwellenwert nicht in [4.11] verwendet werden. Der korrekte Schwellenwert wurde jedoch in einem zusätzlichen Experiment bestimmt. Dazu wurde der Detektor des Donor-Kanals so dejustiert, dass ein Korrekturfaktor  $\gamma = (\phi_a \eta_a) / (\phi_d \eta_d) = 1$  erhalten wurde. Bei 5,2 M Harnstoff wurde anschließend die FRET-Verteilung von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> gemessen. Der Schwellenwert wurde in diesem Experiment so gewählt, dass die FRET-Verteilung von ähnlicher Qualität wie die aus den korrigierten Zeitspuren ermittelten FRET-Verteilungen war. Dazu war ein Schwellenwert von  $T = 30$  bis  $T = 50$  nötig. Diese Schwellenwerte können genutzt werden um die *shot noise*-limitierte Breite der FRET-Verteilungen abzuschätzen. Diese sind leicht geringer als die aus dem Experiment ermittelten Breiten (Abb. 4.11 A). Bei 5,2 M Harnstoff wird bei einem Schwellenwert von  $T = 30$  eine Breite von  $\Delta E = 0,091$  erwartet, während experimentell ein Wert von  $0,1176 \pm 0,005$  bestimmt wurde (Abb. 4.11. A). Zum Vergleich, für die entfalteten Zustände von CspTm (Schuler *et al.*, 2002; Merchant *et al.*, 2006) und Im9 (Tezuka-Kawakami *et al.*, 2006) wurden bei hohen Konzentrationen an GdmCl bzw. Harnstoff Werte von  $\Delta E = 0,2$



**Abbildung 4.11. Shot-noise-limitierte Breite der FRET-Verteilungen von  $pWT_{ss}^{DA}$ .** (A) FRET-Verteilung von  $pWT_{ss}^{DA}$  in 5,2 M Harnstoff, ermittelt aus den gegen die Detektoreffizienzen und Quantenausbeuten korrigierten Intensitäten  $I_a$  und  $I_d$ . Anpassung der FRET-Verteilung entfalteter  $pWT_{ss}^{DA}$ -Moleküle mit einer Gauss-Funktion (schwarz) sowie die erwarteten *shot-noise*-limitierten Verteilungen für  $T = 30$  (Blau) und  $T = 50$  (Rot), berechnet nach [4.11]. (B) Breiten der FRET-Verteilung der entfalteten Moleküle in GdmCl (weiß) und Harnstoff (schwarz) als Funktion der mittleren Transfer-Effizienz. Blaue und Rote Linien sind die mittels [4.11] berechneten *shot noise* limitierten Breiten der Verteilung für  $T = 30$  und  $T = 50$ .

gefunden. Wie nach [4.11] erwartet, nimmt  $\Delta E$  bei größeren mittleren Transfer-Effizienzen ab (Abb. 4.11 B). Jedoch ist bei allen mittleren Transfer-Effizienzen  $\Delta E$  größer als nach [4.11] zu erwarten wäre (Abb.11 B). Zwischen Harnstoff und GdmCl wird kein Unterschied hinsichtlich der Breiten der FRET-Verteilungen gefunden.

Aus dem signifikanten, aber geringen Unterschied zwischen den experimentell gefundenen und den für *shot noise* erwarteten Verteilungsbreiten kann leider nicht notwendigerweise auf eine Dynamik der entfalteten Kette im Zeitbereich der Bin-Zeit des Experimentes, d.h. 500  $\mu s$ , geschlossen werden. Photodynamische Prozesse wie Bleichen der Fluorophore während des Transits durch das fokale Volumen und Übergänge in elektronische Triplett-Zustände können ebenfalls zur Verbreiterung der FRET-Verteilungen führen. Da überdies die für  $pWT_{ss}^{DA}$  gefundenen  $\Delta E$ -Werte wesentlich geringer als die für *CspTm* und *Im9* gefundenen sind, ist eine Dynamik der entfalteten Polypeptidkette von  $pWT_{ss}^{DA}$  im Zeitbereich von 500  $\mu s$  eher unwahrscheinlich.

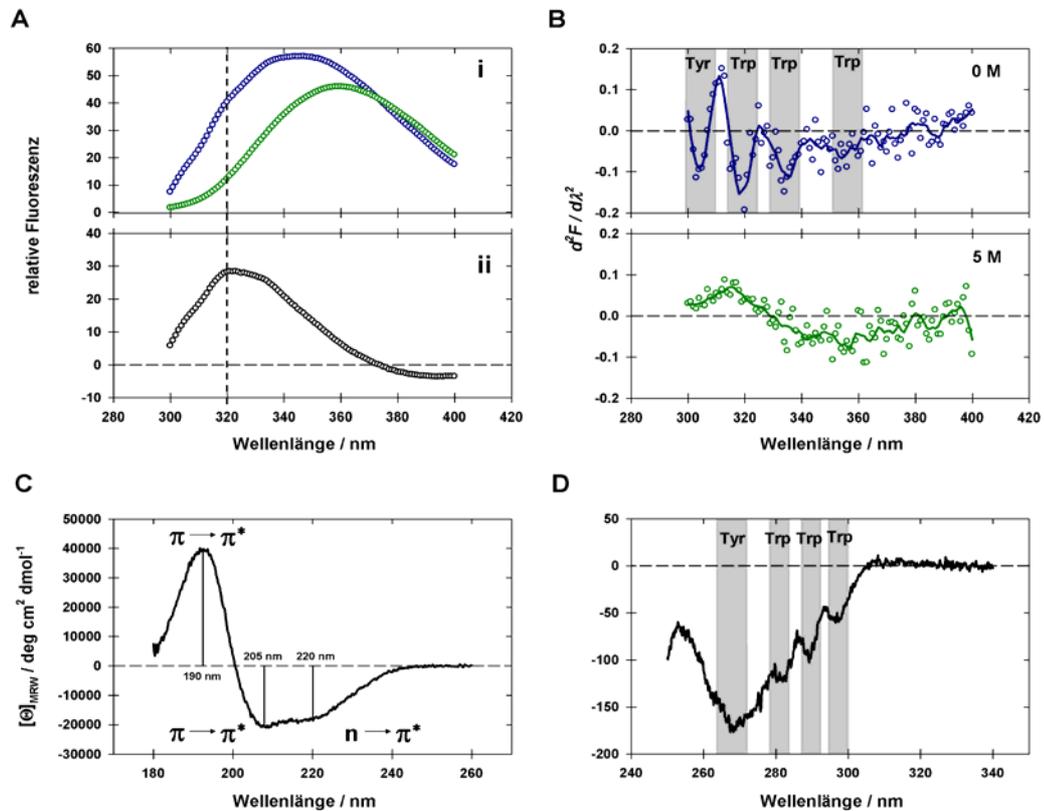
## 4.2. Entfaltung von Barstar pWT

### 4.2.1. Spektroskopische Charakterisierung von Barstar-pWT

Wie in 2.1. erwähnt, ist Barstar-pWT ein  $\alpha/\beta$ -Protein bestehend aus 3 parallelen  $\beta$ -Faltblättern sowie 4  $\alpha$ -Helices. Die intrinsische Fluoreszenz von pWT resultiert aus 3 Tyrosinresten (Y29, Y30 und Y47) sowie 3 Tryptophanresten (W38, W44 und W53). Die Entfaltung von pWT mittels Harnstoff senkt die Fluoreszenz von pWT bei einer gleichzeitigen bathochromen Verschiebung des Spektrums (Abb. 4.12 A). Das Differenzspektrum zeigt, dass die größte Änderung der Fluoreszenz-Intensität während der Entfaltung bei 320 nm auftritt. Diese Wellenlänge ist demnach ideal zur Verfolgung der Entfaltung von pWT. Das Fluoreszenzspektrum von nativem pWT zeigt eine Feinstruktur, die in den Derivativ-Spektren deutlich wird (Abb. 4.12 B). Mindestens 3 Banden sind darin zu erkennen. Die Bande bei 305 nm kann der Fluoreszenz der Tyrosinreste des Proteins zugeordnet werden. Weitere 2 Banden bei 320 nm und 335 nm resultieren mit hoher Wahrscheinlichkeit von 2 der drei Tryptophanreste. Da W53 im hydrophoben Kern des Proteins verborgen liegt, ist zu erwarten, dass die Bande bei 320 nm diesem Tryptophan zuzuordnen ist. Dafür spricht auch die Emissionswellenlänge der Barstar-Variante W38F/W44F, die bei 327 nm liegt (Nath und Udgaonkar, 1997). Die während der Entfaltung auftretende Signaländerung bei 320 nm kann demzufolge als Sonde für die Solvatisierung des hydrophoben Kerns des Proteins angesehen werden.

Eine dritte Bande könnte im Bereich von 350 – 360 nm vermutet werden. Allerdings ist die Streuung der Daten in diesem Bereich zu ausgeprägt, um eindeutige Aussagen zu erlauben. Wahrscheinlich ist jedoch, dass die Emission von W38 und W44 eher der Bande bei 335 nm als der bei 320 nm zuzuordnen ist, da beide Reste an der Oberfläche des Proteins und damit Lösungsmittel-exponiert sind. Wird pWT in Gegenwart von 5 M Harnstoff entfaltet, ist keine Feinstruktur im Derivativ-Spektrum mehr zu erkennen (Abb. 4.12 B).

Im CD-Spektrum des Proteins dominieren dessen helikale Bereiche. Im Fern-UV-CD-Spektrum sind deutlich 3 Banden bei 220 nm, 205 nm und 190 nm erkennbar, die dessen helikalen Strukturelementen zugeordnet werden können (Abb. 4.12 C). Die chirale Umgebung der 3 Tryptophanreste (W38, W44 und W53) sowie der 3 Tyrosinreste (Y29, Y30 und Y47) schlägt sich im Nah-UV-CD-Spektrum nieder (Abb. 4.12 D). Hier sind deutlich vier Banden bei 270 nm, 280 nm, 290 nm und 295 nm voneinander zu unterscheiden. Die Bande bei 270 nm lässt sich mit hoher Sicherheit den Tyrosinresten des Proteins zuordnen. Die restlichen 3 Banden resultieren mit hoher Wahrscheinlichkeit aus den 3 Tryptophanresten des Proteins. Eine Zuordnung der jeweiligen Banden des Nah-UV-CD-Spektrums zu bestimmten Tryptophanresten



**Abbildung 4.12. Fluoreszenz- und CD-Spektren von Barstar pWT.** (A) Fluoreszenz-Spektren nach Anregung bei 280 nm für nativen (Blau) und mit 5 M Harnstoff entfaltenen pWT (Grün) (i) sowie das daraus resultierende Differenzspektrum (ii). (B) Derivativ-Spektren für natives (Blau) und mit 5 M Harnstoff entfaltetes Protein (Grün). Die durchgezogene Linie entspricht der Glättungs-Funktion. (C) Fern-UV-CD-Spektrum mit gekennzeichneten elektronischen Übergängen und (D) Nah-UV-CD-Spektrum. Die Banden für Tyrosin- und Tryptophanreste im nativen Derivativ- und Nah-UV-CD-Spektrum sind grau unterlegt.

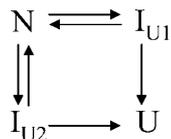
ist jedoch nicht ohne weiteres möglich, da der genaue Einfluss der chiralen Umgebung auf das CD-Signal der Aromaten nicht bekannt ist.

Mittels Einzelmolekülspektroskopie konnte gezeigt werden, dass im thermodynamischen Gleichgewicht des Proteins nur native und entfaltete Moleküle vorliegen (siehe 4.1.4.). Dies impliziert, dass im thermodynamischen Gleichgewicht des Proteins keine Intermediate zu signifikanten Anteilen populiert werden. Wird jedoch die Faltung und Entfaltung kinetisch verfolgt, ergibt sich ein anderes Bild. Wie eingangs festgestellt wurde, sind mehrere Faltungsintermediate von Barstar bekannt (Shastry und Udgaonkar, 1995). Kinetisch sind für Barstar-WT zwei Faltungs- und zwei Entfaltungsreaktionen bekannt. Die schnelle Reaktion entspricht der eigentlichen Faltung bzw. Entfaltung, während die langsamere Reaktion, die nur

im Übergangsbereich beobachtbar ist, aus der Isomerisierung der Peptidylprolyl-Bindungen des Proteins resultiert (Schreiber und Fersht, 1993b; Shastry und Udgaonkar, 1995).

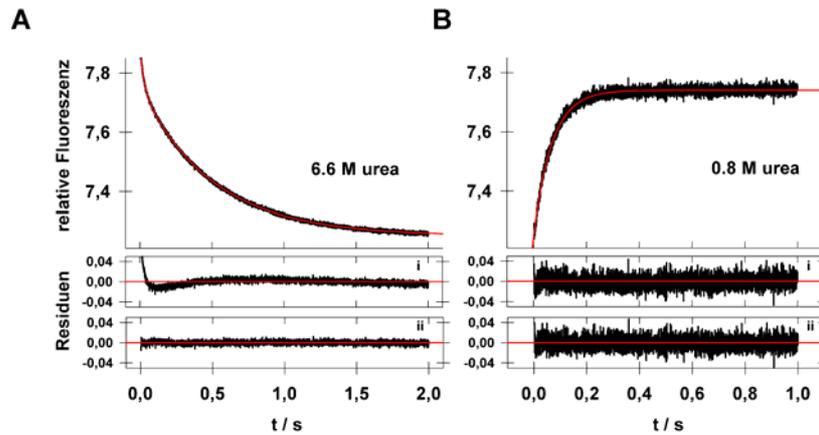
#### 4.2.2. Kinetische Analyse der Faltung und Entfaltung von pWT

Bei der Analyse des Entfaltungsmechanismus von Barstar-pWT liegt das Hauptaugenmerk auf der schnellen Entfaltungsreaktion des Proteins. Die durch die Prolinisomerisierung hervorgerufene langsame Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktion wurde nicht näher untersucht. Frühere Studien an Barstar-WT zeigten, dass während der Entfaltung des Proteins Intermediate transient populiert werden. Anhand von *burst*-Amplituden konnte nachgewiesen werden, dass die Entfaltung von Barstar W38F/W44F bei hohen Harnstoffkonzentrationen über zwei parallele Wege erfolgt (Zaidi *et al.*, 1997; Agashe *et al.*, 1997). Auf jedem dieser Wege wird mindestens ein Intermediat transient populiert. Das Reaktionsschema der Entfaltung von Barstar-pWT bei hohen Harnstoffkonzentrationen kann also mit



beschrieben werden. Die Übergänge von N zu  $\text{I}_{\text{U}1}$  und  $\text{I}_{\text{U}2}$  können, da sie nur als *burst*-Amplitude sichtbar sind, als schnelle Gleichgewichte betrachtet werden. In  $\text{I}_{\text{U}2}$ , dessen Existenz aus *burst*-Amplituden in der Fluoreszenz-detektierten Entfaltung abgeleitet werden konnte, muss Trp53 im hydrophoben Kern des Proteins partiell solvatisiert vorliegen (Zaidi *et al.*, 1997).  $\text{I}_{\text{U}1}$  konnte dagegen anhand von *burst*-Amplituden in der mittels CD-Spektroskopie detektierten Entfaltung nachgewiesen werden. Für  $\text{I}_{\text{U}1}$  wurde daraus eine im Vergleich zum nativen Protein veränderte Sekundärstruktur abgeleitet.

In dieser Arbeit konnten für Barstar-pWT zwei Entfaltungsreaktionen detektiert werden. (Abb. 4.13 A). In 6,6 M Harnstoff wurde für die bereits bekannte Entfaltungsreaktion ( $\lambda_2$ ) eine Geschwindigkeitskonstante von  $2,01 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  gefunden. Diese Reaktion kann der globalen Entfaltung des Proteins zugeordnet werden (Golbik *et al.*, 1999). Das Produkt dieser Reaktion sind entfaltete Moleküle mit der Peptidylprolyl-Bindung Y47-P48 in *cis*-Konformation. Die zweite, schnellere Entfaltungsreaktion ( $\lambda_1$ ) mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $34 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$  (6,6 M Harnstoff) zeigt eine Amplitude von 15 - 20 %. Das Auftreten dieser zweiten schnellen Reaktion ist überraschend, da diese Reaktion bisher bei keiner anderen Variante des Proteins gefunden wurde. Daraus kann vorerst geschlossen werden, dass ein Entfaltungsintermedi-

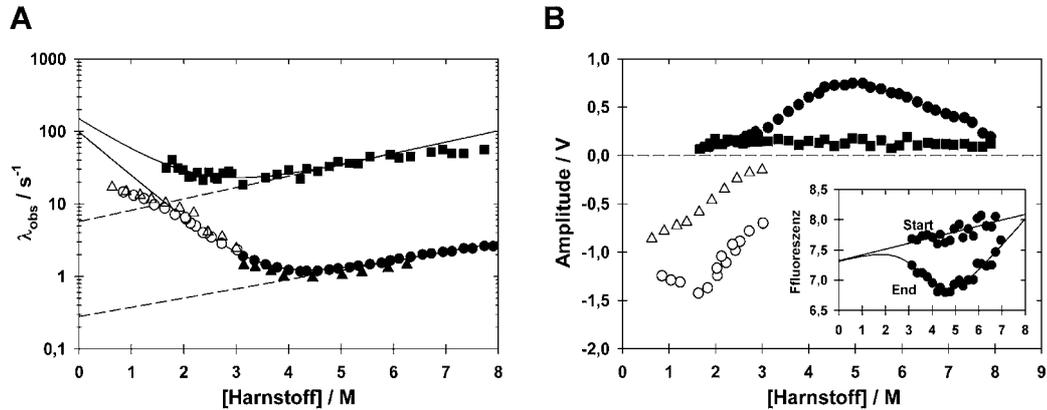


**Abbildung 4.13. Entfaltungs- und Rückfaltungskinetik von Barstar-pWT, gemessen mittels *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie.** (A) Entfaltungskinetik von Barstar-pWT (siehe 3.2.10.1). (B) Rückfaltungskinetik von Barstar-pWT ausgehend von  $U_{cis}$  (siehe 3.2.10.2.). Residuen von mono-exponentiellen (i) und bi-exponentiellen Anpassungen (ii). Die Kinetiken wurden in Standardpuffer bei 25°C und Proteinkonzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  (A) und 2  $\mu\text{M}$  (B) aufgenommen.

at ( $I_{cis}$ ) sogar in so hohen Harnstoffkonzentrationen wie 6,6 M transient populiert wird. Da die Entfaltungsreaktion nur bis zum entfalteten Zustand mit der Y47-P48 Peptidylprolyl-Bindung in der *cis*-Konformation ( $U_{cis}$ ) verfolgt wurde, war auch nur die Rückfaltungsreaktion ausgehend von  $U_{cis}$  von Interesse. Das Protein wurde deshalb für eine kurze Zeit (3 s) in 4 M Harnstoff entfaltet. Nach dieser Zeit ist  $U_{cis}$  vollständig populiert. Im Anschluss wurde die Rückfaltungsreaktion induziert. Im Gegensatz zur Entfaltung wurde nur eine Rückfaltungsreaktion beobachtet (Abb. 4.13 B). Im Rahmen des oben dargestellten Modells der Entfaltung von Barstar besteht die Möglichkeit, dass  $I_{cis}$  mit einem der beiden Intermediate  $I_{U1}$  oder  $I_{U2}$  identisch ist.

### 4.2.3. Chevron-Diagramm für pWT

Die Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Ent- und Rückfaltungskinetiken als Funktion der Harnstoffkonzentration wird aufgrund seiner typischen Form auch Chevron genannt. Im Falle von Barstar-pWT ergeben sich im Chevron-Diagramm zwei Kurven ( $\lambda_1$  und  $\lambda_2$ ) (Abb. 4.14 A). Der Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante der langsameren Entfaltungsreaktion hängt entsprechend [2.10] linear von der Harnstoffkonzentration ab (Abb. 4.14 A). Eine lineare Extrapolation zu 0 M Harnstoff gibt eine Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung von  $0,2 \text{ s}^{-1}$ . Die schnelle Reaktion lässt sich ausschließlich während der



**Abbildung 4.14. Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden der Ent- und Rückfaltungskinetik von pWT als Funktion der Harnstoffkonzentration.** (A) Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Entfaltung ( $\lambda_1$ ) (■), der langsameren Entfaltung ( $\lambda_2$ ) (●, ▲) sowie der Rückfaltung ausgehend von  $U_{\text{cis}}$  (○) und der Rückfaltung ausgehend von einer Gleichgewichtsmischung aus  $U_{\text{cis}}$  und  $U_{\text{trans}}$  (△). Durchgezogene Linien entsprechen Anpassungen der Daten nach [2.4] unter Nutzung von [2.9] und [2.10]. Gestrichelte Linien sind Extrapolationen auf 0 M Harnstoff. (B) Amplituden der schnellen Entfaltung, der langsameren Entfaltung sowie der Rückfaltung. Die Amplituden der Rückfaltungskinetik ausgehend von  $U_{\text{cis}}$  wurden auf dieselbe Proteinkonzentration wie die Entfaltungskinetiken ( $5 \mu\text{M}$ ) umgerechnet. Symbole wie in A. Ausschnitt: Fluoreszenzsignale zum Zeitpunkt  $t = 0$ , und nach Ablauf der Entfaltungsreaktion zum Zeitpunkt  $t = \infty$ . Proteinkonzentration  $5 \mu\text{M}$  für alle Entfaltungskinetiken und  $2 \mu\text{M}$  für alle Rückfaltungskinetiken. Alle Messungen wurden in Standardpuffer bei  $25^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Entfaltung detektieren. Auch hier ist eine Nichtlinearität der logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten als Funktion der Harnstoffkonzentration zu beobachten (Abb. 4.14 A). Die Extrapolation der Geschwindigkeitskonstante der Entfaltungsreaktion auf 0 M Harnstoff ergibt einen Wert von  $5 \text{ s}^{-1}$ .

Für die Rückfaltungsreaktion ist eine deutliche Abweichung des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante von der Linearität zu beobachten. Gewöhnlich resultieren solche Nicht-Linearitäten aus der kinetischen Kopplung mehrerer Schritte während der Reaktion und geben Hinweise auf die Existenz von Faltungsintermediaten (Kiefhaber, 1995). Die Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltungsreaktion ausgehend von der Mischung aus  $U_{\text{cis}}$  und  $U_{\text{trans}}$  sind mit denen ausgehend von  $U_{\text{cis}}$  identisch (Abb. 4.14 A). Für Barstar-pWT\* und Barstar-WT wurde dies bereits in früheren Studien gezeigt (Schreiber und Fersht, 1993; Shastry und Udgaonkar, 1995).

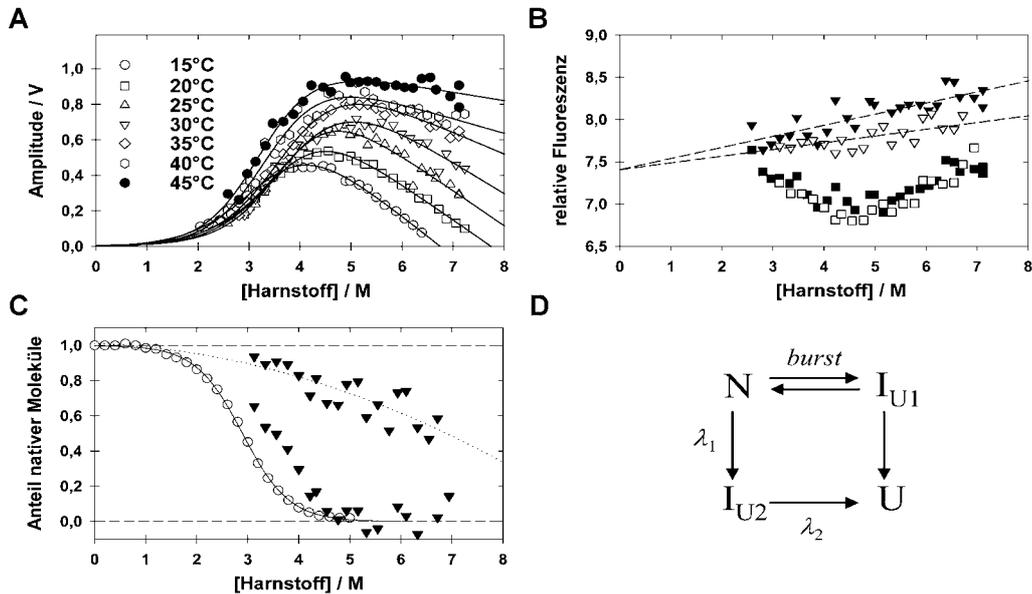
Im Vergleich zur Rückfaltung aus dem Gleichgewichtsverhältnis bestehend aus  $U_{\text{cis}}$  und  $U_{\text{trans}}$ , sind die Amplituden der Rückfaltungsreaktion größer, wenn die Reaktion ausgehend von  $U_{\text{cis}}$

gestartet wird. Dieses Verhalten wurde von Schreiber und Fersht damit erklärt, dass sich nach der Rückfaltung das *cis-trans*-Gleichgewicht im entfalteten Zustand wieder einstellt und damit auch das Gleichgewicht zwischen N und  $U_{cis}$  verschiebt (Schreiber und Fersht, 1993). An die Rückfaltungsreaktion ausgehend von  $U_{cis}$  schließt sich demnach eine Entfaltungsreaktion an. Diese besitzt eine Amplitude, die der in Abb. 4.14 B dargestellten Differenz entspricht.

In der Entfaltung steigt die Amplitude der schnellen Reaktion ( $\lambda_1$ ) bis 2 M Harnstoff geringfügig an und bleibt dann konstant. Die Konstanz dieser Amplitude lässt vermuten, dass unabhängig von der Harnstoffkonzentration, immer die gleiche Anzahl von Molekülen über diese schnelle Reaktion entfalten. Im Gegensatz dazu steigt die Amplitude der langsameren Entfaltungsreaktion ( $\lambda_2$ ) mit steigenden Harnstoffkonzentrationen bis 5 M an. Anschließend fällt sie bis 8 M wieder ab (Abb. 4.14 B). Eine schnelle Entfaltungsreaktion (*burst*-Amplitude) während der Totzeit (5 ms) des *stopped-flow*-Instrumentes wie sie von Zaidi *et al.* (1997) für die Barstarvariante W38F/W44F gefunden wurde, könnte die Ursache für diesen Abfall darstellen. Aus der Startwert-Endwert-Analyse lässt sich allerdings schwer schließen, ob der Abfall der Amplitude bei hohen Harnstoffkonzentrationen aus zunehmenden Endwerten oder aus abnehmenden Startwerten resultiert (Abb. 4.14 B, Ausschnitt). Auch spektroskopische Artefakte aufgrund der hohen Harnstoffkonzentrationen können als Ursache nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.2.4. *burst*-Amplitude in der Entfaltung von Barstar-pWT

Wird die Harnstoff-Abhängigkeit der Amplitude der Entfaltungsreaktion ( $\lambda_2$ ) bei verschiedenen Temperaturen verfolgt, so ist festzustellen, dass die Amplitude bei hohen Harnstoffkonzentrationen umso größer ist, je höher die Temperatur ist (Abb. 4.15 A). Bei 45°C ist kein signifikanter Abfall der Amplitude mit steigender Harnstoffkonzentration mehr zu beobachten. Spektroskopische Artefakte, wie Temperatur-induzierte Fluoreszenzlöschung (*quenching*), würden eine geringere Amplitude bei höheren Temperaturen erwarten lassen und können demnach diese Ergebnis nicht erklären. Die erhaltenen Amplituden der Entfaltungsreaktion bei 45°C ermöglichen eine erneute Startwert-Endwert-Analyse, die eine Entscheidung zwischen abfallenden Startwerten oder ansteigenden Endwerten als Ursache für die Amplituden-Verluste bei niedrigeren Temperaturen ermöglicht. Werden die Start- und Endwerte der Entfaltungskinetik bei 25°C und 45°C miteinander verglichen, findet man eine gute Übereinstimmung der Endwerte bei beiden Temperaturen (Abb. 4.15 B). Demgegenüber weichen jedoch die Startwerte der Kinetik signifikant voneinander ab. Bei 45°C werden höhere Startwerte als bei 25°C gefunden. Offensichtlich beruht der bei hohen Harnstoffkonzentrationen gefundene



**Abbildung 4.15** Amplituden der Entfaltung sowie Startwert-Endwert-Analyse bei verschiedenen Temperaturen. (A) Amplituden der Entfaltung ( $\lambda_2$ ) in Abhängigkeit der Harnstoff-Konzentration bei verschiedenen Temperaturen. (B) Startwerte und Endwerte der Entfaltungskinetik bei 25°C ( $\nabla$ ,  $\square$ ) und 45°C ( $\blacktriangledown$ ,  $\blacksquare$ ) (C) Relative Start- und Endwerte der Entfaltungskinetik bei 25°C (Schwarz) sowie Harnstoff-induzierte Übergangskurve (Weiss) bei 25°C. (D) Modell zur Erklärung der Harnstoff-induzierten Entfaltungskinetiken von pWT, adaptiert nach Zaidi *et al.* (1997). Proteinkonzentration 5  $\mu$ M (A und B) und 2  $\mu$ M für die Übergangskurve in (C). Alle Messungen wurden in Standardpuffer bei 25°C durchgeführt.

Amplituden-Verlust auf einer *burst*-Amplitude während der Totzeit des Instrumentes von 5 ms. Wie für Barstar-WT und dessen Variante W38F/W44F (Zaidi *et al.*, 1997; Agashe *et al.*, 1997) sowie auch für Apomyoglobin (Jamin und Baldwin, 1996) konnte auch für Barstar-pWT eine schnelle Entfaltungsreaktion innerhalb der Totzeit des *stopped-flow*-Instrumentes nachgewiesen werden. Unter Nutzung der bei 45°C erhaltenen Amplitude der Entfaltungsreaktion, kann der relative Amplituden-Verlust bei 25°C berechnet werden (Abb. 4.15 C). Die *burst*-Amplitude nimmt mit steigender Harnstoffkonzentration stark zu, so dass sie bei 7 M Harnstoff knapp 50 % der Gesamtamplitude erreicht.

Aus den erhaltenen Daten lässt sich ein Modell der Entfaltung von Barstar-pWT in Anlehnung an Zaidi *et al.* (1997) konstruieren. Aus der gefundenen *burst*-Amplitude geht hervor, dass ein Teil der Moleküle über ein sich bei hohen Harnstoffkonzentrationen schnell bildendes Intermediat I<sub>U1</sub> entfalten. In Anlehnung an das schon bestehende Modell, könnte der schnelle Entfaltungsprozess zu dem Intermediat I<sub>U2</sub> führen. Im Gegensatz zu Barstar-WT und W38F/W44F scheint dieses Intermediat bei pWT langsamer mit der makroskopischen

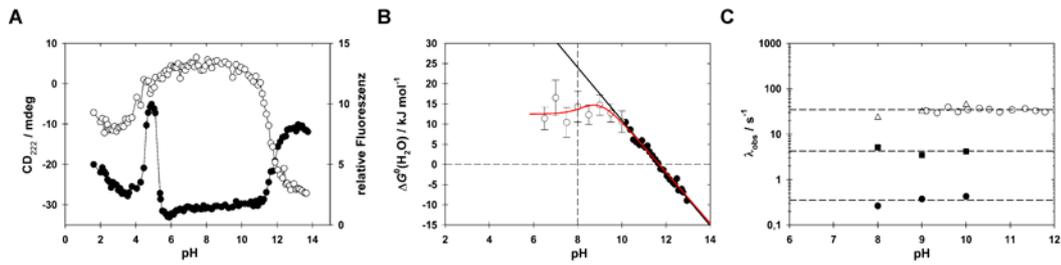
Geschwindigkeitskonstante ( $\lambda_1$ ) gebildet zu werden, so dass es direkt beobachtbar ist. Der weitere Entfaltungsweg dieses Intermediates kann nicht schlüssig aus den vorhandenen Daten deduziert werden. Im einfachsten Modell entfaltet dieses Intermediat direkt und über keine weiteren Zwischenstufen mit der makroskopischen Geschwindigkeitskonstante  $\lambda_2$  zu U (Abb. 4.15 D).

Die Existenz zweier, von nativen Molekülen ausgehenden Wegen könnte auf einer strukturellen Heterogenität des nativen Proteins beruhen. Worin diese, falls vorhanden, jedoch besteht, kann aus den gezeigten Experimenten nicht geschlossen werden. Die Peptidylprolyl-Bindung Y47-P48 könnte eine Ursache für einen heterogenen nativen Zustand sein. In der Tat besitzt die Gleichgewichtskonstante zwischen der nativen *cis*-Konformation und dessen *trans*-Pendant bei 15°C einen Wert von 11,66 (Golbik *et al.*, 1999). Dies bedeutet einen *trans*-Anteil von rund 10 %, ähnlich dem Wert der relativen Amplitude der schnellen Entfaltungsreaktion ( $\lambda_1$ ).

#### 4.2.5. pH-Stabilität von Barstar-pWT

Die Technik des Amidprotonenaustausches ist geeignet, um die Geschwindigkeitskonstanten von Entfaltungsreaktionen bzw. Öffnungsreaktionen, mit Rest-spezifischer Auflösung zu verfolgen. Positionsspezifische Unterschiede in den Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungsreaktionen verschiedener Amidprotonen können Aufschluss über die strukturellen Eigenschaften von Entfaltungsintermediaten geben. Hierfür eignen sich besonders Amidprotonenaustausch-Experimente unter EX1-Bedingungen. Da für eine solche Analyse der pH-Wert der Lösung über einen weiten Bereich variiert werden muss, ist es entscheidend, dass die Stabilität des Proteins wie auch die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion unabhängig vom pH-Wert sind.

Die Stabilität von Barstar-pWT wurde deshalb bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Zwischen pH 6,5 und pH 10 ist kein Unterschied im Fluoreszenz-Signal bei 320 nm wie auch im Fern-UV-CD-Signal bei 222 nm zu beobachten (Abb. 4.16 A). Eine Entfaltung des Proteins erfolgt allerdings bei pH > 10. Bei niedrigen pH-Werten, d.h. unterhalb des isoelektrischen Punktes des Proteins ( $pI \leq 4,9$ ), existiert das Protein im Form eines *molten-globule*-Zustand, des A-Zustandes (Juneja *et al.*, 2002). Die Charakteristika eines *molten-globule* bestehen in einer veränderten Tertiärstruktur unter Beibehaltung der Sekundärstruktur des Proteins (Finkelstein und Ptitsyn, 2002). Das nativ-ähnliche CD-Signal bei einem dem entfalteten Zustand ähnlichen Fluoreszenz-Signal (Abb. 4.16 A) wird dadurch erklärt. Bei Annahme, dass die Stabilität des Proteins im Übergangsbereich linear vom pH-Wert abhängt (Rami und Udgaonkar, 2001), kann der Konformationsübergang bei hohen pH-Werten genutzt werden um, die Stabilität des



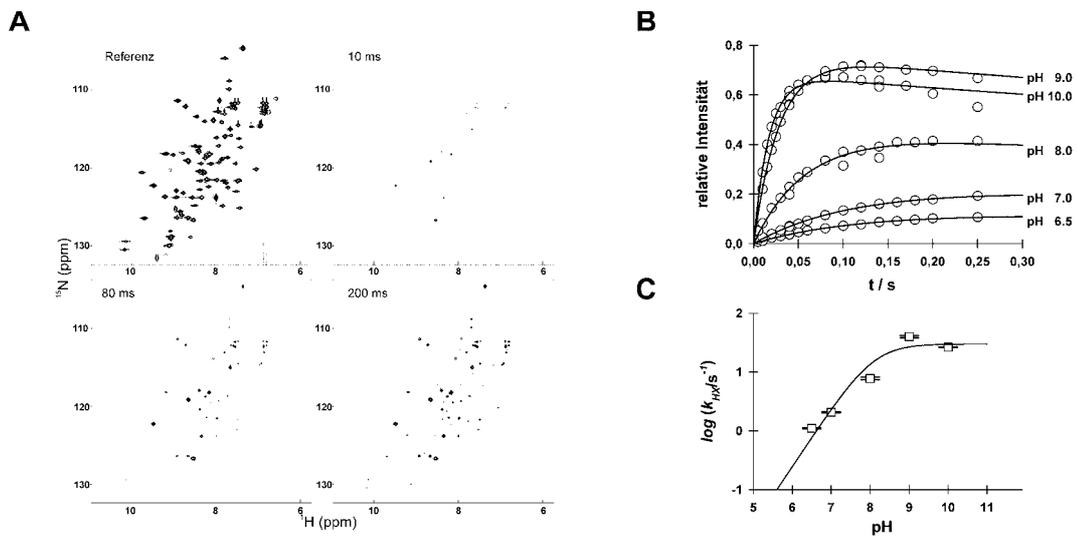
**Abbildung 4.16 pH-Stabilität von Barstar-pWT.** (A) Fern-UV-CD-Signal bei 222 nm (Schwarz) sowie Fluoreszenz-Signal (Weiß) bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm als Funktion des pH-Wertes. (B) Stabilität von Barstar-pWT aus Harnstoff-induzierten (Weiß) und pH-induzierten Übergangskurven. Die Entfaltung wurde mittels Fluoreszenz bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm detektiert. Rote Linie Anpassung nach [3.11]. Die schwarze Linie kennzeichnet die lineare Abhängigkeit von  $\Delta G^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$  im Bereich des Übergangsmittelpunktes (C) Geschwindigkeitskonstanten der schnelleren (■) ( $\lambda_1$ ) und langsameren Entfaltungsreaktion (●) ( $\lambda_2$ ) sowie der Faltungsreaktion ausgehend vom Harnstoff-denaturierten ( $\Delta$ ) und pH-denaturierten Protein ( $\circ$ ). Die Proteinkonzentration betrug 2  $\mu\text{M}$  (A und B) sowie 5  $\mu\text{M}$  (C). Alle Messungen wurden bei 25°C in Standardpuffer mit dem angegebenen pH-Wert durchgeführt.

Proteins zu bestimmen. Zusätzlich kann die Stabilität im pH-Bereich von 6,5 – 10, in dem ausschließlich native Moleküle vorliegen, mittels Harnstoff-induzierten Übergangskurven bestimmt werden. Im Rahmen des Fehlers kann in diesem pH-Bereich keine Änderung der Stabilität des Proteins festgestellt werden (Abb. 2.16 B). Gleiches trifft auch für die Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung und Entfaltung ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ) im pH-Bereich zwischen pH 8 und pH 10 zu (Abb. 2.16 C).

Die Annahme, dass die thermodynamische und die kinetische Stabilität von pWT unabhängig vom pH-Wert ist, ist für pWT im pH-Bereich zwischen pH 6,5 und pH 10 gegeben.

#### 4.2.6. Amidprotonen-Austausch in Barstar-pWT

Die Kinetik des Amidprotonenaustausches wurden mit der New MEXICO-Technik gemessen, die für <sup>15</sup>N-markierte Proteine abgewandelt wurde (3.2.7.1.). Diese Technik ermöglicht die Bestimmung schneller Austauschprozesse in einem Zeitfenster von 300 ms. Für Barstar-WT konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl aller Amidprotonen bei pH 6,7 innerhalb von 5 min gegen Deuteronen austauschbar ist (Bhuyan und Udgaonkar, 1998). Gleiches gilt für die Variante pWT\* (Wong *et al.*, 1997). Auch für Barstar-pWT konnte ein solch schneller Amidprotonen-Austausch festgestellt werden. Innerhalb der ersten 200ms wird die Mehrzahl

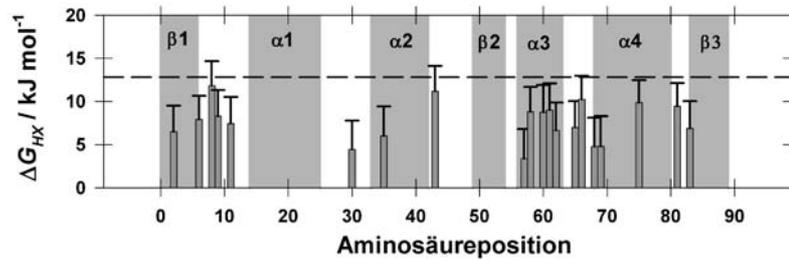


**Abbildung 4.17 Amidprotonen-Austausch von Barstar-pWT.** (A) <sup>15</sup>N-HSQC-NMR Spektren bei pH 7.0 vor dem Amidprotonen-Austausch (Referenz) sowie 10 ms, 80 ms, 200 ms nach Start des Amidprotonen-Austausches. (B) Austauschkinetik für das Amidproton des Restes K2 bei verschiedenen pH-Werten. (C) Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten des Amidprotonen-Austausches ( $k_{HX}$ ) für K2 als Funktion des pH-Wertes. Die Linien in B und C sind Anpassungen nach [3.9] und [2.49]. Alle Messungen wurden in Standardpuffer bei 25°C unter Zusatz von 10 % D<sub>2</sub>O bei einer Proteinkonzentration von 1 mM durchgeführt.

aller Amidprotonen gegen Protonen des Lösungsmittels ausgetauscht (Abb. 4.17 A). Dies ermöglichte die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten des Amidprotonen-Austausches ( $k_{HX}$ ) für einen Großteil aller Amidprotonen des Peptidrückgrates. Die Kinetik des Austausches wurde bei fünf verschiedenen pH-Werten (6,5; 7; 8; 9; 10) gemessen (Abb. 4.17 B; Anhang VI). Wie nach [2.49] erwartet, wurde eine Beschleunigung des Austausches mit steigenden pH-Werten beobachtet (Abb. 4.17 C). Für 20 der beobachteten Amidprotonen konnte der Übergang vom EX2 zum EX1-Austauschmechanismus beobachtet werden. Die meisten Amidprotonen werden allerdings über den gesamten pH-Bereich im EX1-Mechanismus ausgetauscht. Der schnelle Amidprotonen-Austausch von pWT ist nicht überraschend. So konnte mittels Molekular-Dynamik-Simulationen und <sup>19</sup>F-NMR gezeigt werden, dass der hydrophobe Kern des Proteins ausreichend flexibel ist, um selbst Ring-Drehungen des Phenylalanins 56 zu tolerieren (Wong und Daggett, 1998; Li und Frieden, 2007).

#### 4.2.7. Austausch über den EX2-Mechanismus

Für die Amidprotonen, die bei niedrigen pH-Werten einen Austausch über den EX2-Mechanis-



**Abbildung 4.18**  $\Delta G_{HX}$ -Werte für 20 Amidprotonen. Die Werte wurden anhand der mit [2.49] auf pH 5 extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{HX}$  und den zugehörigen intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{int}$  bestimmt. Die Sekundärstruktur-Elemente sind mit  $\alpha$  für Helices und  $\beta$  für Faltblätter gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie ist die aus den Harnstoff-induzierten Übergangskurven (Abb. 4.16 B) erhaltene Stabilität.

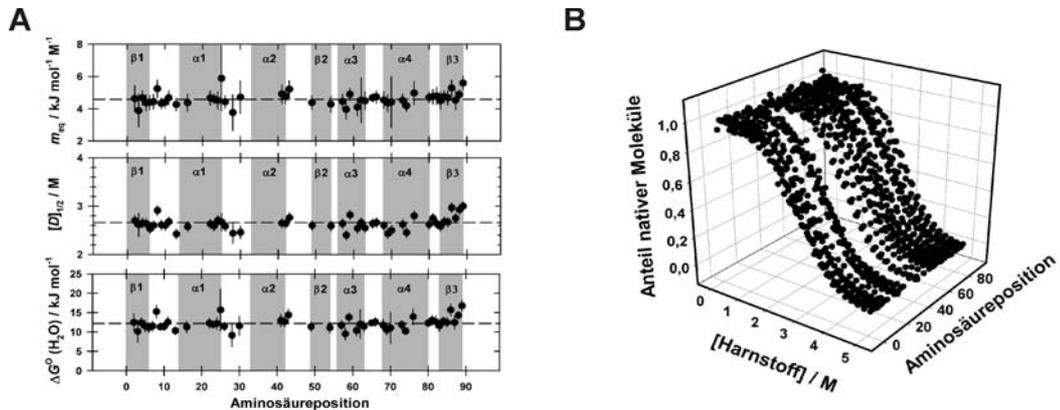
mus zeigen, kann bei Kenntnis der intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten des Austausches die Differenz der freien Reaktionsenthalpien ( $\Delta G_{HX}$ ) zwischen geschlossener und offener Konformation des betreffenden Amidprotons bestimmt werden (2.6.1.). Der Austausch von Amidprotonen eines Proteins kann auf verschiedene Weise erfolgen (Bai *et al.*, 1995). So werden Amidprotonen durch globale oder lokale Entfaltungsprozesse dem Lösungsmittel zugänglich und damit Austausch-kompetent. Über die Differenz der freien Reaktionsenthalpien können damit isostabile Faltungseinheiten innerhalb der Proteins ermittelt werden. So konnten z.B. für Cytochrom C Regionen lokaler Entfaltungsprozesse gefunden werden. Neben Entfaltungsprozessen können auch Fluktuationen durch die intrinsische Dynamik der nativen Moleküle die Ursache von Austauschreaktionen der Amidprotonen sein (Bai *et al.*, 1995; Milne *et al.*, 1999; Maity *et al.*, 2003).

Nur eine sehr geringe Anzahl von Resten (E8, G43, Q58, K60, Q61, G66, R75, G81) zeigten  $\Delta G_{HX}$ -Werte die ähnlich der aus den Harnstoff-induzierten Übergangskurven (Abb. 4.16 B, Anhang V) erhaltenen globalen Stabilität ( $\Delta G^0(\text{H}_2\text{O}) = 12,8 \pm 0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) sind (Abb. 4.18). Überraschend ist, dass keine eindeutige Korrelation der  $\Delta G_{HX}$ -Werte mit der Sekundärstruktur des Proteins zu finden ist. Gewöhnlich sind Amidprotonen in Sekundärstrukturen wie Helices und Faltblättern in Wasserstoffbrücken eingebunden und damit besonders vor einem Austausch geschützt. Die niedrigen  $\Delta G_{HX}$ -Werte für die Mehrheit der Reste könnten entweder aus Fluktuationen der Struktur im nativen Zustand oder aber aus lokalen Entfaltungsprozessen resultieren. Lokale und globale Entfaltungsprozesse sind immer kooperativ. Das bedeutet, dass eine Gruppe, im Falle der lokalen Entfaltung, oder auch alle Amidprotonen, im Falle der globalen Entfaltung, kollektiv dem Lösungsmittel zugänglich werden. Während eines solchen Prozesses ändert sich die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche (*solvent accessible*

surface area, SASA) des Proteins beträchtlich. Im Gegensatz dazu stellen Fluktuationen des nativen Zustandes unkorrelierte Öffnungsereignisse dar. Die Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche des Proteins wird im Falle von Fluktuationen nur unwesentlich geändert. Eine Unterscheidung zwischen beiden Möglichkeiten ist nur dann möglich, wenn Informationen über die Stabilitätsparameter wie Kooperativität ( $m_{eq}$ ) und die Halb-Denaturanzkonzentration ( $[D]_{1/2}$ ), Rest-spezifisch erhalten werden können. Die Kooperativität mit der ein Protein entfaltet korreliert mit der Änderung von dessen Lösungsmittel-zugänglicher Oberfläche (Myers *et al.*, 1995). Wird  $\Delta G_{HX}$  bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen bestimmt, so sollte für dessen Sensitivität ( $m_{eq}^{HX}$ ) gegenüber der Denaturanzkonzentration im Falle eines Austausches über Fluktuationen bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen  $m_{eq}^{HX} = 0$  gelten. Bei hohen Harnstoffkonzentrationen wird jedoch der Austausch durch die globale Entfaltung des Proteins schneller und es wird  $m_{eq}^{HX} = m_{eq}^{Global}$ .  $\Delta G_{HX}$  ist in diesem Falle also keine lineare Funktion der Denaturanzkonzentration. Sind lokale Entfaltungsprozesse die Ursache für den Austausch eines Amidprotons, gilt  $m_{eq}^{HX} < m_{eq}^{Global}$ . Allerdings sollte  $\Delta G_{HX}$  über den gesamten Denaturanz-Bereich linear sein. Die New-MEXICO-Technik kann jedoch nicht in Gegenwart von Substanzen wie Harnstoff, die ebenfalls ihre Protonen gegen Lösungsmittel-Protonen austauschen können, durchgeführt werden.

#### 4.2.8. Harnstoff-induzierte Übergangskurven mittels NMR

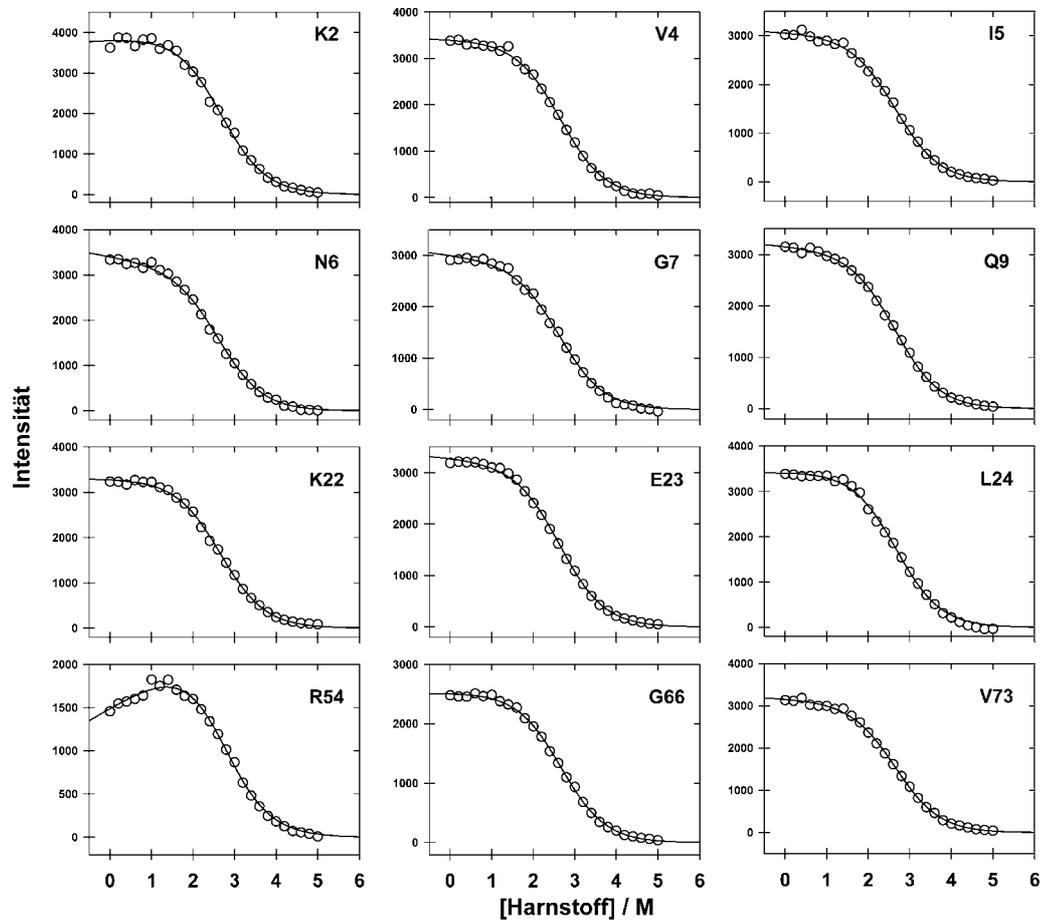
Mittels Einzelmolekülspektroskopie konnte gezeigt werden, dass im thermodynamischen Gleichgewicht und in Gegenwart von Harnstoff ausschließlich native und entfaltete Moleküle vorliegen. Da jedoch nur Informationen über den Abstand zwischen den beiden Positionen 12 und 89 erhalten wurden, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass andere Regionen des Moleküls lokal entfalten und im thermodynamischen Gleichgewicht zu einem detektierbaren Anteil an partiell entfaltenen Molekülen führen. Aus diesem Grunde wurden Harnstoff-induzierte Übergangskurven mittels  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-NMR anhand der Protonensignale einzelner Reste aufgenommen. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass die auf solche Art ermittelten Übergangskurven nicht mit den Daten des Amidprotonen-Austausches verglichen werden können. Sehr geringe Anteile an partiell entfaltenen Intermediaten können mit dieser Methode nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu werden mit der Methode des Amidprotonen-Austausches vor allem die Spezies detektiert, die den schnellsten Austausch für ein gegebenes Amidproton zeigen. Selbst geringe Anteile an lokal entfaltenen Molekülen können so identifiziert werden. Die mittels  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-NMR gemessenen Harnstoff-induzierten Übergangskurven können also nur eine grobe Vorstellung



**Abbildung 4.19** Stabilitätsparameter aus den mittels  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-NMR aufgenommenen Übergangskurven. (A) Verteilung der Stabilitätsparameter über die Aminosäurepositionen. Gestrichelte Linien sind die arithmetischen Mittelwerte der Parameter. (B) Normierte Harnstoff-induzierte Übergangskurven. Die Proteinkonzentration betrug 1 mM. Die Messungen erfolgten in Standardpuffer in Gegenwart von 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $25^\circ\text{C}$ .

über die in Gegenwart von Harnstoff im Gleichgewicht populierte Spezies geben.

Insgesamt konnten für 48 Reste Harnstoff-induzierte Übergangskurven aufgenommen werden. Aus den mittels  $^{15}\text{N}$ -TROSY-HSQC-NMR erhaltenen NMR-Spektren bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen wurden nur die Amidprotonen-Signale für die Auswertung verwendet, die nicht mit denen anderer Reste überlappen. Der Harnstoff-induzierte Übergang sowie dessen Stabilitätsparameter (Anhang VI) konnten anhand von 48 Amidprotonen-Signalen verfolgt werden (Abb. 4.19 A und B). Die aus den 48 Übergangskurven erhaltenen mittleren Stabilitätsparameter ( $\langle m_{eq} \rangle = 4,6 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $\langle [D]_{1/2} \rangle = 2,66 \pm 0,18 \text{ M}$ ,  $\langle \Delta G^0(\text{H}_2\text{O}) \rangle = 12,1 \pm 1,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) stimmen gut mit den mittels Fluoreszenz-Spektroskopie (Abb. 4.16 B) bestimmten Werten ( $m_{eq} = 4,7 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $[D]_{1/2} = 2,74 \pm 0,05 \text{ M}$ ,  $\Delta G^0(\text{H}_2\text{O}) = 12,8 \pm 0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) überein. Die C-terminal gelegene Reste scheinen eine systematisch höhere Stabilität im Vergleich zu den mittleren Stabilitätsparametern aufzuweisen (Abb. 4.19 A). Um entscheiden zu können, ob die Abweichungen der mittels NMR-Spektroskopie erhaltenen Stabilitätsparameter von ihren Mittelwerten zufällig oder systematisch sind, wurden alle 48 Übergangskurven erneut angepasst. Dabei wurden die erhaltenen mittleren Stabilitätsparameter fest vorgegeben. Jede einzelne der 48 Übergangskurven ließ sich befriedigend mit den mittleren Stabilitätsparametern beschreiben (Abb. 4.20). Das generelle Kriterium für das Vorliegen eines Zwei-Zustands-Modells, dass mit zwei oder mehreren Sonden dieselbe Stabilität erhalten wird (Eftink und Ionescu, 1997), ist für Barstar-pWT erfüllt. Die mittels Einzelmolekülspektroskopie gemachte Beobachtung, dass die Faltung von Barstar-pWT im thermodynamischen Gleichge-

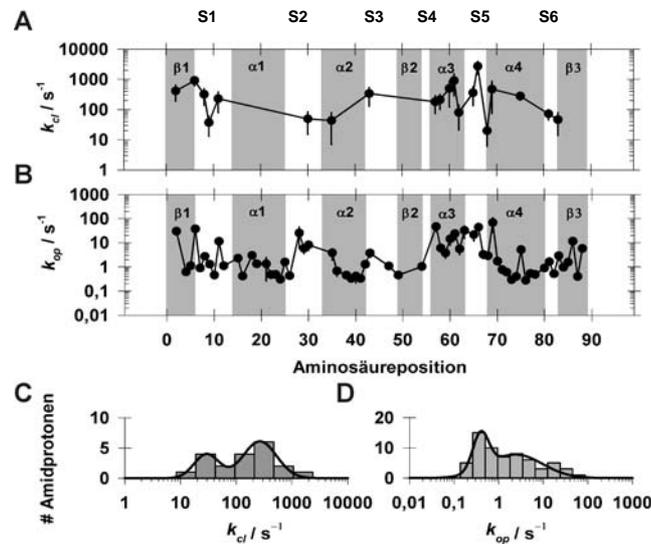


**Abbildung 4.20 Harnstoff-induzierte Übergangskurven für ausgewählte Reste von Barstar-pWT.** Die durchgezogenen Linien sind Anpassungen nach dem Zwei-Zustandsmodell [3.10] unter Nutzung der mittleren Stabilitätsparameter  $\langle m_{eq} \rangle = 4,6 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  und  $\langle [D]_{1/2} \rangle = 2,66 \pm 0,18 \text{ M}$ .

wicht und in Gegenwart von Denaturanzien mit einem Zwei-Zustandsmodell beschrieben werden kann, wird hier also nochmals bestätigt. Lokal entfaltete Moleküle konnten nicht detektiert werden. Dies bedeutet selbstverständlich nicht, dass diese nicht existieren, sondern nur, dass sie nicht in ausreichendem Maße populiert werden.

#### 4.2.9. Die Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungs- und Schließreaktion

Für 20 Amidprotonen von pWT konnte ein Übergang vom EX2 zum EX1 Austauschmechanismus beobachtet werden. Das ermöglicht die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Schließreaktion ( $k_{cl}$ ) der betreffenden Amidprotonen nach [2.49]. In Abhängigkeit der Positionen der Amidprotonen reichen die Werte von  $1 \text{ s}^{-1}$  ( $\tau = 1 \text{ s}$ ) bis  $2000 \text{ s}^{-1}$



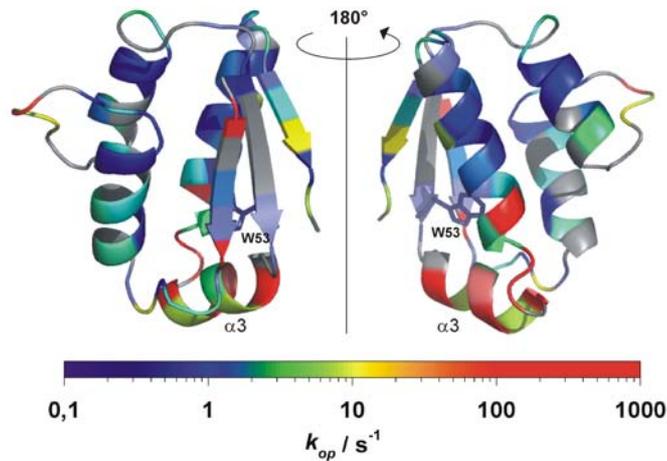
**Abbildung 4.21 Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungs- und Schließreaktion.** (A)  $k_{cl}$  für 20 Amidprotonen von Barstar-pWT. (B)  $k_{op}$  für 64 Amidprotonen von Barstar-pWT. (C) Häufigkeitsverteilung von  $k_{cl}$ . (D) Häufigkeitsverteilung von  $k_{op}$ .

( $\tau = 500 \mu\text{s}$ ) (Abb. 4.21 A). Eine gewisse Korrelation der  $k_{cl}$ -Werte mit der Sekundärstruktur ist erkennbar. Beispielsweise werden niedrige  $k_{cl}$ -Werte in den Schleifen S1, S2 und S6 erhalten (Abb. 4.21 A). Im Gegensatz dazu werden hohe  $k_{cl}$ -Werte in Sekundärstruktur-Elementen wie Helices ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ) und dem N-terminalen  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta 1$ ) gefunden (Abb. 4.21 A). Solche starken Variationen der  $k_{cl}$ -Werte wurden auch für andere Proteine wie Lysozym (Pedersen *et al.*, 1993), ACBP (Kragelund *et al.*, 1998), OMTYK3 (Arrington und Robertson, 1997), Hisactophilin (Houliston *et al.*, 2002) und CspA (Rodriguez *et al.*, 2002) gefunden. Die enorme Heterogenität der  $k_{cl}$ -Werte von pWT ließe sich durch eine ausgeprägte Dynamik des nativen Zustandes erklären. Für solche unkooperativen Fluktuationen im nativen Zustand sollten die Geschwindigkeitskonstanten der Schließreaktion vor allem durch ihre Position in der Aminosäuresequenz und Tertiärstruktur bestimmt sein. Allerdings können auch kooperative Faltungsprozesse ausgehend von partiell entfalteten Molekülen als Ursache nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Wie in 4.2.6. angedeutet, kommen im Amidprotonen-Austausch schnellere Prozesse stärker zur Geltung als langsamere. Die Faltung von sehr gering populierte, partiell entfalteten Intermediaten kann sich demnach auch in den Geschwindigkeitskonstanten der Schließreaktion niederschlagen wenn diese schnell genug im Vergleich zu allen anderen Prozessen sind. Allerdings ist, wie im Falle der  $\Delta G_{HX}$ -Werte, eine Unterscheidung zwischen unkooperativen Fluktuationen und kooperativen Faltungsreaktionen schwierig. Ein Hinweis auf kooperative Faltungsreaktionen kann aus der Häufigkeitsverteilung

der  $k_{cl}$ -Werte der 20 Amidprotonen gezogen werden. Im Falle unkooperativer Fluktuationen sollte der  $k_{cl}$ -Wert jedes Amidprotons ausschließlich von seiner Position in der Tertiärstruktur anhängen. Da die Umgebung für jedes der 20 Amidprotonen unterschiedlich ist, sollte die Häufigkeits-Verteilung der  $k_{cl}$ -Werte ebenfalls sehr breit sein. Im Gegensatz dazu besitzt bei kooperativen Faltungsreaktionen eine Gruppe von Amidprotonen dieselbe Geschwindigkeitskonstante der Schließreaktion. Die Häufigkeitsverteilung der  $k_{cl}$ -Werte sollte deshalb wesentlich schmaler sein und gegebenenfalls, in Abhängigkeit von der Anzahl der entfalteten Spezies, mehrere Maxima aufweisen. Die aus den 20 Amidprotonen ermittelte Häufigkeitsverteilung zeigt 2 Maxima mit  $k_{cl}$ -Werten von  $600 \text{ s}^{-1}$  und  $30 \text{ s}^{-1}$  (Abb. 4.21 C). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass kooperative Faltungsreaktionen einen Einfluss auf die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Schließreaktionen besitzen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die 20 Amidprotonen nur 22 % aller Amidprotonen des Peptidrückgrates entsprechen. Sie stellen demzufolge keine ausreichend große Stichprobenmenge dar, um die exakte Häufigkeitsverteilung adäquat zu repräsentieren.

Da für die meisten Amidprotonen die Austauschreaktion über einen sehr großen pH-Bereich nach dem EX1-Mechanismus erfolgt, konnten die Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungsreaktion ( $k_{op}$ ) für insgesamt 64 Amidprotonen bestimmt werden. Dies entspricht 73 % aller Amidprotonen des Peptidrückgrates. Im Gegensatz zu den  $k_{cl}$ -Werten, deren Genauigkeit von der Kenntnis von  $k_{int}$  abhängt, können die  $k_{op}$ -Werte mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Überraschenderweise werden auch für die  $k_{op}$ -Werte große Variationen in Abhängigkeit von der Position der Amidprotonen gefunden (Abb. 4.21 B). Die  $k_{op}$ -Werte reichen von  $0,2 \text{ s}^{-1}$  bis  $40 \text{ s}^{-1}$ . Große  $k_{op}$ -Werte werden in den Schleifen S1 und S2, am N-Terminus sowie am C-Terminus gefunden. Insbesondere in der Region zwischen den Resten 58 – 68 (Helix 3 und die sich anschließende Schleife S5) wurden sehr hohe  $k_{op}$ -Werte gefunden. Die Häufigkeitsverteilung der  $k_{op}$ -Werte ist wie die der  $k_{cl}$ -Werte bimodal. Die beiden Populationen von Amidprotonen zeigen eine scharfe Verteilung der  $k_{op}$ -Werte bei  $0,3 \text{ s}^{-1}$  und eine breitere Verteilung bei  $2 - 10 \text{ s}^{-1}$  (Abb. 4.21 D). Da die Stichprobengöße ausreichend ist, spiegeln die  $k_{op}$ -Werte offensichtlich lokale Entfaltungsprozesse von pWT wider. Die breite Verteilung mit  $k_{op}$ -Werten zwischen 2 und  $10 \text{ s}^{-1}$  lässt aber vermuten, dass auch unkooperative Fluktuationen einen großen Einfluss auf die Werte der Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungsreaktionen besitzen.

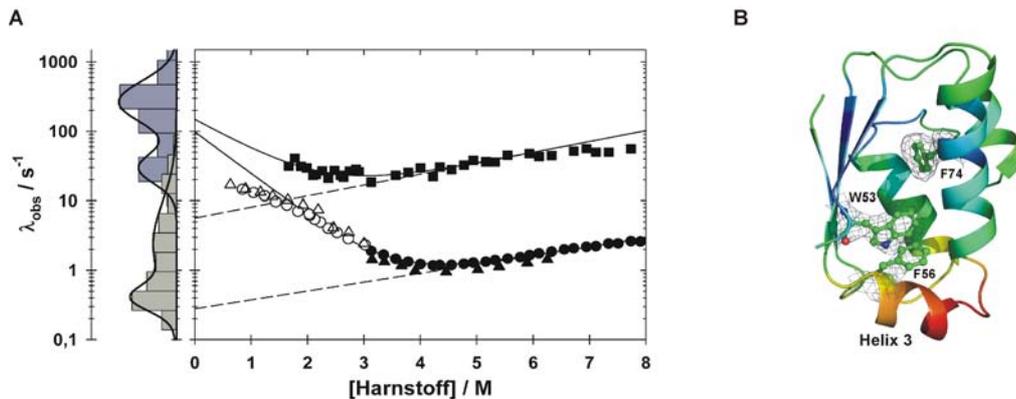
Werden die  $k_{op}$ -Werte farblich auf der Struktur von Barstar-pWT abgebildet, lässt sich eine Häufung hoher  $k_{op}$ -Werte im Bereich von Helix 3 und der benachbarten Schleife finden (Abb. 4.22). Für diese Region konnten  $\Delta G_{HX}$ -Werte ähnlich dem der globalen Stabilität bestimmt werden. Das impliziert, dass die hohen  $k_{op}$ -Werte zwischen Position 58 und 68 nicht



**Abbildung 4.22** Struktur von Barstar-WT (pdb-file 1bta). Die Aminosäurereste sind entsprechend der  $k_{op}$ -Werte eingefärbt. Das Tryptophan 53 im hydrophoben Kern ist markiert.

auf unkooperativen Fluktuationen der nativen Struktur, sondern auf lokalen kooperativen Entfaltungsprozessen beruhen. Interessanterweise wurde für pWT mittels  $\Phi$ -Wert-Analyse festgestellt, dass Helix 3 im Übergangszustand der Faltungsreaktion nur unvollständig ausgebildet ist (Nölting *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass sich dieses Sekundärstruktur-Element im letzten Schritt der Faltung bildet. Die Häufung hoher  $k_{op}$ -Werte in Helix 3 impliziert umgekehrt eine lokale Entfaltung in dieser Region.

Die aus Amidprotonen-Austausch-Experimenten erhaltenen  $k_{op}$ - und  $k_{cl}$ -Werte müssen nicht notwendigerweise mit den aus kinetischen Experimenten erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung übereinstimmen. Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungs- und Schließreaktion mit denen aus dem Chevron-Diagramm unter nativen Bedingungen erwarteten Werten zeigt für Barstar-pWT jedoch eine gute Übereinstimmung (Abb. 4.23 A). Für die Reste in Helix 3 (Q58, K60, Q61, L62, N65 und G66) wird ein mittlerer  $\Delta G_{HX}$ -Wert von  $8,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  gefunden (Abb. 4.18, Anhang V). Laut dem von Zaidi *et al.* (1997) vorgeschlagenen Modell wird  $I_{U2}$  auf einem der beiden Wege von N nach U populiert (Abb. 4.15 D). Unter der Annahme, dass die schnelle Entfaltungsreaktion ( $\lambda_1$ ) dem Schritt von N zu  $I_{U2}$  entspricht und  $I_{U2}$  während der um mehr als eine Größenordnung langsameren Entfaltungsreaktion zu U entfaltet, kann die Stabilität von  $I_{U2}$  relativ zu N aus den auf 0 M Harnstoff extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten mittels [2.7] abgeschätzt werden (2.2.2.). Für die Faltung ausgehend von  $I_{U2}$  erhält man aus dem Chevron-Diagramm eine Geschwindigkeitskonstante von  $143 \text{ s}^{-1}$  und für die der Entfaltung eine Geschwindigkeitskonstante von  $5,7 \text{ s}^{-1}$ . Dies entspricht einer Stabilitätsdifferenz zwischen N und  $I_{U2}$  von  $8 \text{ kJ mol}^{-1}$  in Übereinstimmung mit dem mittleren Wert von  $\Delta G_{HX}$  für die Region der Helix 3. Die Daten



**Abbildung 4.23 Vergleich von  $k_{op}$  und  $k_{cl}$  mit dem Chevron-Diagramm von Barstar-pWT sowie Darstellung des hydrophoben Kerns von Barstar. (A)** Chevron-Diagramm sowie normierte Häufigkeitsverteilungen von  $k_{op}$  und  $k_{cl}$ . **(B)** Kristallstruktur von Barstar C40A (pdb-file 1a19). Die aromatischen Reste des hydrophoben Kernes des Proteins sind mit ihren Elektronendichten ( $1\sigma$ ) hervorgehoben.

würden also für ein Modell sprechen, in dem auf einem der beiden Wege Helix 3 in einem ersten Schritt entfaltet. Da W53 im hydrophoben Kern des Proteins in direkter Nachbarschaft zu Helix 3 liegt (Abb. 4.23 B), sollte dieser lokale Entfaltungsschritt auch sensitiv anhand der Fluoreszenz von W53 verfolgt werden können. Das würde die mittels intrinsischer Fluoreszenz detektierte schnelle Entfaltungsreaktion erklären. Da der Entfaltungsmechanismus von Barstar-pWT jedoch nicht vollständig bekannt ist, bleibt die Frage, ob das in dieser Arbeit für pWT gefundene Entfaltungsintermediat mit  $I_{U2}$  identisch ist oder nicht, zunächst unbeantwortet. Allerdings kann aus der Koinkidenz der aus der Chevron-Auftragung auf 0 M Harnstoff extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung und der mittels Amidprotonenaustausch bestimmten  $k_{op}$ -Werte mit einiger Sicherheit auf eine gemeinsame Ursache, die lokale Entfaltung von Helix 3 geschlossen werden.

Von Zaidi *et al.* (1997) wurde die Frage aufgeworfen, ob der Entfaltungsweg eines Proteins unter nativen Bedingungen mit dem bei hohen Denaturanzkonzentrationen identisch ist. Für Barstar-pWT scheint dies nach den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen der Fall zu sein.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten die initialen Schritte der Faltung und Entfaltung des Modellproteins Barstar-pWT charakterisiert werden. Dabei kamen insbesondere zwei Techniken zum Einsatz. Die Methode der Einzelmolekülspektroskopie gekoppelt mit FRET ermöglicht die Analyse einzelner Subpopulationen von Proteinen, selbst wenn diese nur zu einem geringen Anteil populiert werden. So sind z.B. entfaltete Moleküle selbst unter nativen Bedingungen einer Analyse zugänglich. Allerdings liefert diese Methode ausschließlich Informationen über den Abstand zwischen zwei Positionen im Molekül. Im Gegensatz dazu ist die NMR-Spektroskopie, insbesondere in Kombination mit der Technik des Amidprotonen-Austausches, geeignet, um Informationen über einzelne Aminosäure-Reste des Proteins zu erhalten. Im Vergleich zur Einzelmolekülspektroskopie hat diese Methode jedoch den Nachteil, dass nur Mittelwerte der Signale aller in der Probe vorliegenden Moleküle erhalten werden. Beide Methoden liefern somit einander komplementäre Informationen und sollten in der vorliegenden Arbeit kombiniert zum Einsatz kommen.

Die Variante pWT S12C/S89C wurde mit den Farbstoffen Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594 spezifisch an den Positionen 12 und 89 markiert. Die Methode der Einzelmolekülspektroskopie gekoppelt mit FRET erlaubte die Separation von nativen und entfalteten Molekülen der markierten Variante pWT S12C/S89C (pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup>) bei verschiedenen Denaturanzkonzentrationen. Dies ermöglichte Abstandsmessungen im entfalteten Protein unter Bedingungen, bei denen die überwiegende Anzahl von Molekülen in einer nativen Konformation vorliegen. Es konnte festgestellt werden, dass der Gyrationradius von entfaltetem pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> mit sinkenden Konzentrationen an Harnstoff und GdmCl abnimmt. Der Verlauf dieser Abnahme ist jedoch in den beiden Denaturanzien Harnstoff und GdmCl

verschieden. Während bei hohen Denaturanzkonzentrationen identische Gyrationradien von 28 Å erreicht wurden, divergierten die Gyrationradien mit sinkenden Harnstoff- und GdmCl-Konzentrationen. Dies führt zu dem paradoxen Schluss, dass in Abhängigkeit des gewählten Denaturanz für 0 M Denaturanz unterschiedliche Gyrationradien erwartet werden. Die Diskrepanz zwischen den Gyrationradien bei geringen Harnstoff- und GdmCl-Konzentrationen wurde darauf zurückgeführt, dass GdmCl, im Gegensatz zu Harnstoff, ein Salz ist. Da die Polypeptidkette von Barstar unter den gegebenen Bedingungen eine Netto-Ladung von -8 besitzt, wurde angenommen, dass dies die Ursache für die beobachtete Diskrepanz im Verhalten der Polypeptidkette bei geringen Denaturanzkonzentrationen ist. Während GdmCl bevorzugt Wasserstoffbrücken zu negativ geladenen Aminosäuren ausbildet (O'Brien, 2007) und zudem als Salz zu einer Abschirmung (*screening*) der intrinsischen Ladungen der Polypeptidkette in der Lage sein sollte, ist Harnstoff zwar ein polares, insgesamt jedoch neutrales Denaturanz. Elektrostatische Interaktionen werden durch Harnstoff nicht beeinflusst (O'Brien, 2007). Während bei geringen Harnstoffkonzentrationen die elektrostatischen Abstoßungen innerhalb der Polypeptidkette eine weitere Abnahme des Gyrationradius verhindern, sind diese abstoßenden Kräfte in GdmCl nicht präsent. Ein geringerer Gyrationradius in GdmCl ist die Folge. Diese Hypothese wurde in einem zusätzlichen Experiment getestet. Die bei geringen Harnstoffkonzentrationen vorliegenden elektrostatischen Abstoßungen konnten mit dem Salz KCl unterdrückt werden, so dass bei 1,4 M Harnstoff ebenfalls eine Abnahme des Gyrationradius mit steigender KCl-Konzentration erreicht wurde. Eine Berechnung der elektrostatischen Energie innerhalb der entfalteten Polypeptidkette, basierend auf einem einfachen Modell des entfalteten Zustandes (Zhou, 2002a), ermöglichte eine Abschätzung der Coulomb-Energie unter nativen Bedingungen. Bei 0 M Denaturanz und einer Ionenstärke von 0,18 M sollten im entfalteten Zustand von pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> Coulomb-Energien vom 1,4 fachen der Raumtemperaturenergie (3,5 kJ mol<sup>-1</sup>) vorliegen.

Die berechneten Coulomb-Energien und ihre Änderung als Funktion der Denaturanzkonzentration legen nahe, dass die zur Bestimmung der Stabilität eines Proteins häufig genutzte lineare Extrapolationsmethode nur in gewissen Grenzen Gültigkeit besitzt. Eine nichtlineare Abhängigkeit der freien Reaktionsenthalpie der Entfaltung von der GdmCl-Konzentration konnte auch experimentell nachgewiesen werden. Ein Großteil der Abweichung der experimentell gefundenen Stabilität von der linearen Extrapolation konnte durch die in der entfalteten Kette vorliegenden Coulomb-Energien erklärt werden.

Mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz-Experimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Entfaltung von Barstar über ein partiell entfaltetes Intermediat verläuft. Auch wenn es nicht möglich war den genauen Mechanismus der Entfaltung von Barstar-pWT aufzuklären, konnten

Einsichten in die strukturellen Besonderheiten sowie die Energetik dieses Entfaltungsintermediates gewonnen werden. Mittels einer Methode zur Detektion schneller Amidprotonen-Austauschreaktionen konnten die Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungsreaktion für 72 % und die Geschwindigkeitskonstanten der Schließreaktion für 22% aller Amidprotonen bestimmt werden. Die Häufigkeitsverteilungen der Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungsreaktion wie auch der Schließreaktion sind bimodal und implizieren die Existenz mindestens eines Faltungsbzw. Entfaltungsintermediates. In Helix 3 von Barstar-pWT wurde eine Häufung von 100-fach erhöhten Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungsreaktion gefunden. Aus der Übereinstimmung der mittels Amidprotonen-Austausch bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungs- und Schließreaktion mit den mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz gefundenen Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung des Proteins wurde geschlussfolgert, dass Helix 3 in dem identifizierten Intermediat entfaltet vorliegt, während der Rest des Proteins nativ-ähnlich bleibt. Unter nativen Bedingungen scheint dieses Intermediat um  $8 \text{ kJ mol}^{-1}$  gegenüber dem nativen Zustand destabilisiert zu sein.

Damit ermöglichte die Kombination aus konventioneller *stopped-flow*-Kinetik mit NMR-gekoppelten Amidprotonen-Austausch die Identifizierung sowie strukturelle und energetische Charakterisierung eines während der Entfaltung des Proteins auftretenden Intermediates von Barstar-pWT.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agashe, V.R., Schmid, F.X., & Udgaonkar, J.B. 1997. Thermodynamics of the complex protein unfolding reaction of barstar. *Biochemistry*, 36(40), 12288-12295.
- Agashe, V.R., Shastry, M.C., & Udgaonkar, J.B. 1995. Initial hydrophobic collapse in the folding of barstar. *Nature*, 377(6551), 754-757.
- Agashe, V.R., & Udgaonkar, J.B. 1995. Thermodynamics of denaturation of barstar: evidence for cold denaturation and evaluation of the interaction with guanidine hydrochloride. *Biochemistry*, 34(10), 3286-3299.
- Alonso, D.O., Dill, K.A., & Stigter, D. 1991. The three states of globular proteins: acid denaturation. *Biopolymers*, 31(13), 1631-1649.
- Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181(96), 223-230.
- Ansari, A., Jones, C.M., Henry, E.R., Hofrichter, J., & Eaton, W.A. 1992. The role of solvent viscosity in the dynamics of protein conformational changes. *Science*, 256(5065), 1796-1798.
- Arrington, C.B., & Robertson, A.D. 1997. Microsecond protein folding kinetics from native-state hydrogen exchange. *Biochemistry*, 36(29), 8686-8691.
- Bai, Y., Milne, J.S., Mayne, L., & Englander, S.W. 1993. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins*, 17(1), 75-86.
- Bai, Y., Sosnick, T.R., Mayne, L., & Englander, S.W. 1995. Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange. *Science*, 269(5221), 192-197.
- Best, R.B., Merchant, K.A., Gopich, I.V., Schuler, B., Bax, A., & Eaton, W.A. 2007. Effect of flexibility and cis residues in single-molecule FRET studies of polyproline. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(48), 18964-18969.
- Bhaves, N.S., Juneja, J., Udgaonkar, J.B., & Hosur, R.V. 2004. Native and nonnative conformational preferences in the urea-unfolded state of barstar. *Protein Sci*, 13(12), 3085-3091.

- Bhuyan, A.K., & Udgaonkar, J.B. 1998. Two structural subdomains of barstar detected by rapid mixing NMR measurement of amide hydrogen exchange. *Proteins*, 30(3), 295-308.
- 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 USA*, 96(17), 9597-9601.
- Bieri, O., Kiefhaber, T. 2000. Kinetic models in protein folding. In: Mechanisms of protein folding. Pain, R.H.. Oxford University Press, New York.
- Brant, D.A., & Flory, P.J. 1965a. Role of dipole interactions in determining polypeptide configurations. *J Am Chem Soc.* 663.
- Brant, D.A., & Flory, P.J. 1965b. Configuration of random polypeptide chains .I. experimental results. *J Am Chem Soc.* 2788.
- Bryngelson, J.D., Onuchic, J.N., Socci, N.D., & Wolynes, P.G. 1995. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins*, 21(3), 167-195.
- Bryngelson, J.D., & Wolynes, P.G. 1987. Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(21), 7524-7528.
- Buckle, A.M., Schreiber, G., & Fersht, A.R. 1994. Protein-protein recognition: crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0-Å resolution. *Biochemistry*, 33(30), 8878-8889.
- Burton, R.E., Huang, G.S., Daugherty, M.A., Fullbright, P.W., & Oas, T.G. 1996. Microsecond protein folding through a compact transition state. *J Mol Biol*, 263(2), 311-322.
- Chaffotte, A.F., Guillou, Y., & Goldberg, M.E. 1992. Kinetic resolution of peptide bond and side chain far-UV circular dichroism during the folding of hen egg white lysozyme. *Biochemistry*, 31(40), 9694-9702.
- Chan, H.S., & Dill, K.A. 1991. Polymer principles in protein structure and stability. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 20, 447-490.
- Chan, H.S., & Dill, K.A. 1998. Protein folding in the landscape perspective: chevron plots and non-Arrhenius kinetics. *Proteins*, 30(1), 2-33.
- Connelly, G.P., Bai, Y., Jeng, M.F., & Englander, S.W. 1993. Isotope effects in peptide group hydrogen exchange. *Proteins*, 17(1), 87-92.
- Daggett, V., & Fersht, A. 2003. The present view of the mechanism of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(6), 497-502.
- Dahan, M., Deniz, A.A., Ha, T.J., Chemla, D.S., Schultz, P.G., & Weiss, S. 1999. Ratiometric measurement and identification of single diffusing molecules. *Chem Phys.* 85-106.
- Damaschun, G., Damaschun, H., Gast, K., & Zirwer, D. 1998. Denatured states of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry Mosc*, 63(3), 259-275.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., & Bax, A. 1995. NMRPipe: a

- multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR*, 6(3), 277-293.
- Deniz, A.A., Dahan, M., Grunwell, J.R., Ha, T., Faulhaber, A.E., Chemla, D.S., Weiss, S., & Schultz, P.G. 1999. Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Förster distance dependence and subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(7), 3670-3675.
- Deniz, A.A., Laurence, T.A., Beligere, G.S., Dahan, M., Martin, A.B., Chemla, D.S., Dawson, P.E., Schultz, P.G., & Weiss, S. 2000. Single-molecule protein folding: diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(10), 5179-5184.
- Dill, K.A. 1987. Protein surgery. *Protein Eng*, 1(5), 369-371.
- Dill, K.A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K.M., Yee, D.P., Thomas, P.D., & Chan, H.S. 1995. Principles of protein folding--a perspective from simple exact models. *Protein Sci*, 4(4), 561-602.
- Dill, K.A., & Chan, H.S. 1997. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol*, 4(1), 10-19.
- Eftink, M.R. & Ionescu, R. 1997. Thermodynamics of protein folding: questions pertinent to testing the validity of the two-state model. *Biophysical Chemistry*, 64, 175-197.
- Eyring, H. 1935. The activated complex in chemical reactions. *J Chem Phys*, 3, 107.
- Farrow, N.A., Zhang, O., Forman-Kay, J.D., & Kay, L.E. 1994. A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of <sup>15</sup>N longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium. *J Biomol NMR*, 4(5), 727-734.
- Fersht, A.R. 1999. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. W.H. Freeman and Company: New York Houndmills, Basingstroke.
- Finkelstein, A.V., Ptitsyn, O.B. 2002 Protein physics: a course of lectures. Academic Press: London.
- Flory, P.J. 1953. Molecular configuration of polyelectrolytes. *J Chem Phys*. 162-163.
- Flory, P.J. 1969. Statistical mechanics of chain molecules. Hanser, München.
- Freund, S.M., Wong, K.B., & Fersht, A.R. 1996. Initiation sites of protein folding by NMR analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(20), 10600-10603.
- Frieden, C., Hoeltzli, S.D., & Ropson, I.J. 1993. NMR and protein folding: equilibrium and stopped-flow studies. *Protein Sci*, 2(12), 2007-2014.
- Frisch, C., Schreiber, G., Johnson, C.M., & Fersht, A.R. 1997. Thermodynamics of the interaction of barnase and barstar: changes in free energy versus changes in enthalpy on mutation. *J Mol Biol*, 267(3), 696-706.

- Fujiwara, K., Arai, M., Shimizu, A., Ikeguchi, M., Kuwajima, K., & Sugai, S. 1999. Folding-unfolding equilibrium and kinetics of equine beta-lactoglobulin: equivalence between the equilibrium molten globule state and a burst-phase folding intermediate. *Biochemistry*, 38(14), 4455-4463.
- Gast, K., Modler, A.J., Damaschun, H., Kröber, R., Lutsch, G., Zirwer, D., Golbik, R., & Damaschun, G. 2003. Effect of environmental conditions on aggregation and fibril formation of barstar. *Eur Biophys J*, 32(8), 710-723.
- Golbik, R., Fischer, G., & Fersht, A.R. 1999. Folding of barstar C40A/C82A/P27A and catalysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerization by human cytosolic cyclophilin (Cyp18). *Protein Sci*, 8(7), 1505-1514.
- Goldenberg, D.P. 2003. Computational simulation of the statistical properties of unfolded proteins. *J Mol Biol*, 326(5), 1615-1633.
- Gopich, I., & Szabo, A. 2003. Single-macromolecule fluorescence energy transfer and free-energy profiles. *J Phys Chem B*, 107, 5058-5063.
- Gopich, I., & Szabo, A. 2005. Theory of photon statistics in single-molecule Förster resonance energy transfer. *The Journal of chemical physics*, 122(1), 14707.
- Ha, B.Y., & Thirumalai, D. 1992. Conformations of a polyelectrolyte chain. *Phys Rev A*, 46(6), R3012-R3015.
- Hagen, S.J., Hofrichter, J., Szabo, A., & Eaton, W.A. 1996. Diffusion-limited contact formation in unfolded cytochrome c: estimating the maximum rate of protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(21), 11615-11617.
- Harrison, S.C., & Durbin, R. 1985. Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(12), 4028-4030.
- Hartley, R.W. 1989. Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem Sci*, 14(11), 450-454.
- Hirschfeld, T. 1976. Optical microscopic observation of single small molecules. *Appl Optics*. 2965-2966.
- Hoffmann, A., Kane, A., Nettels, D., Hertzog, D.E., Baumgärtel, P., Lengefeld, J., Reichardt, G., Horsley, D.A., Seckler, R., Bakajin, O., & Schuler, B. 2007. Mapping protein collapse with single-molecule fluorescence and kinetic synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(1), 105-110.
- Houliston, R.S., Liu, C., Singh, L.M., & Meiering, E.M. 2002. pH and urea dependence of amide hydrogen-deuterium exchange rates in the beta-trefoil protein hisactophilin. *Biochemistry*, 41(4), 1182-1194.
- Huang, G.S., & Oas, T.G. 1995. Submillisecond folding of monomeric lambda repressor. *Proc*

*Natl Acad Sci USA*, 92(15), 6878-6882.

Hvidt, A., & Nielsen, S.O. 1966. Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem*, 21, 287-386.

Ibarra-Molero, B., Loladze, V.V., Makhatadze, G.I., & Sanchez-Ruiz, J.M. 1999. Thermal versus guanidine-induced unfolding of ubiquitin. An analysis in terms of the contributions from charge-charge interactions to protein stability. *Biochemistry*, 38(25), 8138-8149.

Ikai, A., & Tanford, C. 1973. Kinetics of unfolding and refolding of proteins. I. Mathematical analysis. *J Mol Biol*, 73(2), 145-163.

Jackson, S.E. 1998. How do small single-domain proteins fold? *Folding & design*, 3(4), R81-91.

Jacob, M., Geeves, M., Holtermann, G., & Schmid, F.X. 1999. Diffusional barrier crossing in a two-state protein folding reaction. *Nat Struct Biol*, 6(10), 923-926.

Jamin, M., & Baldwin, R.L. 1996. Refolding and unfolding kinetics of the equilibrium folding intermediate of apomyoglobin. *Nat Struct Biol*, 3(7), 613-618.

Johnson, B.A. 2004. Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol Biol*, 278, 313-352.

Juneja, J., Bhavesh, N.S., Udgaonkar, J.B., & Hosur, R.V. 2002. NMR identification and characterization of the flexible regions in the 160 kDa molten globule-like aggregate of barstar at low pH. *Biochemistry*, 41(31), 9885-9899.

Kiefhaber, T. 1995. Kinetic traps in lysozyme folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(20), 9029-9033.

Killick, T.R., Freund, S.M., & Fersht, A.R. 1999. Real-time NMR studies on a transient folding intermediate of barstar. *Protein Sci*, 8(6), 1286-1291.

Kimura, T., Akiyama, S., Uzawa, T., Ishimori, K., Morishima, I., Fujisawa, T., & Takahashi, S. 2005. Specifically collapsed intermediate in the early stage of the folding of ribonuclease A. *J Mol Biol*, 350(2), 349-362.

Klein-Seetharaman, J., Oikawa, M., Grimshaw, S.B., Wirmer, J., Duchardt, E., Ueda, T., Imoto, T., Smith, L.J., Dobson, C.M., & Schwalbe, H. 2002. Long-range interactions within a nonnative protein. *Science*, 295(5560), 1719-1722.

Kohn, J.E., Millett, I.S., Jacob, J., Zagrovic, B., Dillon, T.M., Cingel, N., Dothager, R.S., Seifert, S., Thiyagarajan, P., Sosnick, T.R., Hasan, M.Z., Pande, V.S., Ruczinski, I., Doniach, S., & Plaxco, K.W. 2004. Random-coil behavior and the dimensions of chemically unfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(34), 12491-12496.

Koide, S., Jahnke, W., & Wright, P.E. 1995. Measurement of intrinsic exchange rates of amide protons in a <sup>15</sup>N-labeled peptide. *J Biomol NMR*, 6(3), 306-312.

- Kragelund, B.B., Heinemann, B., Knudsen, J., & Poulsen, F.M. 1998. Mapping the lifetimes of local opening events in a native state protein. *Protein Sci*, 7(11), 2237-2248.
- Kramers, H.A. 1940. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*, 4, 284.
- 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(1), 265-274.
- Kuwajima, K., Hiraoka, Y., Ikeguchi, M., & Sugai, S. 1985. Comparison of the transient folding intermediates in lysozyme and alpha-lactalbumin. *Biochemistry*, 24(4), 874-881.
- Kuzmenkina, E.V., Heyes, C.D., & Nienhaus, G.U. 2005. Single-molecule Forster resonance energy transfer study of protein dynamics under denaturing conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(43), 15471-15476.
- Kuzmenkina, E.V., Heyes, C.D., & Nienhaus, G.U. 2006. Single-molecule FRET study of denaturant induced unfolding of RNase H. *J Mol Biol*, 357(1), 313-324.
- Lakshmikanth, G.S., Sridevi, K., Krishnamoorthy, G., & Udgaonkar, J.B. 2001. Structure is lost incrementally during the unfolding of barstar. *Nat Struct Biol*, 8(9), 799-804.
- Lakowicz J.R., 1983 Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press New York, pp. 305-337.
- Laurence, T.A., Kong, X., Jäger, M., & Weiss, S. 2005. Probing structural heterogeneities and fluctuations of nucleic acids and denatured proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(48), 17348-17353.
- Leopold, P.E., Montal, M., & Onuchic, J.N. 1992. Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(18), 8721-8725.
- Li, H., & Frieden, C. 2007. Comparison of C40/82A and P27A C40/82A barstar mutants using 19F NMR. *Biochemistry*, 46(14), 4337-4347.
- Li, J., Shinjo, M., Matsumura, Y., Morita, M., Baker, D., Ikeguchi, M., & Kihara, H. 2007. An alpha-helical burst in the src SH3 folding pathway. *Biochemistry*, 46(17), 5072-5082.
- Linderstrøm-Lang, K. 1955. The pH-dependence of the deuterium exchange of insulin. *Biochim Biophys Acta*, 18(2), 308.
- Lubienski, M.J., Bycroft, M., Freund, S.M., & Fersht, A.R. 1994. Three-dimensional solution structure and 13C assignments of barstar using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 33(30), 8866-8877.
- Magde, D., Wong, R. & Seybold, P.G. 2002. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetime of rhodamin 6G and fluorescein in nine solvents: improved standards for quantum yields. *Photochem Photobiol* 75 (4), 327-334.

- Maity, H., Lim, W.K., Rumbley, J.N., & Englander, S.W. 2003. Protein hydrogen exchange mechanism: local fluctuations. *Protein Sci*, 12(1), 153-160.
- Makhatadze, G.I., & Privalov, P.L. 1992. Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study. *J Mol Biol*, 226(2), 491-505.
- Makhatadze, G.I. 1999. Thermodynamics of protein interactions with urea and guanidinium chloride. *J Phys Chem*, 103, 4781-4785
- Martínez, J.C., Filimonov, V.V., Mateo, P.L., Schreiber, G., & Fersht, A.R. 1995. A calorimetric study of the thermal stability of barnase and its interaction with barnase. *Biochemistry*, 34(15), 5224-5233.
- McGee, W.A., & Parkhurst, L.J. 1990. A combined nuclear magnetic resonance and absorbance stopped-flow apparatus for biochemical studies. *Anal Biochem*, 189(2), 267-273.
- Merchant, K.A., Best, R.B., Louis, J.M., Gopich, I.V., & Eaton, W.A. 2007. Characterizing the unfolded states of proteins using single-molecule FRET spectroscopy and molecular simulations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(5), 1528-1533.
- Miller, W.G., Brant, D.A., & Flory, P.J. 1967. Random coil configurations of polypeptide copolymers. *J Mol Biol*. 67.
- Milne, J.S., Xu, Y., Mayne, L.C., & Englander, S.W. 1999. Experimental study of the protein folding landscape: unfolding reactions in cytochrome c. *J Mol Biol*, 290(3), 811-822.
- Moerner, W.E., & Kador, L. 1989. Finding a single molecule in a haystack - optical-detection and spectroscopy of single absorbers in solids. *Anal Chem*. A1217-A1223.
- Moerner, W.E., & Orrit, M. 1999. Illuminating single molecules in condensed matter. *Science*, 283(5408), 1670-1676.
- Möglich, A., Joder, K., & Kiefhaber, T. 2006. End-to-end distance distributions and intrachain diffusion constants in unfolded polypeptide chains indicate intramolecular hydrogen bond formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(33), 12394-12399.
- Mok, K.H., Nagashima, T., Day, I.J., Jones, J.A., Jones, C.J., Dobson, C.M., & Hore, P.J. 2003. Rapid sample-mixing technique for transient NMR and photo-CIDNP spectroscopy: applications to real-time protein folding. *J Am Chem Soc*, 125(41), 12484-12492.
- Montelione, G.T., & Wagner, G. 1989. 2D chemical-exchange NMR-spectroscopy by proton-detected heteronuclear correlation. *J Am Chem Soc*. 3096-3098.
- Mossakowska, D.E., Nyberg, K., & Fersht, A.R. 1989. Kinetic characterization of the recombinant ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase) and investigation of key residues in catalysis by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 28(9), 3843-3850.
- Mukhopadhyay, S., Krishnan, R., Lemke, E.A., Lindquist, S., & Deniz, A.A. 2007. A natively unfolded yeast prion monomer adopts an ensemble of collapsed and rapidly fluctuating

- structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(8), 2649-2654.
- Murphy, MC, Rasnik, I., Cheng, W., Lohmann, T.M, & Ha, T. 2004. Probing single stranded-DNA conformational flexibility using fluorescence spectroscopy. *Biophys J*, 86(4), 2530-2537.
- Myers, J.K., Pace, C.N., & Scholtz, J.M. 1995. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci*, 4(10), 2138-2148.
- Nath, U., & Udgaonkar, J.B. 1997. Folding of tryptophan mutants of barstar: Evidence for an initial hydrophobic collapse on the folding pathway. *Biochemistry*. 8602-8610.
- Neri, D., Billeter, M., Wider, G., & Wüthrich, K. 1992. NMR determination of residual structure in a urea-denatured protein, the 434-repressor. *Science*, 257(5076), 1559-1563.
- Nettels, D., Gopich, I.V., Hoffmann, A., & Schuler, B. 2007. Ultrafast dynamics of protein collapse from single-molecule photon statistics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(8), 2655-2660.
- Neuweiler, H., Löllmann, M., Doose, S., & Sauer, M. 2007. Dynamics of unfolded polypeptide chains in crowded environment studied by fluorescence correlation spectroscopy. *J Mol Biol*, 365(3), 856-869.
- Nölting, B., Golbik, R., & Fersht, A.R. 1995. Submillisecond events in protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(23), 10668-10672.
- Nölting, B., Golbik, R., Neira, J.L., Soler-Gonzalez, A.S., Schreiber, G., & Fersht, A.R. 1997a. The folding pathway of a protein at high resolution from microseconds to seconds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(3), 826-830.
- Nölting, B., Golbik, R., Soler-Gonzalez, A.S., & Fersht, A.R. 1997b. Circular dichroism of denatured barstar suggests residual structure. *Biochemistry*, 36(32), 9899-9905.
- O'Brien, E.P., Dima, R.I., Brooks, B., & Thirumalai, D. 2007. Interactions between hydrophobic and ionic solutes in aqueous guanidinium chloride and urea solutions: lessons for protein denaturation mechanism. *J Am Chem Soc*, 129(23), 7346-7353.
- Onuchic, J.N., Luthey-Schulten, Z., & Wolynes, P.G. 1997. Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annual review of physical chemistry*, 48, 545-600.
- Park, S.H., O'Neil, K.T., & Roder, H. 1997. An early intermediate in the folding reaction of the B1 domain of protein G contains a native-like core. *Biochemistry*, 36(47), 14277-14283.
- Pedersen, T.G., Thomsen, N.K., Andersen, K.V., Madsen, J.C., & Poulsen, F.M. 1993. Determination of the rate constants k1 and k2 of the Linderström-Lang model for protein amide hydrogen exchange. A study of the individual amides in hen egg-white lysozyme. *J Mol Biol*, 230(2), 651-660.
- Perl, D., Jacob, M., Bánó, M., Stupák, M., Antalík, M., & Schmid, F.X. 2002. Thermodynamics of a diffusional protein folding reaction. *Biophys Chem*, 96(2-3), 173-190.

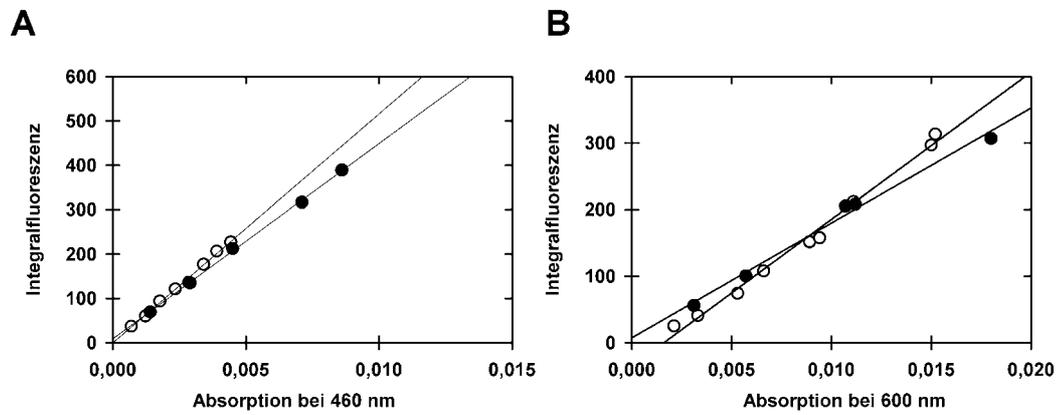
- Pradeep, L., & Udgaonkar, J.B. 2004. Effect of salt on the urea-unfolded form of barstar probed by m value measurements. *Biochemistry*, 43(36), 11393-11402.
- Pradeep, L., & Udgaonkar, J.B. 2007. Diffusional barrier in the unfolding of a small protein. *J Mol Biol*, 366(3), 1016-1028.
- Prummer, M. 2002. Multi-parameter Fluorescence Spectroscopy: Illuminating Single Proteins. Dissertation, Zürich.
- Radford, S.E., Dobson, C.M., & Evans, P.A. 1992. The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways. *Nature*, 358(6384), 302-307.
- Rami, B.R., & Udgaonkar, J.B. 2001. pH-jump-induced folding and unfolding studies of barstar: evidence for multiple folding and unfolding pathways. *Biochemistry*, 40(50), 15267-15279.
- Ratnaparkhi, G.S., Ramachandran, S., Udgaonkar, J.B., & Varadarajan, R. 1998. Discrepancies between the NMR and X-ray structures of uncomplexed barstar: analysis suggests that packing densities of protein structures determined by NMR are unreliable. *Biochemistry*, 37(19), 6958-6966.
- Roder, H., Elöve, G.A., & Englander, S.W. 1988. Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by H-exchange labelling and proton NMR. *Nature*, 335(6192), 700-704.
- Rodriguez, H.M., Robertson, A.D., & Gregoret, L.M. 2002. Native state EX2 and EX1 hydrogen exchange of Escherichia coli CspA, a small beta-sheet protein. *Biochemistry*, 41(7), 2140-2148.
- Sahu, S.C., Bhuyan, A.K., Majumdar, A., & Udgaonkar, J.B. 2000a. Backbone dynamics of barstar: a (15)N NMR relaxation study. *Proteins*, 41(4), 460-474.
- Sahu, S.C., Bhuyan, A.K., Udgaonkar, J.B., & Hosur, R.V. 2000b. Backbone dynamics of free barnase and its complex with barstar determined by 15N NMR relaxation study. *J Biomol NMR*, 18(2), 107-118.
- Saxena, A.M., Udgaonkar, J.B., & Krishnamoorthy, G. 2006. Characterization of intramolecular distances and site-specific dynamics in chemically unfolded barstar: evidence for denaturant-dependent non-random structure. *J Mol Biol*, 359(1), 174-189.
- Schanda, P., Forge, V., & Brutscher, B. 2007. Protein folding and unfolding studied at atomic resolution by fast two-dimensional NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(27), 11257-11262.
- Schellman, J.A. 1987. Selective binding and solvent denaturation. *Biopolymers*, 26(4), 549-559.
- Schellman, J.A. 2002. Fifty years of solvent denaturation. *Biophys Chem*, 96(2-3), 91-101.
- Schimmel, P.R., & Flory, P.J. 1967. Conformational energy and configurational statistics of

- poly-L-proline. *Proc Natl Acad Sci USA*, 58(1), 52-59.
- Schmid, F.X. 1983. Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates. *Biochemistry*, 22(20), 4690-4696.
- Schöppe, A., Hinz, H.J., Agashe, V.R., Ramachandran, S., & Udgaonkar, J.B. 1997. DSC studies of the conformational stability of barstar wild-type. *Protein Sci*, 6(10), 2196-2202.
- Schreiber, G., & Fersht, A.R. 1993a. Interaction of barnase with its polypeptide inhibitor barstar studied by protein engineering. *Biochemistry*, 32(19), 5145-5150.
- Schreiber, G., & Fersht, A.R. 1993b. The refolding of cis- and trans-peptidylprolyl isomers of barstar. *Biochemistry*, 32(41), 11195-11203.
- Schreiber, G., & Fersht, A.R. 1995. Energetics of protein-protein interactions: analysis of the barnase-barstar interface by single mutations and double mutant cycles. *J Mol Biol*, 248(2), 478-486.
- Schreiber, G., Frisch, C., & Fersht, A.R. 1997. The role of Glu73 of barnase in catalysis and the binding of barstar. *J Mol Biol*, 270(1), 111-122.
- Schuler, B., Lipman, E.A., & Eaton, W.A. 2002. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature*, 419(6908), 743-747.
- Shastry, M.C., Agashe, V.R., & Udgaonkar, J.B. 1994. Quantitative analysis of the kinetics of denaturation and renaturation of barstar in the folding transition zone. *Protein Sci*, 3(9), 1409-1417.
- Shastry, M.C., & Udgaonkar, J.B. 1995. The folding mechanism of barstar: evidence for multiple pathways and multiple intermediates. *J Mol Biol*, 247(5), 1013-1027.
- Shera, E.B., Seitzinger, N.K., Davis, L.M., Keller, R.A., & Soper, S.A. 1990. Detection of single fluorescent molecules. *Chem Phys Lett*. 553-557.
- Sherman, E., & Haran, G. 2006. Coil-globule transition in the denatured state of a small protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(31), 11539-11543.
- Shortle, D., & Ackerman, M.S. 2001. Persistence of native-like topology in a denatured protein in 8 M urea. *Science*, 293(5529), 487-489.
- Sinha, K.K., & Udgaonkar, J.B. 2005. Dependence of the size of the initially collapsed form during the refolding of barstar on denaturant concentration: evidence for a continuous transition. *J Mol Biol*, 353(3), 704-718.
- Sinha, K.K., & Udgaonkar, J.B. 2007. Dissecting the non-specific and specific components of the initial folding reaction of barstar by multi-site FRET measurements. *J Mol Biol*, 370(2), 385-405.
- Sivaraman, T., Arrington, C.B., & Robertson, A.D. 2001. Kinetics of unfolding and folding from amide hydrogen exchange in native ubiquitin. *Nat Struct Biol*, 8(4), 331-333.

- Sridevi, K., & Udgaonkar, J.B. 2002. Unfolding rates of barstar determined in native and low denaturant conditions indicate the presence of intermediates. *Biochemistry*, 41(5), 1568-1578.
- Sridevi, K., & Udgaonkar, J.B. 2003. Surface expansion is independent of and occurs faster than core solvation during the unfolding of barstar. *Biochemistry*, 42(6), 1551-1563.
- Stigter, D., Alonso, D.O., & Dill, K.A. 1991. Protein stability: electrostatics and compact denatured states. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(10), 4176-4180.
- Stigter, D., & Dill, K.A. 1990. Charge effects on folded and unfolded proteins. *Biochemistry*, 29(5), 1262-1271.
- Swaminathan, R., Nath, U., Udgaonkar, J.B., Periasamy, N., & Krishnamoorthy, G. 1996. Motional dynamics of a buried tryptophan reveals the presence of partially structured forms during denaturation of barstar. *Biochemistry*, 35(28), 9150-9157.
- Tanford, C. 1968. Protein denaturation. *Adv Prot Chem*, 23, 121-282.
- Tanford, C. 1961. Physical chemistry of macromolecules. John Wiley & Sons, London.
- Teilum, K., Poulsen, F.M., & Akke, M. 2006. The inverted chevron plot measured by NMR relaxation reveals a native-like unfolding intermediate in acyl-CoA binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(18), 6877-6882.
- Tezuka-Kawakami, T., Gell, C., Brockwell, D.J., Radford, S.E., & Smith, D.A. 2006. Urea-induced unfolding of the immunity protein Im9 monitored by spFRET. *Biophys J*, 91(5), L42-44.
- Tollinger, M., Skrynnikov, N.R., Mulder, F.A., Forman-Kay, J.D., & Kay, L.E. 2001. Slow dynamics in folded and unfolded states of an SH3 domain. *J Am Chem Soc*, 123(46), 11341-11352.
- Uversky, V.N., Gillespie, J.R., & Fink, A.L. 2000. Why are „natively proteins“ unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, 41, 415-427.
- Wagner, C., & Kiefhaber, T. 1999. Intermediates can accelerate protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(12), 6716-6721.
- Wagner, G., & Wüthrich, K. 1982. Amide proton exchange and surface conformation of the basic pancreatic trypsin inhibitor in solution. Studies with two-dimensional nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol*, 160(2), 343-361.
- Wand, A.J., Roder, H., & Englander, S.W. 1986. Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR studies of cytochrome c: hydrogen exchange in the N-terminal helix. *Biochemistry*, 25(5), 1107-1114.
- Wang, M., Tang, Y., Sato, S., Vugmeyster, L., McKnight, C.J., & Raleigh, D.P. 2003. Dynamic NMR line-shape analysis demonstrates that the villin headpiece subdomain folds on the microsecond time scale. *J Am Chem Soc*, 125(20), 6032-6033.
- Wang, Z., Plaxco, K.W., & Makarov, D.E. 2007. Influence of local and residual structures on the

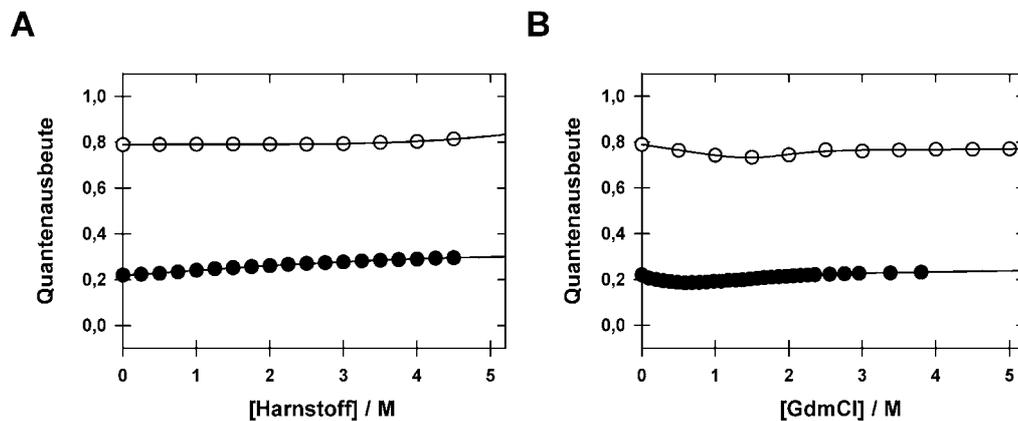
- scaling behavior and dimensions of unfolded proteins. *Biopolymers*, 86(4), 321-328.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E., & Scheraga, H.A. 2002. Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry*, 41(50), 14637-14644.
- Weiss, S. 1999. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*, 283(5408), 1676-1683.
- Wilkins, D.K., Grimshaw, S.B., Receveur, V., Dobson, C.M., Jones, J.A., & Smith, L.J. 1999. Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry*, 38(50), 16424-16431.
- Wong, K.B., & Daggett, V. 1998. Barstar has a highly dynamic hydrophobic core: evidence from molecular dynamics simulations and nuclear magnetic resonance relaxation data. *Biochemistry*, 37(32), 11182-11192.
- Wong, K.B., Fersht, A.R., & Freund, S.M. 1997. NMR <sup>15</sup>N relaxation and structural studies reveal slow conformational exchange in barstar C40/82A. *J Mol Biol*, 268(2), 494-511.
- Wong, K.B., Freund, S.M., & Fersht, A.R. 1996. Cold denaturation of barstar: <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C NMR assignment and characterisation of residual structure. *J Mol Biol*, 259(4), 805-818.
- Zaidi, F.N., Nath, U., & Udgaonkar, J.B. 1997. Multiple intermediates and transition states during protein unfolding. *Nat Struct Biol*, 4(12), 1016-1024.
- Zeeb, M.W. 2004. Strukturbiologische Untersuchungen und Faltungsstudien von Modellproteinen mittels NMR-Spektroskopie. Dissertation, Bayreuth.
- Zhou, H.X. 2002a. A Gaussian-chain model for treating residual charge-charge interactions in the unfolded state of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(6), 3569-3574.
- Zhou, H.X. 2002b. Dimensions of denatured protein chains from hydrodynamic data. *J Phys Chem B*. 5769-5775.
- Zhou, H.X. 2003. Direct test of the Gaussian-chain model for treating residual charge-charge interactions in the unfolded state of proteins. *J Am Chem Soc*, 125(8), 2060-2061.
- Zwanzig, R., Szabo, A., & Bagchi, B. 1992. Levinthal's paradox. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(1), 20-22.

## Anhang I



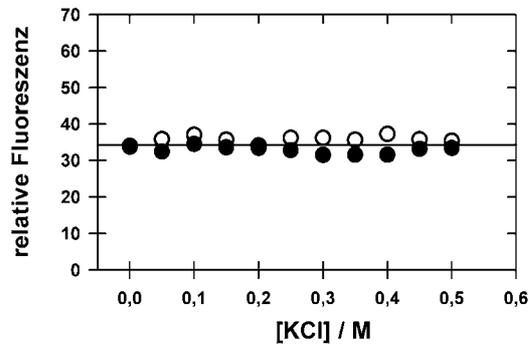
**Abbildung I. Bestimmung der Quantenausbeute.** (A) Integralfluoreszenz von Fluoreszein (○) und pWT<sub>ss</sub><sup>D</sup> (●) als Funktion der Absorption bei der Anregungswellenlänge 460 nm. (B) Integralfluoreszenz von Atto 700 (○) und pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> (●) als Funktion der Absorption bei der Anregungswellenlänge 600 nm.

## Anhang II



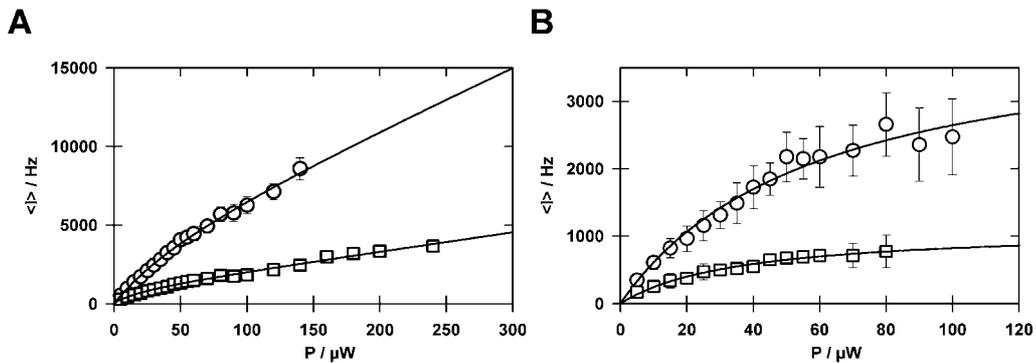
**Abbildung II. Quantenausbeuten der an das Protein gekoppelten Farbstoffe Alexa Fluor 488 (weiß) und Alexa Fluor 594 (schwarz) als Funktion der Harnstoffkonzentration (A) und als Funktion der GdmCl-Konzentration (B).** Die Fluoreszenz von Alexa Fluor 488 wurde an pWT<sub>ss</sub><sup>D</sup> bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm bestimmt. Die Alexa Fluor 594-Fluoreszenz wurde an pWT<sub>ss</sub><sup>DA</sup> durch Anregung bei 594 nm und einer Emissionswellenlänge von 610 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug 0,5  $\mu$ M in Standardpuffer.

## Anhang III



**Abbildung III. Fluoreszenz der freien Farbstoffe Alexa Fluor 488 (weiß) und Alexa Fluor 594 (schwarz) als Funktion der KCl-Konzentration.** Alexa Fluor 488 wurde bei 470 nm angeregt und die Emissionswellenlänge betrug 530 nm. Die Anregungswellenlänge im Falle von Alexa Fluor 594 war 594 nm und die Emissionswellenlänge war 610 nm. Die Farbstoffkonzentration betrug  $0,5 \mu\text{M}$  in Standardpuffer.

## Anhang IV



**Abbildung IV. Photonenzählraten als Funktion der Laserleistung für  $p\text{WT}_{\text{ss}}^{\text{DA}}$ .** (A) Photonenzählraten im Donor- (○) und Akzeptorkanal (□) bei Anregung bei 488 nm. Durchgezogene Linien sind Anpassungen nach dem 3-Zustandsmodell [2.32]. (B) Um Streulicht und Detektorrauschen bereinigte Photonenzählraten. Symbole wie in A. Die Messungen wurden bei einer Proteinkonzentration von  $130 \text{ pM}$  in Standardpuffer in Gegenwart von  $0,01 \%$  (w/v) Tween 20 durchgeführt.

## Anhang V

Tabelle V. Geschwindigkeitskonstanten des Amidprotonen-Austausches, der Öffnungs- und Schließreaktion sowie  $\Delta G_{HX}$ -Werte für alle detektierten Amidprotonen.

Aminosäure	$k_{HX} / s^{-1}$					Mechanismus	$k_{op} / s^{-1}$	$k_{cl} / s^{-1}$	$\Delta G_{HX} / kJ \cdot mol^{-1}$
	pH 6.5	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10				
K2	1,11 ± 0,02	2,07 ± 0,04	7,75 ± 0,40	40,0 ± 1,6	26,6 ± 0,3	EX2 & EX1	29,9 ± 10,0	413 ± 227	6,5 ± 3,0
V4	0,44 ± 0,06	-	-	0,77 ± 0,07	0,66 ± 0,05	EX1	0,62 ± 0,03	-	-
I5	0,73 ± 0,05	0,72 ± 0,10	-	1,03 ± 0,05	1,39 ± 0,04	EX1	1,12 ± 0,19	-	-
N6	0,93 ± 0,03	1,84 ± 0,04	9,70 ± 0,66	35,90 ± 2,40	37,60 ± 0,60	EX2 & EX1	37,24 ± 7,72	910 ± 304	7,9 ± 2,7
G7	0,40 ± 0,03	0,49 ± 0,05	0,52 ± 0,07	1,17 ± 0,03	1,20 ± 0,04	EX1	0,90 ± 0,20	-	-
E8	-	-	0,78 ± 0,08	2,75 ± 0,09	2,25 ± 0,03	EX2 & EX1	2,72 ± 0,64	318 ± 181	11,8 ± 2,9
Q9	0,31 ± 0,02	0,36 ± 0,04	0,68 ± 0,06	1,93 ± 0,04	1,47 ± 0,03	EX2 & EX1	1,30 ± 0,38	37 ± 24	8,3 ± 3
I10	0,31 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,32 ± 0,06	0,59 ± 0,04	0,51 ± 0,04	EX1	0,46 ± 0,07	-	-
R11	0,51 ± 0,03	0,83 ± 0,05	2,54 ± 0,18	15,00 ± 0,37	11,50 ± 0,10	EX2 & EX1	11,48 ± 4,68	230 ± 152	7,4 ± 3,1
S12	0,49 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,54 ± 0,03	1,67 ± 0,06	1,55 ± 0,04	EX1	1,12 ± 0,34	-	-
D15	1,18 ± 0,02	1,22 ± 0,01	1,44 ± 0,63	2,65 ± 0,06	3,31 ± 0,02	EX1	2,28 ± 0,51	-	-
L16	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,49 ± 0,04	0,46 ± 0,02	EX1	0,42 ± 0,04	-	-
Q18	3,13 ± 0,73	2,85 ± 0,04	-	-	-	EX1	2,99 ± 0,37	-	-
T19	1,40 ± 0,02	1,37 ± 0,03	1,03 ± 0,05	1,20 ± 0,03	1,78 ± 0,03	EX1	1,33 ± 0,17	-	-
K21	0,58 ± 0,02	0,80 ± 0,03	4,29 ± 0,33	-	-	EX1	1,34 ± 1,10	-	-
K22	0,35 ± 0,03	0,43 ± 0,04	-	0,64 ± 0,03	0,36 ± 0,02	EX1	0,48 ± 0,09	-	-
E23	0,30 ± 0,03	0,42 ± 0,03	-	0,59 ± 0,05	0,40 ± 0,04	EX1	0,49 ± 0,06	-	-
L24	-	-	-	0,33 ± 0,04	0,28 ± 0,03	EX1	0,30 ± 0,03	-	-
A25	-	-	-	1,66 ± 0,05	1,53 ± 0,02	EX1	1,60 ± 0,03	-	-
L26	0,23 ± 0,02	0,31 ± 0,05	-	0,73 ± 0,05	0,47 ± 0,03	EX1	0,43 ± 0,11	-	-
E28	1,23 ± 0,03	6,77 ± 0,14	16 ± 1	-	-	EX2/EX1	25 ± 19	-	-
Y29	1,81 ± 0,17	4,06 ± 0,45	3,03 ± 0,44	-	9,53 ± 0,38	EX2/EX1	5,9 ± 2,4	-	-
Y30	0,90 ± 0,07	1,58 ± 0,09	6,56 ± 0,36	-	-	EX2 & EX1	8,2 ± 3,4	49 ± 34	4,4 ± 3,4
D35	0,33 ± 0,01	0,55 ± 0,02	1,47 ± 0,87	5,58 ± 0,09	-	EX2 & EX1	3,8 ± 1,9	43 ± 36	6,1 ± 3,4
A36	-	0,28 ± 0,04	0,40 ± 0,06	0,91 ± 0,06	-	EX1	0,68 ± 0,27	-	-
W38	0,29 ± 0,02	0,33 ± 0,04	-	0,58 ± 0,03	0,38 ± 0,01	EX1	0,45 ± 0,07	-	-
D39	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,41 ± 0,03	0,38 ± 0,03	EX1	0,33 ± 0,05	-	-
A40	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,03	-	0,21 ± 0,02	0,87 ± 0,04	EX1	0,41 ± 0,20	-	-
L41	0,32 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,30 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,31 ± 0,03	EX1	0,33 ± 0,02	-	-
T42	1,67 ± 0,06	1,64 ± 0,06	1,15 ± 0,09	0,88 ± 0,07	1,21 ± 0,06	EX1	1,27 ± 0,21	-	-
G43	0,43 ± 0,02	0,59 ± 0,03	1,37 ± 0,09	4,77 ± 0,10	4,65 ± 0,05	EX2 & EX1	3,70 ± 1,27	336 ± 209	11,2 ± 2,9
Y47	-	-	-	1,33 ± 0,07	0,85 ± 0,04	EX1	1,09 ± 0,09	-	-
L49	0,40 ± 0,03	0,53 ± 0,07	-	0,64 ± 0,04	0,29 ± 0,02	EX1	0,46 ± 0,13	-	-
R54	-	-	-	0,74 ± 0,07	1,34 ± 0,10	EX1	1,04 ± 0,06	-	-
E57	0,96 ± 0,06	1,99 ± 0,06	10,35 ± 0,70	-	51,8 ± 1,3	EX2 & EX1	46,6 ± 16	181 ± 108	3,4 ± 3,3
Q58	0,33 ± 0,02	0,50 ± 0,02	1,86 ± 0,09	7,55 ± 0,11	6,00 ± 0,04	EX2 & EX1	6,0 ± 2,0	209 ± 110	8,8 ± 2,9
S59	1,11 ± 0,08	1,19 ± 0,11	1,49 ± 0,13	5,85 ± 0,20	5,50 ± 0,07	EX1	3,78 ± 1,49	-	-
K60	0,87 ± 0,03	1,14 ± 0,05	3,29 ± 0,15	20,54 ± 0,52	15,00 ± 0,16	EX2 & EX1	14,5 ± 6,7	494 ± 373	8,7 ± 3,2
Q61	0,65 ± 0,03	0,96 ± 0,05	3,9 ± 0,2	31 ± 1	20,5 ± 0,2	EX2 & EX1	24 ± 11	906 ± 622	9 ± 3
L62	0,44 ± 0,02	0,54 ± 0,04	1,56 ± 0,08	7,7 ± 0,2	6,00 ± 0,05	EX2 & EX1	5,5 ± 2,3	80 ± 60	6,6 ± 3,2
T63	2,33 ± 0,05	3,08 ± 0,09	11,17 ± 0,94	-	45,0 ± 2,8	EX2 & EX1	32 ± 17	-	-
N65	1,34 ± 0,06	2,64 ± 0,07	14,2 ± 1,2	-	-	EX2 & EX1	21 ± 9	357 ± 222	7 ± 3
G66	0,85 ± 0,03	1,66 ± 0,05	8,09 ± 0,52	47,6 ± 2,5	39,0 ± 0,5	EX2 & EX1	44 ± 13	2714 ± 1233	10,2 ± 2,8

Amino- säure	$k_{HX} / s^{-1}$					Mechanismus	$k_{ap} / s^{-1}$	$k_{cl} / s^{-1}$	$\Delta G_{HX} / kJ \cdot mol^{-1}$
	pH 6,5	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10				
A67	1,12 ± 0,02	1,14 ± 0,02	1,56 ± 0,07	4,46 ± 0,1	4,94 ± 0,04	EX1	3,3 ± 1,1	-	-
E68	0,48 ± 0,05	0,64 ± 0,08	1,29 ± 0,08	3,54 ± 0,13	3,92 ± 0,07	EX2&EX1	2,9 ± 0,9	20 ± 14	4,8 ± 3,3
S69	2,34 ± 0,05	4,83 ± 0,07	33,8 ± 2,2	-	-	EX2&EX1	68 ± 41	468 ± 394	4,8 ± 3,5
V70	-	-	-	1,81 ± 0,04	1,62 ± 0,03	EX1	1,72 ± 0,03	-	-
L71	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,04	0,37 ± 0,05	1,2 ± 0,05	1,09 ± 0,03	EX1	0,77 ± 0,25	-	-
Q72	0,29 ± 0,02	0,30 ± 0,03	-	0,53 ± 0,05	0,78 ± 0,05	EX1	0,60 ± 0,13	-	-
V73	0,25 ± 0,03	0,33 ± 0,05	-	0,27 ± 0,03	-	EX1	0,30 ± 0,04	-	-
F74	0,37 ± 0,04	-	-	0,42 ± 0,04	-	EX1	0,39 ± 0,03	-	-
R75	0,25 ± 0,02	0,62 ± 0,04	3,15 ± 0,21	-	-	EX2 & EX1	5,2 ± 1,0	278 ± 73	9,6 ± 2,6
E76	-	-	-	0,32 ± 0,04	0,24 ± 0,02	EX1	0,28 ± 0,02	-	-
A77	0,31 ± 0,02	0,41 ± 0,05	-	0,39 ± 0,05	0,77 ± 0,04	EX1	0,54 ± 0,12	-	-
K78	0,35 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,36 ± 0,04	0,70 ± 0,02	0,46 ± 0,01	EX1	0,49 ± 0,07	-	-
E80	0,32 ± 0,03	0,40 ± 0,04	-	1,04 ± 0,04	0,85 ± 0,04	EX1	0,90 ± 0,15	-	-
G81	0,30 ± 0,04	0,43 ± 0,08	-	1,80 ± 0,08	1,57 ± 0,04	EX2 & EX1	1,64 ± 0,32	72 ± 27	9,4 ± 2,7
A82	0,36 ± 0,03	0,43 ± 0,06	-	0,56 ± 0,03	0,49 ± 0,02	EX1	0,52 ± 0,03	-	-
D83	0,36 ± 0,04	0,59 ± 0,06	1,01 ± 0,09	4,43 ± 0,09	3,31 ± 0,05	EX2 & EX1	2,88 ± 1,04	46 ± 33	6,9 ± 3,2
I84	0,58 ± 0,05	0,71 ± 0,08	-	1,21 ± 0,06	0,81 ± 0,04	EX1	0,96 ± 0,14	-	-
T85	1,11 ± 0,05	1,29 ± 0,12	1,14 ± 0,11	1,75 ± 0,07	1,91 ± 0,05	EX1	1,56 ± 0,19	-	-
I86	-	-	3,77 ± 0,50	11,85 ± 0,50	11,4 ± 0,2	EX2/EX1	11,6 ± 0,3	-	-
I87	-	-	-	0,62 ± 0,08	0,19 ± 0,02	EX1	0,40 ± 0,05	-	-
L88	-	-	-	6,64 ± 0,17	4,84 ± 0,13	EX1	5,74 ± 0,11	-	-

## Anhang VI

Tabelle AVI. Stabilitätsparameter der mittels 2D-HSQC-TROSY-NMR detektierten Harnstoff-induzierten Übergangskurven.

Amino- säure	$m_{eq}$	/	$\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$	$[D]_{1/2}$	/	M	$\Delta G^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$	/	$\text{kJ mol}^{-1}$
K2	4,63	±	0,80	2,70	±	0,11	12,49	±	2,23
A3	3,89	±	1,02	2,61	±	0,24	10,15	±	2,81
V4	4,67	±	0,45	2,65	±	0,10	12,38	±	1,29
I5	4,37	±	0,50	2,64	±	0,10	11,53	±	1,38
N6	4,40	±	0,45	2,53	±	0,10	11,12	±	1,22
G7	4,44	±	0,46	2,60	±	0,10	11,54	±	1,27
E8	5,24	±	0,56	2,91	±	0,10	15,26	±	1,70
Q9	4,34	±	0,33	2,61	±	0,10	11,32	±	0,97
I10	4,40	±	0,34	2,60	±	0,10	11,43	±	1,00
R11	4,70	±	0,44	2,68	±	0,10	12,56	±	1,26
I13	4,27	±	0,40	2,42	±	0,10	10,34	±	1,05
L16	4,38	±	0,53	2,58	±	0,10	11,28	±	1,43
K22	4,67	±	0,44	2,63	±	0,10	12,28	±	1,25
E23	4,61	±	0,29	2,59	±	0,10	11,94	±	0,88
L24	4,51	±	0,54	2,71	±	0,10	12,22	±	1,54
A25	5,88	±	1,98	2,67	±	0,18	15,71	±	5,40
L26	4,43	±	0,39	2,58	±	0,10	11,45	±	1,09
E28	3,76	±	1,12	2,44	±	0,21	9,18	±	2,84
Y30	4,72	±	1,00	2,46	±	0,13	11,60	±	2,54
L41	4,92	±	0,57	2,65	±	0,10	13,01	±	1,60
T42	4,79	±	0,45	2,64	±	0,10	12,64	±	1,28
G43	5,21	±	0,53	2,76	±	0,10	14,40	±	1,55
L49	4,38	±	0,43	2,60	±	0,10	11,39	±	1,20
R54	4,28	±	0,51	2,59	±	0,10	11,10	±	1,38
E57	4,45	±	0,44	2,64	±	0,10	11,75	±	1,25
Q58	3,96	±	0,62	2,40	±	0,10	9,50	±	1,54
S59	4,89	±	0,37	2,82	±	0,10	13,79	±	1,16
Q61	4,10	±	0,53	2,54	±	0,10	10,42	±	1,40
L62	4,53	±	1,39	2,66	±	0,10	12,04	±	3,72
T63	4,49	±	0,55	2,55	±	0,10	11,46	±	1,46
N65	4,68	±	0,25	2,63	±	0,10	12,34	±	0,80
G66	4,74	±	0,39	2,66	±	0,10	12,60	±	1,13
E68	4,54	±	0,53	2,60	±	0,10	11,81	±	1,44
S69	4,35	±	0,52	2,43	±	0,10	10,57	±	1,34
V70	4,42	±	1,60	2,50	±	0,10	11,06	±	4,01
V73	4,52	±	0,39	2,62	±	0,10	11,85	±	1,13
F74	4,19	±	0,34	2,45	±	0,10	10,28	±	0,93
E76	4,98	±	0,72	2,80	±	0,10	13,95	±	2,07
E80	4,70	±	0,32	2,62	±	0,10	12,31	±	0,96
G81	4,75	±	0,46	2,75	±	0,10	13,06	±	1,34
A82	4,79	±	0,53	2,64	±	0,10	12,65	±	1,49
D83	4,49	±	0,54	2,58	±	0,10	11,60	±	1,45
I84	4,75	±	0,38	2,68	±	0,10	12,73	±	1,12
T85	4,67	±	0,44	2,67	±	0,10	12,48	±	1,26
I86	5,29	±	0,50	2,97	±	0,10	15,72	±	1,56
I87	4,53	±	0,60	2,75	±	0,10	12,47	±	1,70
L88	4,89	±	0,28	2,93	±	0,10	14,32	±	0,96
S89	5,60	±	0,43	3,00	±	0,10	16,79	±	1,42

## Anhang VII. Pulssequenz des 2D-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrums sowie New-MEXICO-Pulssequenz.

### 1. 2D-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum

```

;fhsqcN15.ks
;avance-version
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using States-TPPI method

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

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=90u"
"d26=2.5m"

"d0=(in0-(p21*1.273+6u+4*p3))*0.5"

"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"

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
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 0 2 2 2 2
ph6=0 0 2 2
ph31=0 2 0 2 0 2 0

;p11 : f1 channel - 1H PL for p1 (high pow)
;p118: f1 channel - 1H PL for p28 (3-9-19)
;p12 : f2 channel - 13C PL for p3 (high pow)
;p13 : f3 channel - 15N PL for p21 (high pow)
;p116: 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*I(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
;ND0 = 2
;NS = N*2
;DS >= 8
;phc0(F1) = 90 deg, phc1(F1) = -180 deg
;gradient ration : 50 : 80 : 30
;use sine.100

```

### 2. New-MEXICO Pulssequenz

```

;MEXICO-FHSQC
;avance-version
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using States-TPPI method

```

```

;SOWNER=nmrsu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d4=5.5m"
"d5=55m"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=90u"
"d26=2.5m"

"d0=(in0-(p21*1.273+p2))*0.5"

"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=5.5m-4u-p16-d16"
"DELTA4=5.4m-p16-d16"

"p19=d8-1.200m" ;; d8 = mixing time

"TAU=d26-p16-4u"

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

1 ze
d11 pl16:f3
2 d1 do:f3
3m
3 d11
4 d12 pl1:f1
50u UNBLKGRAD
(p1 ph0)
d4 pl3:f3
(p21 ph0):f3
d5
p16:gp1
d16
(p1 ph1)
4u
p16:gp2
d16
DELTA3
(CEN_HN1 p2 ph2) (p21 ph5):f3
DELTA4
p16:gp2
d16
(p1 ph7) (p21 ph6):f3
4u
p16:gp3
d16
p19:gp4
d16
(p1 ph0)
4u
p16:gp5
TAU
(CEN_HN2 p2 ph0) (p22 ph0):f3
4u
p16:gp5
TAU

(p1 ph2)
4u
p16:gp6
d16
(p21 ph3):f3
d0
(p2 ph0)
d0
(p21 ph0):f3
4u
p16:gp6
d16
(p1 ph4)
DELTA1
p16:gp7
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph8
d19*2
p28*0.692 ph8
d19*2
p28*1.462 ph8
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph9
d19*2
p28*0.692 ph9
d19*2
p28*0.231 ph9
4u
p16:gp7
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 pl16:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 mc #0 to 2 F1PH(ip3, id0)
exit

ph0=0
ph1=0 0 2 2
ph2=1
ph3=0 2
ph4=2 2 0 0
ph5=0 0 0 0 2 2 2 2
ph6=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph7=2
ph8=1
ph9=3
ph31=0 2

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p16: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p19 : mixing time - 1.204m
;p21: f2 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f2 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at pl18
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)

```

```

;d26 : 1/(4J(YH))
;cnst4: = J(YH)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

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

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

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

"d0=4u"
"d16=100u"
"d19=90u"
"d25=2.65m"
"d26=2.65m"
"d27=2.65m"
"TAU=d26-p16-d16-4u"
"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 p1:f1 p2:f2 p3: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 p18: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
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

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

```

## Anhang VIII. Pulssequenz des 2D-<sup>15</sup>N-HSQC-TROSY-Spektrums.

## 8. Publikationen, Poster und Tagungsbeiträge

### Publikationen

- 1.) Hofmann, H., Golbik, R.P., Ott, M., Hübner, S.G. und Ulbrich-Hofmann, R. (2008) Coulomb forces control the density of the collapsed unfolded state of Barstar. *J Mol Biol*
- 2.) Hofmann, H., Weininger, U., Löw, C., Golbik, R.P., Balbach, J. und Ulbrich-Hofmann, R. Mapping the energy landscape for protein unfolding using very-fast amide proton exchange. (In Präparation)
- 3.) Hofmann, H., Hübner, C.G. und Ulbrich-Hofmann, R. How ground-state effects affect protein stability. (In Präparation)

### Poster

- 1.) Hofmann, H., Golbik, R.P., Wunderlich, M., Hübner, C.G. und Ulbrich-Hofmann, R. (2006) Conformational Transitions in Barstar Folding – A single molecule study. Faltertage, Halle
- 2.) Hofmann, H., Golbik, R.P., Wunderlich, M., Hübner, C.G. und Ulbrich-Hofmann, R. (2007) The Coil-Globule Transition of Barstar. European Biophysics Congress, London
- 3.) Hofmann, H., Golbik, R.P., Ott, M., Hübner, C.G. und Ulbrich-Hofmann, R. (2007) Coulomb Interaction Control the Coil-Globule Transition of a Small Protein. PicoQuant Tagung, Berlin

### Tagungsbeiträge

- 1.) Conformational Dynamics – Folding and Unfolding of Barstar. (2005) Leucorea, Wittenberg – Herbsttreffen, Graduiertenkolleg 1026
- 2.) Native-State Dynamics and Unfolding of Barstar – Single Molecule and NMR Studies. (2006) Weimar – Frühjahrstreffen, Graduiertenkolleg 1026

- 3.) The Achilles Heel of Barstar – Unfolding of a protein at atomic resolution. (2006)  
Potsdam – Herbsttreffen, Graduiertenkolleg 1026
- 4.) The Coil-Globule Transition of Barstar. (2007) Oppurg – Frühjahrstreffen,  
Graduiertenkolleg 1026
- 5.) Unfolding in equilibrium – Limitations of the two-state approximation. (2007)  
Leucorea, Wittenberg – Herbsttreffen, Graduiertenkolleg 1026
- 6.) Exploring the protein energy landscape using NMR and Single-molecule spectroscopy.  
(2007) Lübeck – Gastvortrag

## 9. Lebenslauf

Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch  
Alter: 29  
Geburtsdatum: 05.10.1978 in Sangerhausen

- 1985 – 1995 Realschule Thomas Münzer in Allstedt, Abschluss: erweiterter Realschulabschluss
- 1995 – 1998 Fachgymnasium Wirtschaft in Sangerhausen, Abschluss: Abitur
- 1998 – 1999 Wehrdienst, Tätigkeit als Sanitäter im Amt für Flugsicherung der Bundeswehr, Frankfurt a. M.
- 1999 – 2004 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Thema der Diplomarbeit: “Studien zur Entfaltung der neutralen Protease aus *B. stearothermophilus* durch Fluoreszenzmarkierung cysteinhaltiger Varianten des Enzyms”
- 2004 – 2005 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Technische Enzymologie am Institut für Biochemie/Biotechnologie
- ab 2005 Beginn der Promotion an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
- Thema der Promotionsarbeit: “Initiale Schritte der Faltung und Entfaltung von Barstar aus *Bacillus amyloliquefaciens*”
- 11/2006 – 12/2006 Gastaufenthalt in der Gruppe von Prof. Gilad Haran am Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

seit 01/2008

Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Benjamin Schuler,  
Universität Zürich

Halle (Saale), den

Hagen Hofmann

## Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Ulbrich-Hofmann für die Überlassung des interessanten und spannenden Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ihr großes Interesse an der Arbeit sowie ihre aufmunternden Worte bei Problemen waren stets Motivation.

Weiterhin gilt mein Dank den beiden Kooperationspartnern Prof. Dr. Christian G. Hübner (Institut für Physik, Universität Lübeck) und Prof. Dr. Jochen Balbach (Institut für Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für ihr stetes Interesse und ihr wissenschaftliches Engagement im Verlauf der Arbeit.

Den Herren PD Dr. Ralph P. Golbik und PD Dr. Hauke Lilie möchte ich an dieser Stelle für die sicherlich Zeit-raubenden aber immer sehr produktiven Diskussionen danken. Ihre Argumente trafen stets den Schwachpunkt jeder Theorie. Herrn PD. Dr. Lilie möchte ich zusätzlich meinen Dank für die Kontrollen mittels analytischer Ultrazentrifugation aussprechen.

Dank gilt auch Prof. Dr. Gilad Haran (Weizmann Institute of Science, Israel) für den lehrreichen Gastaufenthalt in seiner Gruppe sowie für die vielen Diskussionen über entfaltete Proteine. Aus seiner Arbeitsgruppe danke ich weiterhin Yakov Kipnis für seine Hilfe bei den *steady-state*-Anisotropiemessungen.

Ein besonderer Dank richtet sich an Herrn Dipl. Biochem. Ulrich Weininger (Institut für Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), der den Großteil der NMR-Messungen durchführte und mit seinen Erfahrungen im Bereich der NMR-Spektroskopie unersetzlich war.

Ich danke auch Frau Dipl. Phys. Maria Ott (Institut für Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Hilfe bei der Analyse der Einzelmolkülexperimente. Ihre Programme ermöglichten erst eine effiziente Auswertung.

Herrn Dipl. Biochem. Christian Löw möchte für seine initiale Hilfe bei den *stopped-flow*-Experimenten sowie für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und kritischen Hinweise danken. Sie haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Frau Dipl. Biochem. Cindy Schulenburg und Frau Dipl. Biochem. Franziska Leich sei an dieser Stelle für die kreativen Spannungsmomente bei einem Kaffee sowie für ihr stets offenes Ohr bei meinen wissenschaftlichen Problemen herzlichst gedankt.

Herrn Dr. Ulrich Arnold möchte ich ebenfalls für sein offenes Ohr bei der Diskussion neuer Modelle sowie seine Diskussionsbereitschaft danken.

Ein großer Dank gilt allen Mitgliedern des GRK 1026 für die wunderbare Zeit. Die offenen und ehrlichen Diskussionen in den gemeinschaftlichen Seminaren waren eine gute Schule.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Technische Enzymologie, insbesondere Frau Marion Sonntag und Frau Christa Kuplens, möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken.

Der Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ danke ich für Messzeit an ihrem NMR-Spektrometer.

Meiner Familie, insbesondere Andrea, sowie meinen Freunden, insbesondere Robert, danke ich für ihre Unterstützung während der vergangenen Jahre.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, keine anderen Quellen und Hilfsmittel zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation verwendet und der Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Ich habe diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir an keiner anderen Einrichtung zur Bewerbung um einen Doktorgrad eingereicht. Ich selbst habe mich noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle (Saale), den

Hagen Hofmann