

Physikochemische Charakterisierung des Bindungsverhaltens des Histidin- und Prolinreichen Glykoproteins

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität
Halle Wittenberg

vorgelegt von

Frau Melanie Kampe
geb. am 03.09.1994 in Halle/Saale

1. Gutachter: Prof. Dr. Dariush Hinderberger

2. Gutachter: Prof. Dr. Maxie Roessler

Tag der Verteidigung: 21. Juni 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Symbole	VII
1. Einleitung	1
1.1. Histidin- und Prolinreiches Glykoprotein	1
1.1.1. Allgemeines	1
1.1.2. Struktur	1
1.1.3. Funktion und Ligandenbindung	5
1.1.4. Bisherige Aufreinigungen	8
1.2. Zielstellung der Arbeit	10
2. Methodische Grundlagen	12
2.1. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	12
2.1.1. Grundlagen der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	12
2.1.2. Der Spin Hamilton Operator	13
2.1.2.1. Elektron-Zeeman Wechselwirkung \hat{H}_{ez}	14
2.1.2.2. Nullfeldaufspaltung \hat{H}_{zfs}	14
2.1.2.3. Kern-Zeeman Wechselwirkung \hat{H}_{nz}	15
2.1.2.4. Hyperfeinwechselwirkung \hat{H}_{hf}	15
2.1.2.5. Kern-Quadrupol-Wechselwirkung \hat{H}_{nq}	16
2.1.2.6. Elektron-Elektron-Wechselwirkung \hat{H}_{ee}	16
2.1.3. Nitroxide als EPR-aktive Spezies	17
2.1.4. Kupfer als EPR-aktive Spezies	21
2.1.5. Continuous-Wave EPR-Spektrometer	23
2.1.6. Puls-EPR-Spektroskopie	24
2.1.6.1. Elektronenspin-echo-detektierte Spektren (ESE)	25
2.1.6.2. Elektronenspin-echo-Enveloppen-Modulationsspektren (ESEEM)	26
2.2. Dynamische Lichtstreuung	28
2.3. UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie	30
3. Auswertung und Diskussion	33
3.1. Aufreinigung und allgemeine Charakterisierung des HPRGs	33

Inhaltsverzeichnis

3.1.1.	Affinitätschromatographie.....	33
3.1.2.	Kationenaustauschchromatographie.....	35
3.1.3.	Reinheit des isolierten Proteins	38
3.1.4.	Quantifizierung der Aufreinigung	39
3.1.5.	Radikalisches HPRG	41
3.2.	Antioxidatives Verhalten des HPRGs	48
3.2.1.	Vergleich des HPRGs mit TEMPO	49
3.2.2.	Vergleich des reduzierten HPRGs mit reduziertem TEMPO	54
3.2.3.	Vergleich des HPRGs mit TEMPO unter Bestrahlung.....	57
3.2.4.	Zusammenfassung	59
3.3.	EPR-spektroskopische Untersuchung der Ligandenbindung	62
3.3.1.	Ligand: Doxylstearinsäure als Fettsäureanaloga	62
3.3.1.1.	5-Doxylstearinsäure	62
3.3.1.2.	16-Doxylstearinsäure	65
3.3.2.	Ligand: TOAC als Aminosäureanaloga.....	67
3.3.3.	Ligand: CAT-1 als positiv geladener Ligand.....	68
3.3.4.	Ligand: Fremys Salz als negativ geladener Ligand	70
3.3.5.	Labeln von HPRG mittels MTSSL	72
3.3.6.	Zusammenfassung	76
3.4.	pH-abhängiges Lösungsverhalten des HPRGs.....	78
3.4.1.	Elektrophoretisches Verhalten	78
3.4.2.	Messung des radikalischen HPRGs.....	80
3.4.3.	Fluoreszenzspektroskopie.....	81
3.4.4.	Dynamische Lichtstreuung.....	82
3.4.5.	Zusammenfassung	85
3.5.	EPR-spektroskopische Untersuchung der Kupferbindung.....	86
3.5.1.	pH-abhängige Bindung verschiedener Protein:Kupfer-Verhältnisse.....	86
3.5.1.1.	HPRG : Kupfer-Verhältnis 1:2.....	86
3.5.1.2.	HPRG : Kupfer-Verhältnis 1:4.....	88
3.5.1.3.	HPRG : Kupfer-Verhältnis 1:7.....	91
3.5.1.4.	HPRG : Kupfer-Verhältnis 1:10.....	93

3.5.1.5.	Zusammenfassung der pH-Abhängigkeit von HPRG	95
3.5.2.	pH-abhängige Bindung der Peptide bei einem Peptid:Kupfer-Verhältnis 1:1 ...	98
3.5.2.1.	pH-Abhängigkeit bei der PRR1	98
3.5.2.2.	pH-Abhängigkeit bei der PRR2	102
3.5.2.3.	pH-Abhängigkeit bei der HRR.....	107
3.5.2.4.	Zusammenfassung der pH-Abhängigkeit von den Peptiden des HPRGs ..	111
3.5.3.	Metallionenbindungskapazität bei physiologischen Bedingungen.....	113
3.5.3.1.	Metallionenbindungskapazität von HPRG	114
3.5.3.2.	Metallionenbindungskapazität von Peptiden des HPRGs.....	117
3.5.3.3.	Zusammenfassung der Metallionenbindungskapazität.....	123
4.	Zusammenfassung und Ausblick	124
5.	Material und Methoden	128
5.1.	Materialien	128
5.1.1.	Chemikalien	128
5.1.1.1.	Aufreinigung und Probenpräparation.....	128
5.1.1.2.	SDS-PAGE	129
5.1.1.3.	EPR-Sonden	129
5.1.2.	Standard- Puffer	130
5.1.3.	Geräte-Übersicht	130
5.2.	Methoden der Proteinaufreinigung.....	131
5.2.1.	Affinitätschromatographie	131
5.2.2.	Kationenaustauscher	132
5.2.3.	Dialyse / Entsalzung.....	134
5.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	135
5.4.	Proteinquantifizierung.....	137
5.5.	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	142
5.5.1.	CW-X-Band-EPR Spektroskopie	142
5.5.2.	Puls-X-Band-EPR Spektroskopie	143
5.5.2.1.	ESE-Spektroskopie.....	144
5.5.2.2.	3-Puls-ESEEM-Spektroskopie	144

5.5.3.	Simulation der Nitroxid-EPR-Spektren.....	144
5.6.	Probenpräparation für EPR-Spektroskopie	147
5.6.1.	Antioxidatives Verhalten.....	147
5.6.2.	HPRG-Liganden-Proben.....	150
5.6.3.	Labeling des HPRGs mit MTSSL.....	150
5.6.4.	HPRG-Kupfer-Proben für Tieftemperaturmessungen.....	153
5.7.	Dynamische Lichtstreuung und Fluoreszenzmessungen	155
	Literaturverzeichnis	XIII
A.	Anhang.....	XXIII
A.1.	Aufreinigung und allgemeine Charakterisierung des HPRGs.....	XXIII
A.1.1.	Alternative Methode: Anionenaustauschchromatographie.....	XXIII
A.1.2.	Alternative Methode: Affinitätschromatographie an Con A Sepharose 4B ...	XXVI
A.2.	Antioxidatives Verhalten des HPRGs	XXIX
A.3.	EPR-spektroskopische Untersuchung der Ligandenbindungskapazität	XXXI
A.3.1.	Ligand: Doxylstearinsäure als Fettsäureanaloga	XXXI
A.3.1.1.	5-Doxylstearinsäure	XXXI
A.3.1.2.	16-Doxylstearinsäure	XXXIV
A.3.2.	Ligand: TOAC als Aminosäureanaloga.....	XXXVII
A.3.3.	Ligand: Cat-1 als negativ geladener Ligand.....	XL
A.3.4.	Ligand: Fremys Salz als positiv geladener Ligand.....	XLIII
A.3.5.	Labeln mittels MTSSL	XLVII
A.4.	pH-abhängiges Lösungsverhalten des HPRGs.....	XLVIII
A.5.	EPR-spektroskopische Untersuchung der Kupferbindung	XLIX
A.5.1.	Protein:Kupfer-Verhältnis 1:2	XLIX
A.5.2.	Protein:Kupfer-Verhältnis 1:4	L
A.5.3.	Protein:Kupfer-Verhältnis 1:7	LI
A.5.4.	Protein:Kupfer-Verhältnis 1:10	LII
A.5.5.	Referenz: Kupfer in Puffer bei verschiedenen pH-Werten.....	LIII
A.5.6.	Darstellung der EPR-Referenzspektren von Kupfer in Wasser	LIV

A.5.7.	Darstellung der pH-abhängigen Signalamplituden der HPRG:Kupfer-Proben...	LV
A.5.8.	Darstellung der pH-abhängigen Doppelintegrale der HPRG:Kupfer-Proben.....	LV
A.5.9.	Darstellung der pH-Abhängigkeit der $g_{x/y}$ -Werte der HPRG:Kupfer-Proben.....	LVI
A.5.10.	Darstellung der Transmissionsmessung der Peptid:Kupfer-Proben	LVI
B.	Abbildungsverzeichnis	LVII
C.	Tabellenverzeichnis	LXV
D.	Danksagung.....	LXIX
E.	Lebenslauf.....	LXXI
F.	Eidesstattliche Erklärung	LXXIII

Abkürzungsverzeichnis und Symbole

Allgemeine Abkürzungen

AEC	Anionenaustauschchromatographie
bHPRG	bovines HPRG
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Circular Dichroismus
cDNA	Komplementäre DNA
Con A	Concanavalin A
cw	Continuous Wave (dt. kontinuierliche Welle)
DEAE	Diethylaminoethyl(-Sepharose)
DEER	Double-Electron-Electron-Resonance (dt. Elektron-Elektron-Doppelresonanz)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
ENDOR	Electron Nuclear Double Resonance (dt. Elektron-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie)
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
ESE	Electron Spin Echo
ESEEM	Electron Spin Echo Envelope Modulation (dt. Elektronenspin-echo-Enveloppen-Modulations-Spektroskopie)
ESR	Electron Spin Resonance (dt. Elektronenspinresonanz)
HORAC	Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HPRG	Histidin- und Prolinreiches Glykoprotein
HRG	Histidinreiches Glykoprotein
HRR	Histidinreiche Region
hHPRG	Humanes HPRG
IC	Internal conversion (dt. strahlungslose Konversion)
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
ISC	Intersystem Crossing

Abkürzungsverzeichnis und Symbole

K _d	Dissoziationskonstante
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut-off
N1/N2	Cystatinähnliche Regionen 1 / 2
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline
pI	Isoelektrischer Punkt
PRR1/2	Prolinreiche Region 1 / 2
rbHPRG	Kaninchen HPRG
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	Reversed phase HPLC
RSA	Rabbit Serum Albumin
SEC	Größenausschlusschromatographie
SNR	Signal to Noise Ratio (dt. Signal-Rausch-Verhältnis)
UV/Vis	Ultraviolettes/Sichtbares Licht

Abkürzungen von Chemikalien

5-DSA	5-(4,4-dimethyl-oxazolidin-1-oxyl)-Stearinsäure od. 5-Doxylstearinsäure
16-DSA	16-(4,4-dimethyl-oxazolidin-1-oxyl)-Stearinsäure od. 16-Doxylstearinsäure
APS	Ammoniumpersulfat
Asc.	L-Ascorbinsäure
BCA	Bicinchoninsäure
CAT-1	4-trimethylammonium-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl Iodid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fremys Salz	Kaliumnitrosodisulfonat
MTSSL	(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanethiosulfonat
NTA	Nitrilotriessigsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyl od. 4-Hydroxy-TEMPO
TOAC	2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxy-4-amino-4-carboxyl

Symbole EPR

A	Hyperfeinkopplungstensor
a_{iso}	Isotrope Hyperfeinkopplungskonstante
B	Magnetfeld
B_0	Statisches Magnetfeld
D	Rotationsdiffusionskoeffizient
D_{zfs}	Nullfeldaufspaltungstensor
E_{mag}	magnetische Energie
E_{str}	Strahlungsenergie
g	Anisotroper g-Tensor
g_{iso}	Isotroper g-Faktor
g_e	Lande-Faktor für ein freies Elektron im Vakuum (s. Konstanten)
g_n	Lande-Faktor für Kern
\hat{H}_{dd}	Hamilton-Operator für die dipolare, anisotrope Wechselwirkung zwischen Kern und Elektron
$\hat{H}_{\text{dd,e}}$	Hamilton-Operator für die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei Elektronen
\hat{H}_{ee}	Hamilton-Operator für die Elektron-Elektron-Wechselwirkung
\hat{H}_{ex}	Hamilton-Operator für die Spinaustausch-Wechselwirkung
\hat{H}_{ez}	Hamilton-Operator für die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung
\hat{H}_{fc}	Hamilton-Operator für die isotrope Fermi-Kontakt-Wechselwirkung
\hat{H}_{hf}	Hamilton-Operator für die Hyperfeinaufspaltung
\hat{H}_{nq}	Hamilton-Operator für die Kern-Quadrupol-Wechselwirkung
\hat{H}_{nz}	Hamilton-Operator für die Kern-Zeeman-Wechselwirkung
\hat{H}_{zfs}	Hamilton-Operator für die Nullfeldaufspaltung

Abkürzungsverzeichnis und Symbole

I	Kernspinquantenzahl
J_{12}	Austauschintegral der zwei kollidierenden Spins
J_{ex}	Austauschkopplungstensor
M	Magnetisierung
m_I	Spinquantenzahl für ein Kern
m_S	Spinquantenzahl für ein Elektron
n	Populationen der Energiezustände
P	Kern-Quadrupol-Tensor
Q	Kernquadrupolmoment
r	Abstand zwischen zwei ungepaarten Elektronen
r_{dd}	Abstand zwischen zwei Dipolen
R_H	Hydrodynamischer Radius
S	Drehimpuls des Elektronenspins
t	Zeit
T	Temperatur
T	(Entwicklungs-)Zeit zwischen zwei Pulsen bei ESEEM-Experimenten
T_1	Elektronenspin-Gitter-Relaxationszeit
T_2	Elektronenspin-Spin-Relaxationszeit
T_A	Anisotropie
T_{dd}	Dipolarer Kopplungstensor zwischen Kern und Elektron
$T_{dd,e}$	Dipolarer Kopplungstensor zwischen zwei Elektronen
V	Volumen
α, β, γ	Eulerwinkel
η	Viskosität
η_{as}	Asymmetrieparameter
κ	Quadrupolkopplungskonstante
μ	Magnetisches Moment
μ_I	Magnetisches Moment des Kerns
μ_S	Magnetisches Moment des Elektrons
ν	Frequenz der Mikrowellenstrahlung
ν_+, ν_0, ν_-	Frequenzübergänge
τ	Evolutionszeit bei Puls-EPR-Messungen

τ_1	Lebenszeit des Kollisionspaares
τ_2	mittlere Zeit zwischen den Spinaustausch-Vorgängen
τ_c	Rotationskorrelationszeit
ω_{ex}	Spinaustauschfrequenz

Symbole DLS

B	Basislinie
CONTIN	constrained regularization method for inverting data
D	Diffusionskoeffizient
$g_1(\tau)$	Normalisierte Feldautokorrelationsfunktion
$g_2(\tau)$	Normalisierte Intensitätsautokorrelationsfunktion
$G_2(\tau)$	Intensitätsautokorrelationsfunktion
$I(t)$	Streuintensität zum Zeitpunkt t
q	Streuvektor
R_H	Hydrodynamischer Radius
t	Zeit
T	Temperatur
t_M	Messdauer
β	Kohärenzfaktor
Γ	Zerfallskonstante
η	Viskosität
τ	Voranschreitende Zeit

Symbole Fluoreszenz

A_{280}	UV-Absorption bei 280 nm
d	Schichtdicke der Küvette
S_0	Grundzustand
S_i	Angeregter Zustand
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient

Konstanten

g_e	Lande-Faktor für freies Elektron im Vakuum (= 2,002319)
h	Planck'sches Wirkungsquantum (= $6,62607 \cdot 10^{-34}$ Js)
\hbar	(reduziertes) Planck'sches Wirkungsquantum (= $1,05457 \cdot 10^{-34}$ Js)
k_B	Boltzmann-Konstante (= $1,38065 \cdot 10^{-23}$ J/K)
μ_0	Vakuumpermeabilitätskonstante (= $1,25664 \cdot 10^{-6}$ N/A ²)
μ_B	Bohrsches Magneton (= $9,27400 \cdot 10^{-24}$ J/T)

1. Einleitung

1.1. Histidin- und Prolinreiches Glykoprotein

1.1.1. Allgemeines

Das Histidin- und Prolinreiche Glykoprotein (HPRG) ist ein Plasmaprotein, welches bei vielen Wirbeltierarten im Blut vorkommt^[1,2], jedoch wurde es auch schon bei wirbellosen Tieren^[3,4] nachgewiesen. Die Konzentration im Blut unterscheidet sich je nach Organismus, sodass beispielsweise bei humanem Serum eine Menge von 100-150 mg/l^[5] nachgewiesen werden konnte, wohingegen bei Kaninchenserum die Konzentration bei etwa 900 mg/l^[6] liegt. Erstmals wurde HPRG aus Humanserum von *Heimburger* 1972 isoliert und charakterisiert.^[5] Das Molekulargewicht liegt, je nach Organismus, mit der Glykosilierung im Bereich von 70 75 kDa mit einer Kettenlänge von etwa 500 bis 550 Aminosäuren. HPRG wird aufgrund seiner 2 Cystatinregionen am N-Terminus und seiner konservierten Disulfidbrückenbindungen in den Typ 3 der Cystatin-Superfamilie eingeordnet.^[7,8] Jedoch besitzt es keine inhibierende Wirkung auf Cysteinproteasen.^[9,10] HPRG wird hauptsächlich in der Leber^[11] produziert, kann aber auch in Immunzellen wie Monozyten^[12] oder Megakaryozyten^[12,13] gebildet werden.

1.1.2. Struktur

Die Aminosäuresequenz von humanem HPRG wurde aus cDNA-Sequenzierung als erste der HPRG-Sequenzen erhalten^[11,14] und in der GenBank mit der Nummer AAI50592.1 hinterlegt. Für rbHPRG existieren zwei unterschiedliche Aminosäuresequenzen, welche eine Übereinstimmung von 95% haben und sich in 28 Aminosäuren unterscheiden.^[14] Die erste Sequenz wurde 1996 von *Borza et al.*^[6] durch eine Kombination von cDNA- und Peptidsequenzierung erstellt. Jedoch legen Messungen von HPRG-Fragmenten durch Trypsinspaltung^[15] die Vermutung nahe, dass die Sequenz mit der GenBank-Nummer XP_008264798.1 die korrekte ist, welche ursprünglich aus der RNA-Sequenz erhalten wurde.^[14] Diese ist auch in Abbildung 1.1 gezeigt. Der Vergleich von hHPRG mit rbHPRG zeigt eine Übereinstimmung von 60%, wobei 385 Aminosäuren konserviert bzw. semi-konserviert sind und 53 Aminosäuren als Gaps vorhanden sind.^[14]

Einleitung

1	LTPTDCKTTK	PLAEKALDLI	NKWRRDGYLF	QLLRVAD AHL	DGAESATVYY	50
51	LVL DVKETDC	SVLSRKH WED	CDPDLTKRPS	LDVIGQCKVI	ATRYSD EYQT	100
101	LRLNDFNCTT	SSVSSALANT	KDSPVLFDFI	EDTEPFRKSA	DKALEVYKSE	150
151	SEAYASFRVD	RVERVTRVKG	GERTNYVDF	SVRNC SRSHF	HRHPAFGFCR	200
201	ADLSFDVEAS	NLENPEDVII	SCEVFNFE EH	GNISGFRPHL	GKTPLGTDGS	250
251	RDHHHPHKPH	KFGCPPPQEG	EDFSEGPPSQ	GGTPPLSPPS	GPRCRHRPFG	300
301	TNETHRFP HH	RNFSEHHPHG	PPPHGHHPHG	PPPHGHHPHG	PPPHGHPPHG	350
351	PPPHGHPPHG	PPPHGHPPHG	PPPHGHPPHG	PPPHGHPPHG	PPPHGHPPHG	400
401	PPPHGHPPHG	HGFHDHGPCD	PPSHKEGPQD	LHQHGHGPPP	KHPGKRGPGK	450
451	GHFPFHWRRI	GSVYQLPPLQ	KGEVLPLPEA	NFPSFSLRNH	THPLKPEIQP	500
501	FPQVASERCP	EEFNGEFAQL	SKFFPSTFPK			530

Abbildung 1.1: Aminosäuresequenz von rbHPRG ohne Berücksichtigung des Signalpeptids (GenBank-Nummer: XP_008264798.1).

Generell besitzt HPRG eine Multidomänenstruktur.^[2,6] Ausgehend vom N-Terminus besteht HPRG aus 2 Cystatin-ähnlichen Domänen, an die sich strukturell ungeordneten Bereiche, die Prolinreiche Region 1 (PRR1), die Histidinreiche Region (HRR), die Prolinreiche Region 2 (PRR2) und der C-Terminus, anschließen. Exemplarisch sind die Regionen für rbHPRG und hHPRG in Abbildung 1.2 gezeigt.

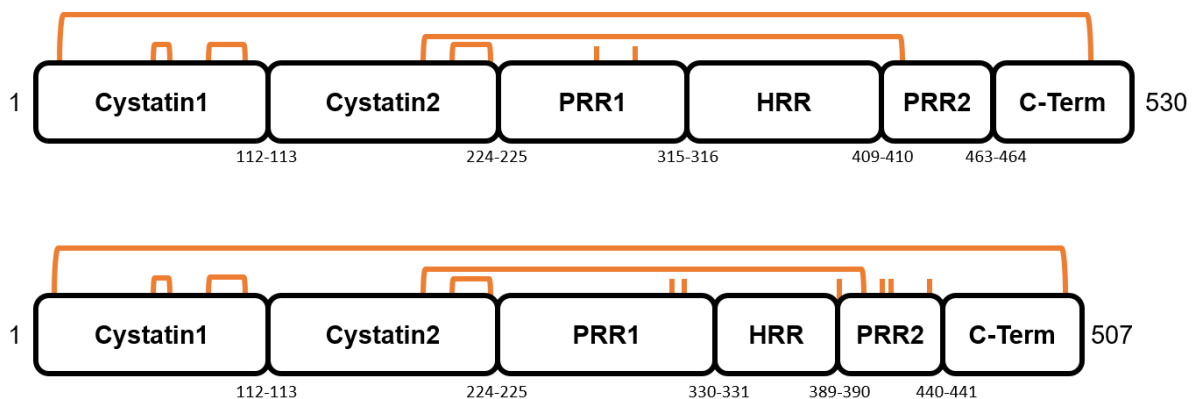


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen von rbHPRG (oben) und hHPRG (unten) mit den Zahlen als Aminosäurenummerierung und den ausgebildeten Disulfidbrückenbindungen und den freien Cysteinen in orange gekennzeichnet (adaptiert nach ^[14]).

Stabilisiert werden die Proteine durch Disulfidbrückenbindungen, wobei nur 10 Cystein zu den konservierten Aminosäuren gehören. Das legt die Vermutung nahe, dass maximal 5 Disulfidbrückenbindungen essentiell sind.^[14] Dabei ist bisher nicht geklärt, wie viele Bindungen für die native Proteinkonformation benötigt werden, aber es scheint, dass einige Cysteine besser für Proteinmodifikationen zugänglich, und somit für die Beeinträchtigung der

Die genaue Aminosäureabfolge erfolgt, abhängig vom jeweiligen Organismus, in einer bestimmten Sequenz und einer bestimmten Wiederholungsanzahl. Exemplarisch ist die Abfolge für rbHPRG, hHPRG und bHPRG in Abbildung 1.3 gezeigt. Es fällt auf, dass bei rbHPRG drei charakteristische Abfolgen vorhanden sind – „HHPHG“, „PPPHG“ und „HPPHG“. Bei bHPRG ist nur die Abfolge „HHPHG“, dafür aber in höherer Anzahl, vorhanden und bei hHPRG scheint die Abfolge deutlich variabler zu sein. Weiterhin ist die HRR bei humanem HPRG deutlich kürzer. Studien zeigten, dass Peptide mit der charakteristischen Abfolge „HHPHG“ Kupfer(II) und Zink(II) über die Histidine koordinieren können.^[24] Dabei ist die Affinität der Bindung abhängig von der Länge des Peptids und vom pH-Wert.^[24]

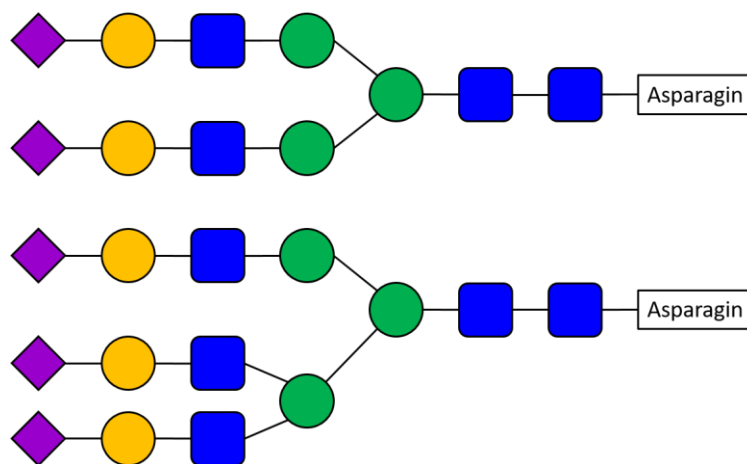


Abbildung 1.4: Mögliche Strukturen des Glykosilierungsmusters des rbHPRGs (adaptiert von ^[25]). Das N-Glucan besteht vermutlich aus Mannose (grüne Kreise), Galactose (gelbe Kreise), N-Acetylglucosamin (blaue Quadrate) und Sialinsäure (violette Quadrate).

Bei HPRG handelt es sich um ein Glykoprotein, welches über 6 mögliche N-verknüpfte Glykosilierungspositionen verfügt.^[25] Die Art und der Grad der Glykosilierung wurde von *Weyrauch et al.*^[25] für rbHPRG bestimmt. Fünf Glykosilierungen konnten bestimmt werden, wobei eine komplexe Glucanstruktur ermittelt wurde. Dabei befanden sich die Zuckerreste jeweils an N107, N184, N232, N302 und N489. An N312 konnte keine Glykosilierung bestimmt werden. Mögliche Strukturen des Zuckerrestes sind in Abbildung 1.4 gezeigt.

Für hHPRG ist bekannt, dass die Glykosilierung etwa 14 % der Molekularmasse ausmacht.^[11] 3 Glykosilierungspositionen, an N45, N107 und N326/327, wurden bereits bestimmt, wobei nicht geklärt ist, ob sich das Glucan an N326 oder N327 oder an beiden befindet. Jedoch existieren möglicherweise noch zwei weitere Stellen, N69 und N184, an denen eine Glykosilierung stattfinden kann, sodass insgesamt sechs mögliche N-Glykosilierungsstellen vorhanden sind.^[26,27] Jedoch ist für hHPRG die genaue Glucanabfolge nicht bekannt.^[27]

1.1.3. Funktion und Ligandenbindung

HPRG bindet diverse Liganden, welche entsprechend die Funktion des Proteins bestimmen. Dabei gibt es verschiedene, unabhängige Bindungsregionen für die Liganden.^[6,26] HPRG spielt eine große Rolle als Regulator der Blutgerinnung und der Fibrinolyse.

Die Bindung von HPRG und Heparin erfolgt mit einer hohen Affinität mit einem K_d von etwa 55 nM^[28]. Dies resultiert in einer Minderung der antikoagulierenden Wirkung des Heparins.^[5,29–31] Es ist bekannt, dass diese Interaktion durch u.a. pH-Wert und Zink-Anwesenheit beeinflusst wird.^[32,33] Von Jones et al. wurde ein Modell vorgeschlagen, dass die Bindung von Heparansulfat und Heparin an der N-terminalen Domäne erfolgt. Die Anwesenheit von Zink(II) oder ein geringerer pH-Wert führen zu einer Chelatisierung des Zinks bzw. einer Protonierung der HRR und somit zu einer positiveren Ladung in dieser Region. Dadurch wird eine strukturelle Änderung in der HRR hervorgerufen, die die Bindung zwischen Protein und Liganden moduliert. Das Heparin bzw. Heparansulfat als negativ geladene Liganden^[34] können daraufhin mit einer höheren Bindungsaffinität gebunden werden.^[1,32] Die Bindung hat zur Folge, dass die Erkennungsregion an Heparansulfat durch Heparanase nicht erkannt wird und somit die Spaltung/Degradation nicht erfolgt.^[35] Neben der Bindung von Heparansulfat und Heparin wurde auch die direkte Bindung von Heparanase in Abhängigkeit vom pH-Wert festgestellt.^[36]

Weitere wichtige Bindungspartner sind Plasmin und Plasminogen als Teil der Fibrinolyse. Durch Bindung an den Lysinbindungsseiten des Plasminogens wird eine Interaktion zwischen Plasminogen und Fibrin verhindert. Plasminogen scheint unabhängig von Heparin an HPRG zu binden, weshalb von unterschiedlichen Bindungspositionen ausgegangen werden kann.^[37] Durch die Interaktion wird der Gehalt an freiem Plasminogen um etwa 50 % durch die Bindung an HPRG reduziert.^[1] Die Stöchiometrie der Bindung zwischen HPRG und Plasminogen liegt etwa bei 1:1 bis 1:2 mit einem K_d von etwa 1 μ M.^[37–39] Auch die Interaktion von HPRG mit Plasminogen erfolgt pH-abhängig.^[40]

Zusätzlich dazu interagiert HPRG mit Fibrinogen.^[41] Es kann in die Fibringerinnung eingelagert werden, was jedoch keinen Einfluss auf die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin zu haben scheint. Durch HPRG sind die entstandenen Fibrillen jedoch deutlich dünner als ohne HPRG.^[41]

Ein weiterer Ligand, welcher abhängig von einer Zink(II)-Bindung des HPRGs oder pH-Wert-Änderung gebunden wird, ist an Endothelzellen immobilisiertes Tropomyosin.^[42] Im

Unterschied zu Heparin und Heparansulfat wird Tropomyosin an der HRR gebunden, was vermutlich aufgrund der Elektostatik geschieht.^[1] HPRG zeigt weiterhin eine Affinität für verschiedene Phospholipide^[43] und bindet DNA^[44,45]. Ergänzend dazu zeigten Peptide der HRR des HPRGs eine toxinneutralisierende Wirkung durch die Bindung Lipopolysaccachride.^[46] Ergänzend dazu zeigt HPRG auch eine antibakterielle und antifungale Wirkung bei sauren pH-Werten und hohen Zinkionen-Konzentrationen.^[47-49]

Eine weitere Funktion hat HPRG im Immunsystem durch Komplexbildung mit IgG und der Regulation der Bildung von Immunkomplexen.^[50-52] Dabei ist die Bindungsaffinität abhängig von der Art der leichten Kette des IgG Moleküls.^[53]

Durch den hohen Histidingehalt, vor allem in der HRR, können neben einer Vielzahl von Metallionen auch Häm gebunden werden.^[54-57] Durch die Prolinabfolge in der HRR wird eine Polyprolin(II)-Helix gebildet, wodurch die Seitenketten der Histidine strukturiert werden. Die Imidazolgruppen werden nach außen gewandt, sodass eine Bindung von Metallionen, vor allem Zink(II), erfolgen kann.^[1,58,59]

Die Interaktion mit Häm wurde von Morgan^[54] fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Dabei fand er eine Bindungsstöchiometrie von 1:1 mit einem K_d von 1,5 μM , wobei keine Konformationsänderung des Proteins beobachtet wurde. Weiterhin wurde von Morgan gezeigt, dass Metallionen Häm aus seiner Bindung mit HPRG verdrängen kann.^[54]

Die Bindungsaffinitäten von hHPRG und rbHPRG sind für die einzelnen Metallionen samt ihrer Stöchiometrie in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Es ist erkennbar, dass sich die Affinitäten zwischen rbHPRG und hHPRG deutlich unterscheiden. *Priebatsch et al.*^[58] vermuteten, dass dies durch den unterschiedlichen Histidingehalt in der jeweiligen HRR bedingt wird. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, unterscheidet sich das GHHPH-Motiv in der Anzahl der Wiederholungen und auch in der genauen Aminosäureabfolge. Weiterhin wird der Unterschied auch durch unterschiedliche Bestimmungsmethoden oder unterschiedliche Reaktionsbedingungen erklärt.^[58]

Physiologisch ist die Bindung von Metallionen mit vielen, auch oben genannten, Funktionen verbunden. So kann die Bindung bestimmter Liganden durch Metallionen-anwesenheit reguliert werden. Andererseits spielt beispielsweise Zink(II) eine große Rolle bei der Wundheilung, indem die Bindung von Zink pH-abhängig durch HPRG realisiert wird.^[58,60]

Histidin- und Prolinreiches Glykoprotein

Tabelle 1.1: Übersicht über ermittelte Bindungskapazitäten von hHPRG und rbHPRG mit Metallionen. Für das jeweilige Metallion wurde die Dissoziationskonstante [μM] und die Stöchiometrie der Bindung in HPRG:Metallion angegeben.

Ion	hHPRG ^[57]	hHPRG ^[61]	hHPRG ^[62]	rbHPRG ^[61]	rbHPRG ^[63]	rbHPRG ^[64]
Zn(II)	2,85 μM	12,41 μM	21,11 μM	22,78 μM	1 μM	7,0 μM
	1:9-10	1:10	1:16	1:10	1:>10	1:12,8
Cu(II)	3,35 μM	-	13,28 μM	-	0,2 μM	-
	1:13	-	1:8	-	1:10,5	-
Ni(II)	3,72 μM	-	23,47 μM	-	1,3 μM	8,0 μM
	1:6	-	1:6	-	1:9,5	1:9,4
Co(II)	9,39 μM	-	26,25 μM	-	2,1 μM	-
	1:13	-	1:4	-	1:10,5	-
Fe(II)	-	-	15,62 μM	-	-	-
	-	-	1:22	-	-	-

Bei einer Sepsis ist die HPRG-Konzentration im Blut signifikant verringert. Umgekehrt bedeutet dies, dass eine effektive Therapie zur Behandlung von Sepsis in der HPRG Supplementation besteht.^[65,66] Weiterhin hat HPRG einen Effekt auf die Produktion und Fangkapazität von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). *Wake et al.*^[62] zeigten, dass HPRG effektiver durch ROS oxidiert wird als Albumin. Dabei hemmt HPRG die Produktion von Hydroxylradikalen, entfernt Peroxylradikale, erhöht die Aktivität der Gluthationperoxidase und bindet divalente Metallionen. Weiterhin wird vermutet, dass durch die Selbstoxidation von HPRG das umgebende Gewebe vor Schäden durch Radikale geschützt werden kann.^[62]

Eine Übersicht über die möglichen Bindungspositionen der im Text beschriebenen Liganden an HPRG ist in Abbildung 1.5 zusammengestellt.

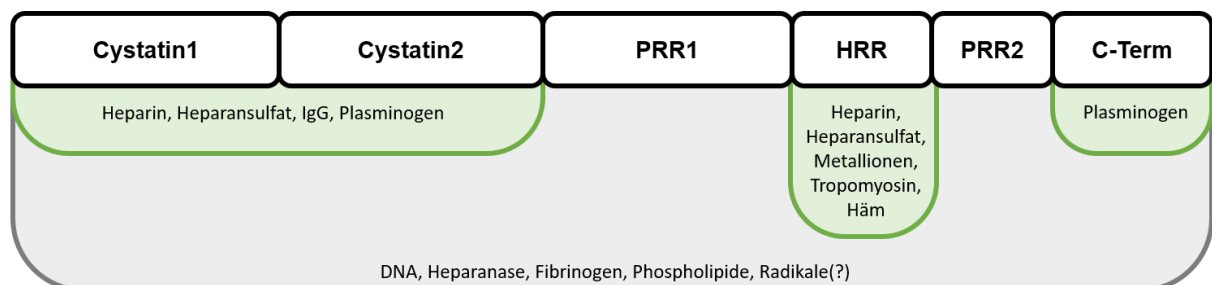


Abbildung 1.5: Darstellung von hHPRG mit den Bindungsregionen verschiedener Liganden (adaptiert von ^[26]). Die genaue Bindungsposition von DNA, Heparanase, Fibrinogen, von Phospholipiden und Radikalen ist nicht bekannt, weshalb das gesamte Protein als Bindungsregion angegeben wird.

1.1.4. Bisherige Aufreinigungen

Bisher wurde HPRG auf verschiedene Weisen aus Serum isoliert. Die verwendeten Methoden unterscheiden sich je nach verwendetem Ausgangsserum stark. Ergänzend dazu spielt auch die weiterführende Verwendung des Proteins eine Rolle. Im Folgenden sollen einige Aufreinigungsmethoden exemplarisch vorgestellt werden:

- a) Heimburger^[5] verwendete 1972 eine Methode zur Isolation aus Humanserum, welche aus der Adsorption an CM-32-Cellulose und der Elution mit einem linearen Salzgradienten besteht. Die weitere Fraktionierung erfolgte mittels präparativer Zonenelektrophorese und einer Gelfiltration an Sephadex G-100. Mittels dieser Durchführung konnte das HPRG erstmals isoliert und charakterisiert werden. Diese Methode wurde leicht von Morgan^[56] modifiziert und auf die Isolation von rbHPRG aus Kaninchenserum angepasst.
- b) Als weitere grundlegende Aufreinigungsmethode wurde von *Chang et al.*^[67] die Isolation von HPRG aus Mausserum durch eine ConA-Sepharose 4B-Säule in Kombination mit einer Heparin-Agarose-Säule und einer DEAE-Sepharose-Säule eingeführt.
- c) 1997 etablierten *Borza et al.*^[68] die Aufreinigung von hHPRG durch eine mit Nickel-NTA gepackte Säule. Ein ähnliches Vorgehen nutzten *Mori et al.*^[69] für die Isolation von rbHPRG.
- d) *Schinke et al.*^[70] zeigten ebenfalls 1997, dass eine Expression von hHPRG in Sf9 Insektzellen möglich ist. Dazu verwendeten sie die von *Koide*^[11] ermittelte cDNA des Proteins. Sie stellten jedoch fest, dass die Glykosylierung des HPRGs nicht vollständig erfolgt, was in einer geringeren molekularen Masse im Vergleich zum aus Plasma aufgereinigten HPRGs resultiert.
- e) *Patel et al.*^[71] nutzten für die Isolation von HPRG aus humanem Plasma eine mit Co(II)-beladene Affinitätssäule. Für ein isoelektrisch reines Protein wurde noch eine Anionenchromatographie angeschlossen. Sie vergleichen die neue Methode bezüglich Reinheit und Ausbeute mit HPRG, welches über die Phosphochellulose-Methode aufgereinigt wurde. Sie kamen zu dem Schluss, dass bei letzterem nur etwa 55 % der Probe aus HPRG bestand, wohingegen die restlichen 45 % unbekanntes Material ist. Für ihre Methode gaben sie eine Ausbeute von etwa 33 % und bestätigten die Reinheit mittels Massenspektrometrie.

- f) *Colwell* et al.^[72] verbesserten die Reinheit der von *Patel* et al.^[71] etablierten Methode für rbHPRG durch zwei 25-50 % Ammoniumsulfatfällungen, deren Präzipitität für die Affinitätschromatographie und die Anionenaustauschchromatographie verwendet wurde. Die Ausbeute an HPRG verringerte sich durch den zusätzlichen Aufreinigungsschritt von 33 %^[71] auf 24 %^[72]. Weiterhin testeten *Colwell* et al. verschiedene andere Aufreinigungen mit dem Fazit, dass die Anionenaustauschchromatographie mittels Q-Sepharose viele Kontaminanten entfernt, jedoch Verunreinigungen in geringer Menge erhalten bleiben. Tests einer Aufreinigung über Phosphocellulose und Heparin-Sepharose zeigten jedoch eine viel größere Anzahl an Verunreinigung des isolierten HPRGs.
- g) Auch *Priebatsch* et al.^[57] nutzte die Methode von *Patel* et al.^[71], ergänzte aber noch einen Gelfiltrationsschritt zur Behandlung des isolierten HPRGs mit EDTA zur Entfernung von Metallionen.
- h) *Weyrauch* et al.^[25] nutzen ebenfalls den ersten Aufreinigungsschritt mit der Affinitätschromatographie von *Patel* et al.^[71], ersetzen aber den Anionenaustauscher mit einer nicht-reduzierenden präparativen Gelelektrophorese. Als größte Verunreinigung nannten sie Serumalbumin, welches sich auf SDS-Gelen anders verhält als HPRG, sodass eine Abtrennung möglich ist. Die Elution des Proteins von dem Gel erfolgte mittels Elektroelution in einem SDS-haltigen Puffer. Um Puffersalze zu entfernen, wurde eine Umkehrchromatographie mit einer RP-C3 Säule verwendet. Die Ausbeute wurde auf etwa 30 % bestimmt und die Reinheit betrug 99%, was mittels Massenspektrometrie ermittelt wurde.

1.2. Zielstellung der Arbeit

In der Arbeit soll das Bindungsverhalten des nativen HPRGs spektroskopisch untersucht werden. Dafür ist es nötig, reines Protein zu isolieren. Da es sich bei HPRG um ein Glykoprotein handelt, ist eine standardmäßige, rekombinante Herstellung mittels *E. coli* Zellen nicht möglich, da diese bei der Proteinproduktion keine Glykosilierungen einfügen.^[73,74] Deshalb sollen zuerst verschiedene, bereits vorhandene Aufreinigungsmethoden getestet und gegebenenfalls eine neue Methode zur Isolation von reinem HPRG aus Kaninchenserum etabliert werden. Die Isolation von HPRG aus Kaninchenserum bietet den Vorteil, dass es in deutlich höheren Mengen vorkommt als bei anderen Organismen. Zu einem späteren Zeitpunkt kann die Aufreinigung von HPRG aus Serum auf andere Organismen übertragen und deren Eigenschaften ebenfalls spektroskopisch untersucht und mit den Ergebnissen in dieser Arbeit verglichen werden. Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens soll vorrangig die EPR-Spektroskopie genutzt werden, bei welcher drei Ansätze verfolgt werden:

- a) Es sollen verschiedene Spinsonden zu dem Protein gegeben und die Interaktion zwischen beiden untersucht werden. Je nach Wahl der Sonde können unterschiedliche Wechselwirkungen betrachtet werden.^[75,76]
- b) Es sollen Metallionen (vorrangig Kupfer(II)) als EPR-aktive Substanz genutzt werden, um die nähere Umgebung des Ions und die bindenden Aminosäuren zu untersuchen. Dabei soll, neben dem Liganden-Protein-Verhältnis, auch der pH-Wert variiert werden, da bereits bekannt ist, dass der pH-Wert einen großen Einfluss auf die Art der Bindung von Zink(II) und die resultierende Konformation des HPRGs hat.^[14] Daher muss vorher noch betrachtet werden, dass das Protein bei den gewählten pH-Bedingungen stabil ist.
- c) Es soll versucht werden, an das Protein kovalent eine Spinsonde zu binden. Die kovalente Bindung erlaubt nähere Aussagen über die Proteinkonformation bei Zugabe verschiedener Liganden, vorausgesetzt, das Spinlabel befindet sich in unmittelbarer Nähe zu der Bindungsposition. Weiterhin ergibt sich so die Möglichkeit, beispielsweise Abstände zwischen der gelabelten Aminosäure und einem gelabelten Liganden zu bestimmen und demnach ebenfalls die Proteinkonformation bei Ligandanwesenheit zu ermitteln.

Neben der EPR-Spektroskopie sollen weitere spektroskopische Methoden, wie die Fluoreszenzspektroskopie oder die dynamische Lichtstreuung verwendet werden. Diese

Methoden ermöglichen eine ganzheitliche Abschätzung des Verhaltens des Proteins unter verschiedenen Bedingungen.

Um eine bessere Einschätzung über von eventuellen Bindungspositionen von Liganden am HPRG zu erhalten, werden ebenfalls Messungen mit Peptiden des HPRGs durchgeführt.

In der Literatur sind bereits Messungen zu dem Bindungsverhalten von Peptiden des HPRG vorhanden. Diese beziehen sich jedoch auf den Effekt der Metallionenbindung in Abhängigkeit der Anzahl der Wiederholungen des GHHPH-Motivs in der HRR.^[77-79]

In dieser Arbeit wurden charakteristische Regionen des Proteins ausgewählt, welche sich in der PRR1, der PRR2 und der HRR befinden, um auf mögliche Bindungspositionen und Bindungskapazitäten, auch abseits der HRR, zu schließen. Die entsprechenden Sequenzen sind nachfolgend zusammengestellt, wobei die Zahlen die entsprechende Anfangs- und Endamino-säure beim vollständigen Protein symbolisieren. Für die HRR werden keine Aminosäurepositionen angegeben, da es sich um einen Ausschnitt aus der HRR handelt, welche durch seine repetitiven Einheiten charakterisiert wird.

PRR1:	240	LGKTPLGTDG	SRDHHHPHKP	HKFGCP	265
HRR:	-	HPPHGPPPHG	HPPHGPPPHG	HPPHGPPPHG	HPPHGPPPHG -
PRR2:	420	DPPSHKEGPQ	DLHQHGHGPP	PKHPGKRGPG	KGHFPPHWRR 459

Generell können Erkenntnisse, welche bei den Peptiden erlangt werden, nicht direkt auf das vollständige Protein übertragen werden und umgekehrt, da Zugänglichkeiten und eventuelle übergeordnete Strukturen und mögliche Bindungstaschen nicht bei den Peptidstrukturen berücksichtigt werden.^[80] Diese Messungen können aber Hinweise liefern, ob und wo Interaktionen mit Liganden stattfinden können. Diese Positionen können in nachfolgenden Experimenten mit dem vollständigen Protein über regionsselektive Messungen überprüft werden.

2. Methodische Grundlagen

2.1. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

2.1.1. Grundlagen der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie ist eine Magnetresonanz-Methode, welche auf der Messung der Detektion der Resonanz von ungepaarten Elektronen in einem magnetischen Feld und einer zugehörigen Mikrowelle basiert. Den Grundstein dafür legten in den 1920er Jahren Otto Stern und Walther Gerlach mit der Entdeckung des magnetischen Moments von Silberatomen in einem Magnetfeld.^[81] Die quantenmechanische Beschreibung des Phänomens als Elektronenspin wurde für dieses Experiment von Uhlenbeck und Goudsmit einige Jahre später erbracht.^[82]

Elektronen weisen ein Drehimpuls \vec{S} ihres Spins und folglich ein magnetisches Moment $\vec{\mu}_S$ auf. Bei gepaarten Elektronen hebt sich der Elektronenspin gegenseitig auf, wohingegen bei ungepaarten Elektronen der Elektronenspin erhalten bleibt. Mathematisch kann dies über Gleichung (2.1) beschrieben werden

$$\vec{\mu}_S = -\frac{g_e \mu_B}{\hbar} \vec{S} \quad (2.1)$$

Wenn kein externes Magnetfeld angelegt wird, sind die magnetischen Momente zufällig im Raum orientiert und die Energiezustände sind entartet. Mit Anlegen eines externen, homogenen Magnetfeldes, im Laborkoordinatensystem in z-Richtung definiert, wird die Entartung aufgehoben und die Energie des Elektrons kann zwei unterschiedliche Energiezustände separiert werden. Es ergibt sich in z-Richtung eine Quantisierungsachse, an der sich die Elektronenspins ausrichten und die Spinquantenzahl nimmt die Werte $m_S = \pm 1/2$ für die Elektronen an. Die beiden Spinzustände werden, bezogen auf das externe Magnetfeld, auch als $|\alpha\rangle$ - oder paralleler Zustand mit einer magnetischen Spinquantenzahl von $m_S = +1/2$ und als $|\beta\rangle$ - oder antiparalleler Zustand mit einer magnetischen Spinquantenzahl von $m_S = -1/2$ bezeichnet. Damit ergibt sich Gleichung (2.2) für die jeweiligen Energiezustände des magnetischen Momentes entlang des Magnetfeldes.

$$E = m_S g_e \mu_B B_0 \quad (2.2)$$

Der Unterschied zwischen den beiden Energiezuständen definiert die Resonanzbedingung:

$$\Delta E = h\nu = g_e \mu_B B_0 \quad (2.3)$$

Die notwendige Energie, welche für den Übergang zwischen dem geringeren Energielevel zu dem höheren Energielevel benötigt wird, wird durch elektromagnetische Anregung $h\nu$ durch eine Mikrowelle realisiert. Schematisch ist dies in Abbildung 2.1 gezeigt.

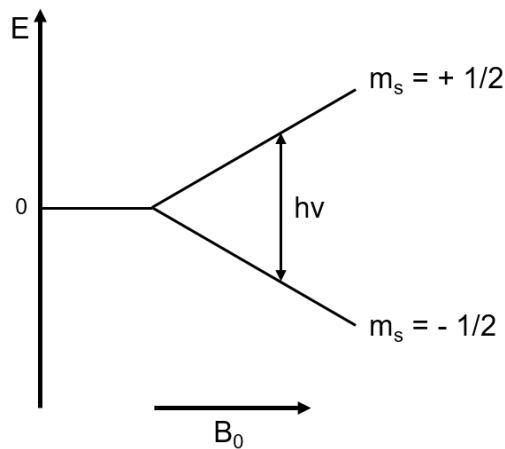


Abbildung 2.1: Aufspaltung der Energielevel von einem Elektron für ein Spin-System $S = 1/2$ im homogenen Magnetfeld.

Die Verteilung der Populationen n der Energiezustände kann durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben werden.

$$\frac{n_\alpha}{n_\beta} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad (2.4)$$

Dabei ist zu beachten, dass nicht einzelne Elektronenspins detektiert werden, sondern ein Ensemble von magnetischen Momenten mehrerer Elektronenspins. Als kennzeichnender Parameter kann die makroskopische Magnetisierung M bei Anwesenheit eines externen Magnetfeldes gesehen werden. Diese beschreibt das magnetische Moment μ_i bezogen auf das Volumen V . Ohne ein externes Magnetfeld sind die einzelnen magnetischen Momente zufällig im Raum orientiert.

$$M = \frac{1}{V} \sum_i \mu_i \quad (2.5)$$

2.1.2. Der Spin Hamilton Operator

Neben dem externen Magnetfeld wird der energetische Zustand eines ungepaarten Elektrons auch durch andere Elektronen(-spins) oder andere Kern(-spins) beeinflusst. Für eine nähere Beschreibung aller magnetischen Interaktionen des Elektronenspins wird der Spin-Hamilton-Operator nach Gleichung (2.6) zugrunde gelegt.

$$\hat{H}(S) = \hat{H}_{ez} + \hat{H}_{zfs} + \hat{H}_{nz} + \hat{H}_{hf} + \hat{H}_{nq} + \hat{H}_{ee} \quad (2.6)$$

Auf die einzelnen Terme und ihre Bedeutung soll im Folgenden eingegangen werden.

2.1.2.1. Elektron-Zeeman Wechselwirkung \hat{H}_{ez}

Die Interaktion zwischen dem Elektronenspin und dem externen Magnetfeld wird durch den Elektron-Zeeman-Term nach Gleichung (2.7) beschrieben. Die resultierende Aufspaltung ist in Abbildung 2.1 zu sehen.

$$\hat{H}_{ez} = \frac{\mu_B}{\hbar} B_0^T g_e \hat{S} \quad (2.7)$$

Da sowohl das externe (transponierte) Magnetfeld B_0 , als auch der Elektronspin-Operator \hat{S} eine Richtungsabhängigkeit aufweisen, ergibt sich \mathbf{g} als ein Tensorelement mit einer 3x3 Matrix. Eine Diagonalisierung erfolgt durch die Anpassung des Laborkoordinatensystems durch Rotation um die Euler Winkel α , β und γ an das Molekülkoordinatensystem des Radikals.^[83]

$$g_e = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.8)$$

Je nach molekularer Symmetrie ergibt sich für den g-Wert ein rhombischer ($g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$), ein axialer ($g_{xx} = g_{yy} \neq g_{zz}$) oder ein isotroper ($g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$) Fall. Bei einer schnellen Rotation in Lösung um alle Achsen kann die g-Wertmatrix zu dem isotropen g-Wert gemittelt werden.

$$g_{iso} = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (2.9)$$

2.1.2.2. Nullfeldaufspaltung \hat{H}_{zfs}

Für einen Spin-Ensemble mit $S > 1/2$ kann auch während der Abwesenheit eines externen Magnetfeldes eine Energiefeldaufspaltung beobachtet werden. Dies kann nach Gleichung (2.10) als Nullfeldaufspaltung beschrieben werden.

$$\hat{H}_{zfs} = \hat{S}^T D_{zfs} \hat{S} \quad (2.10)$$

Die Wechselwirkung beruht auf dipolaren Kopplungen zwischen mehreren ungepaarten Elektronen. Der Tensor D_{zfs} stellt dabei den Nullfeldaufspaltungstensor dar. In dieser Arbeit kann die Nullfeldaufspaltung vernachlässigt werden, da nur mit Radikalen und Ionen mit $S = 1/2$ gearbeitet wurde.

2.1.2.3. Kern-Zeeman Wechselwirkung \hat{H}_{nz}

Die Interaktion von Kernspins mit dem externen Magnetfeld wird durch die Kern-Zeeman-Wechselwirkung nach Gleichung (2.11) als Summe aller beteiligten Kerne k beschrieben. Dies steht in Analogie zu der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung, mit Ausnahme des umgekehrten Vorzeichens durch die unterschiedliche Ladung zwischen Kernen und Elektronen.

$$\hat{H}_{nz} = -\frac{\mu_n}{\hbar} \sum_k B_0^T g_{n,k} \hat{I}_k \quad (2.11)$$

Die Aufspaltung der Energielevel des Elektronenspins durch interagierende Kernspins in einem homogenen Magnetfeld ergibt sich über $2I + 1$.

2.1.2.4. Hyperfeinwechselwirkung \hat{H}_{hf}

Die Hyperfeinwechselwirkung tritt bei der Interaktion zwischen Elektronenspins mit den umgebenden Kernspins auf. Diese enthält wichtige Informationen über die magnetische Umgebung des Elektronenspins.

Der Hyperfeinkopplungstensor \mathbf{A} setzt sich aus der isotropen Fermi-Kontakt-Wechselwirkung \hat{H}_{fc} und der dipolaren, anisotropen Wechselwirkung \hat{H}_{dd} zusammen.

$$\hat{H}_{hf} = \sum_k \hat{S}^T A_k \hat{I}_k = \hat{H}_{fc} + \hat{H}_{dd} \quad (2.12)$$

Die Dipol-Dipol-Interaktion beinhaltet den dipolaren Kopplungstensor \mathbf{T} .

$$\hat{H}_{dd} = \sum_k \hat{S}^T T_{dd,k} \hat{I}_k \quad (2.13)$$

Diese wirkt über den Raum hinweg und ist orientierungsabhängig. Energetisch kann das über Gleichung (2.14) ausgedrückt werden, wobei μ_e bzw. μ_n die magnetischen Momente des Elektronen-, bzw. Kernspins darstellen und r_{dd} die Distanz zwischen ihnen.

$$E_{dd} = \frac{\mu_0}{4\pi r_{dd}^3} \left[\mu_S^T \mu_I - 3 \frac{(\mu_S^T r_{dd})(\mu_I^T r_{dd})}{r_{dd}^2} \right] \quad (2.14)$$

Die dipolare Hyperfeinwechselwirkung mittelt sich bei schneller isotroper Rotation zu null heraus, sodass dieser für Messungen in Lösung keine Rolle spielt.

Die Fermi-Kontakt-Wechselwirkung als isotroper Anteil der Hyperfeinwechselwirkung ergibt sich nach Gleichung (2.15).

$$\hat{H}_{fc} = \sum_k a_{iso,k} \hat{S}^T \hat{I}_k \quad (2.15)$$

Diese beinhaltet durch die Annahme einer schnellen Molekülrotation die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante a_{iso} , welcher sich aus der Mittelung des Hyperfeinkopplungstensors \mathbf{A} der drei Raumrichtungen x, y und z für eine freie Rotation nach Gleichung (2.16) ergibt.

$$a_{iso} = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (2.16)$$

Im Unterschied zu der dipolaren Hyperfeinwechselwirkung wirkt die Fermi-Kontaktwechselwirkung nicht über den Raum hinweg. Sie ergibt sich durch die die endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Elektrons in einem s-Orbital am Kernort. Demnach existiert ein direkter Kontakt zwischen ungepaartem Elektron und dem Kern.^[84]

$$a_{iso} = \frac{2\mu_0}{3\hbar} g_e \mu_B g_n \mu_I |\psi_0(0)|^2 \quad (2.17)$$

2.1.2.5. Kern-Quadrupol-Wechselwirkung \hat{H}_{nq}

Kerne mit einem Kernspin von $I \geq 1$ weisen eine nicht sphärische Ladungsverteilung auf, welche zu dem Kernquadrupolmoment \mathbf{Q} führt. Dieses wechselwirkt mit dem elektrischen Feldgradienten, welcher selbst durch die Ladungsverteilung von dem Elektron und den umgebenden Kernen induziert wird. Diese Kernquadrupol-Wechselwirkung kann als Hamilton-Operator mit \mathbf{P} als Kern-Quadrupol-Tensor wie folgt beschrieben werden.

$$\hat{H}_{nq} = \sum_k \hat{I}_k^T P_k \hat{I}_k \quad (2.18)$$

Diese Wechselwirkung ist für die Aufnahme von cw-EPR-Spektren kaum von Bedeutung und erscheinen in leichten Verschiebungen von Resonanzlinien oder in Form von verbotenen Übergängen.^[85] Jedoch bei Experimenten, welche auf der Detektion der nuklearen Umgebung von Elektronenspins basieren, wie beispielsweise bei ESEEM-Messungen, spielen diese eine große Rolle.

2.1.2.6. Elektron-Elektron-Wechselwirkung \hat{H}_{ee}

Wenn zwei Elektronenspins stark miteinander wechselwirken, können diese über einen Gruppenspin definiert werden. Bei schwach gekoppelten ungepaarten Elektronen wird das System aus einzelnen Hamilton-Operatoren für die jeweiligen Elektronen beschrieben mit zusätzlichen Kopplungen, welche als Spinaustausch \hat{H}_{ex} und Dipol-Dipol-Wechselwirkung $\hat{H}_{dd,e}$ bezeichnet werden.

$$\hat{H}(S_1, S_2) = \hat{H}(S_1) + \hat{H}(S_2) + \hat{H}_{ex} + \hat{H}_{dd,e} \quad (2.19)$$

Der Spinaustausch, auch als Heisenbergaustausch bezeichnet, wird durch den direkten Spinüberlapp der beiden Orbitale mit dem ungepaarten Elektron in Lösung charakterisiert mit dem Austauschkopplungstensor J_{ex} . Diese Interaktion kann nur über einen Abstand von maximal 1,5 nm erfolgen.^[85]

$$\hat{H}_{ex} = \hat{S}_1^T J_{ex} \hat{S}_2 \quad (2.20)$$

Die kurzen Kollisionen sind abhängig von der Spinkonzentration und der molekularen Diffusion. Der Spinaustausch kann durch die Spinaustauschfrequenz ω_{ex} näher beschrieben werden, wobei τ_1 die Lebenszeit des Kollisionspaares, τ_2 die mittlere Zeit zwischen den Spinaustausch-Vorgängen und J_{12} das Austauschintegral der zwei kollidierenden Spins ist.^[86]

$$\omega_{ex} = \frac{J_{12}^2 \tau_1^2}{\tau_2 (1 + J_{12}^2 \tau_1^2)} \quad (2.21)$$

Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung kann analog zu dem dipolaren Anteil bei der Hyperfeinwechselwirkung mit dem dipolaren Kopplungstensor $T_{dd,e}$ betrachtet werden.

$$\hat{H}_{dd,e} = \hat{S}_1^T T_{dd,e} \hat{S}_2 \quad (2.22)$$

Die Wechselwirkungsfrequenz ist abhängig von dem Abstand zwischen den Elektronen und ist proportional zu r^{-3} .

2.1.3. Nitroxide als EPR-aktive Spezies

In biologischen Proben, wie beispielsweise Proteinen, kommen ungepaarte Elektronen nur selten natürlich vor, weshalb EPR-aktive Substanzen in die Probe eingebracht werden müssen. Das kann über das sogenannte „spin probing“ erfolgen. Ein stabiles Radikal wird zu der Probe gegeben und die Interaktionen des Radikals mit dem biologischen Material kann beobachtet werden. Weiterhin gibt es das sogenannte „spin labeling“, bei welchem ein stabiles Radikal kovalent an das Protein gebunden wird. Meist erfolgt die Bindung über eine Disulfidbrückenbindung zwischen der Thiolgruppe eines Cysteins und einer entsprechenden Thiolgruppe an der Sonde.^[87–90]

Als stabile Radikale werden meistens Nitroxide verwendet. Exemplarisch sind einige Strukturen typischer Nitroxidradikale in Abbildung 2.2 zusammengefasst.

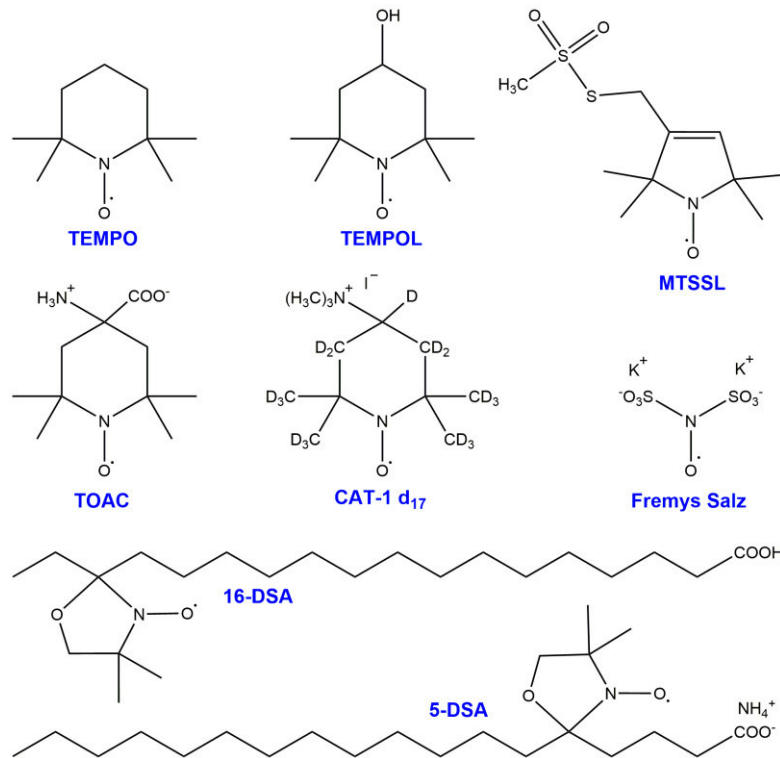


Abbildung 2.2: Chemische Strukturen von typischen Nitroxid-Radikalen.

Diese besitzen ein ungepaartes, delokalisiertes Elektron zwischen der N-O-Bindung. Das Molekülkoordinatensystem ist für Nitroxide so definiert, dass die N-O-Bindung entlang der x-Achse und die z-Achse entlang dem p-Orbital des Stickstoffs verläuft.^[88] Dies ist in Abbildung 2.3 veranschaulicht.

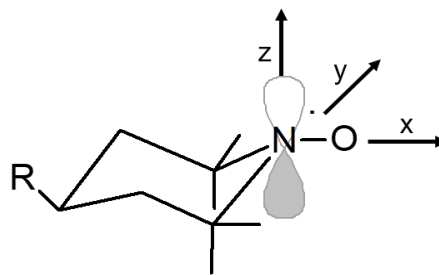


Abbildung 2.3: Allgemeine Struktur eines Nitroxid-Radikals (z.B.: TEMPO mit R=H) mit den Hauptachsen des Koordinatensystems.

Bei einem Nitroxid mit einem ¹⁴N-Kern ist $S = 1/2$ und $I = 1$. Die relevanten Terme des Spin-Hamilton-Operators sind, nach Gleichung (2.23), die Elektron-Zeeman-Aufspaltung \hat{H}_{ez} , die Kern-Zeeman-Aufspaltung \hat{H}_{nz} und die Hyperfeinwechselwirkung \hat{H}_{hf} .^[91]

$$\hat{H}(NO) = \hat{H}_{ez} + \hat{H}_{nz} + \hat{H}_{hf}$$

$$\hat{H}(NO) = \frac{\mu_B}{\hbar} B_0^T g_e S - \frac{\mu_I g_n}{\hbar} B_0^T I + S^T A I \quad (2.23)$$

Durch Lösen der Gleichung (2.23) ergibt sich Gleichung (2.24) für eine anisotrope Rotation. Für den Fall einer isotropen Rotation können die Tensoren \mathbf{A} und \mathbf{g} mit den gemittelten Werten a_{iso} und g_{iso} ersetzt werden.

$$E(NO) = g_e \mu_B B_0 m_S - g_n \mu_n B_0 m_I + A m_S m_I \quad (2.24)$$

Die in Gleichung (2.24) beschriebenen Terme führen zu dem Energiediagramm, wie es in Abbildung 2.4 gezeigt wird. Die Übergänge ergeben sich nach den Auswahlregeln $\Delta m_S = \pm 1$ und $\Delta m_I = 0$, sodass für Nitroxide 3 Energieübergänge und demnach auch 3 Linien im Spektrum beobachtet werden. Dabei erfolgt die Energieaufspaltung nach Abbildung 2.4.

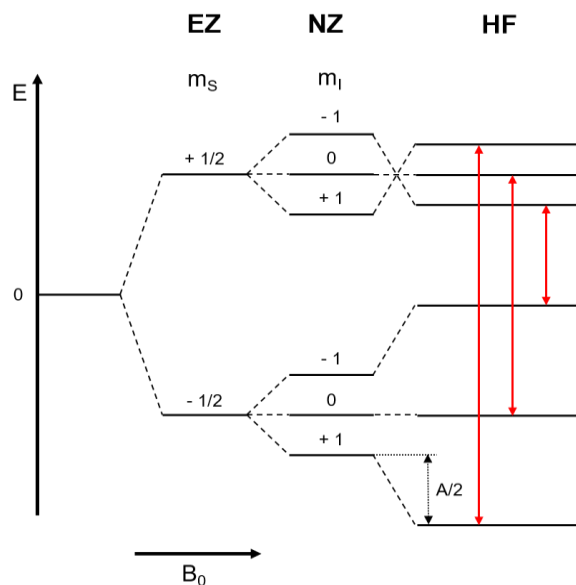


Abbildung 2.4: Energie-Diagramm für ein Spin-System mit $S = 1/2$ und $I = 1$ mit den einzelnen Energiebeiträgen der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung (EZ), Kern-Zeeman-Wechselwirkung (NZ) und Hyperfeinwechselwirkung (HF) (adaptiert von ^[91]).

EPR-Spektren von Nitroxiden sind stark von der chemischen Umgebung abhängig, wodurch eine Vielzahl von Informationen aus den Spektren extrahiert werden können.

Der g -Wert und der A -Wert hängen stark von der Polarität der Umgebung ab, sodass zwischen hydrophilen und hydrophoben Regionen unterschieden werden kann.^[92] In polaren Regionen ist die Hyperfeinkopplung größer als in unpolaren Regionen. Bei ersterem liegt die Sonde bevorzugt als zwitterionische Struktur vor, wodurch sich das ungepaarte Elektron näher am Stickstoff befindet und demnach für eine höhere Aufspaltung sorgt.^[91] Schematisch sind die Strukturen in Abbildung 2.5 gezeigt. In unpolarer Umgebung liegt der g_{xx} -Wert bei leicht geringeren Werten und die Hyperfeinaufspaltung ist geringer. Die Auswirkung beider Effekte ist in Abbildung 2.6 zusammengefasst.

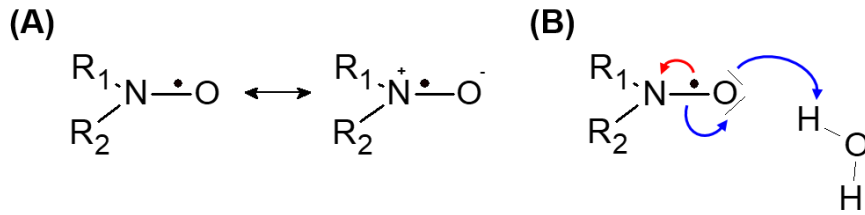


Abbildung 2.5: Einfluss der Polarität auf die Lokalisation des Radikals bei einer Nitroxidsonde. Stabilisation der Zwitterionischen Form in polarer Umgebung (A) und die Abnahme der Spin-Bahn-Kopplung durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (B).

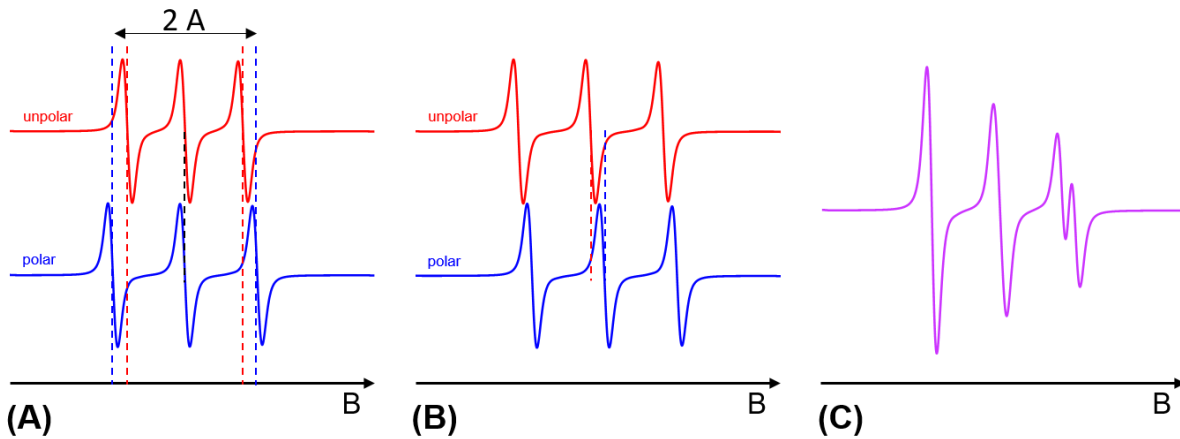


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Einflusses der Polarität auf die Spektrenform. Der Einfluss der Polarität ist in (A) auf die Hyperfeinausplattung und in (B) auf den g-Wert-Änderung bezogen. Eine exemplarische Darstellung für das Auftreten von zwei Komponenten in chemisch unterschiedlicher Umgebung ist in (C) gezeigt.

Weiterhin spiegelt das Spektrum die Rotationsdynamik der Spinsonde wider, welche beispielsweise durch die Viskosität oder die Temperatur beeinflusst wird.^[93] Die Form des Spektrums wird maßgeblich durch die Rotation bestimmt und als Parameter wird die Rotationskorrelationszeit τ_c eingeführt. Diese wird durch die Summe aller Autokorrelationsfunktionen der Wigner Rotationsmatrix^[94] berechnet, welche die Zeitabhängigkeit der Nitroxidorientierung beschreibt. Unter Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung unter der Annahme eines sphärischen Moleküls ergibt Gleichung (2.25).

$$\tau_c = \frac{1}{6D} = \frac{4\pi\eta R_H}{3k_B T} \quad (2.25)$$

Wenn die Rotation der Nitroxidradikale in eine oder mehrere Richtungen gehindert ist, wie beispielsweise durch Labeling, muss diese Abweichung ($D_{xx} \neq D_{yy} \neq D_{zz}$) berücksichtigt werden. Der Diffusionskoeffizient berechnet sich dann nach Gleichung (2.26).

$$D = \sqrt[3]{D_{xx} D_{yy} D_{zz}} \quad (2.26)$$

Für Nitroxidradikale kann weiterhin die Anisotropie T_A nach Gleichung (2.27) bestimmt werden, welche die Rotation der Sonde genauer charakterisiert. Dabei stellt D_{zz} die Rotation parallel und D_{xx} und D_{yy} die Rotation senkrecht zum angelegten Magnetfeld dar.

$$T_A = \frac{D_{zz} - D_{xy}}{D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}} \cong \frac{D_{||} - D_{\perp}}{D_{||} + 2 D_{\perp}} \quad (2.27)$$

Große Werte für die Anisotropie deuten auf einen größeren Unterschied im Rotationsverhalten zwischen den einzelnen Raumrichtungen hin, wohingegen ein kleinerer Wert auf ein isotropes Verhalten hindeutet.^[95,96]

2.1.4. Kupfer als EPR-aktive Spezies

Kupfer kommt in 2 stabilen Isotopen vor: ^{63}Cu mit einer natürlichen Häufigkeit von 69,2% und ^{65}Cu mit einer Häufigkeit von 30,8%. Beide Isotope besitzen einen Kernspin von $I = 3/2$ und einen Elektronenspin von $S = 1/2$. Die Energien der Hyperfeinkopplung beider Isotope können nicht ausreichend aufgetrennt werden aufgrund, von unter anderem, ähnlichen magnetogyrischen Verhältnissen, sodass auch für nicht isotopenreine Kupferproben nach $2I + 1$ ein 4-Linien-Spektrum erhalten wird.

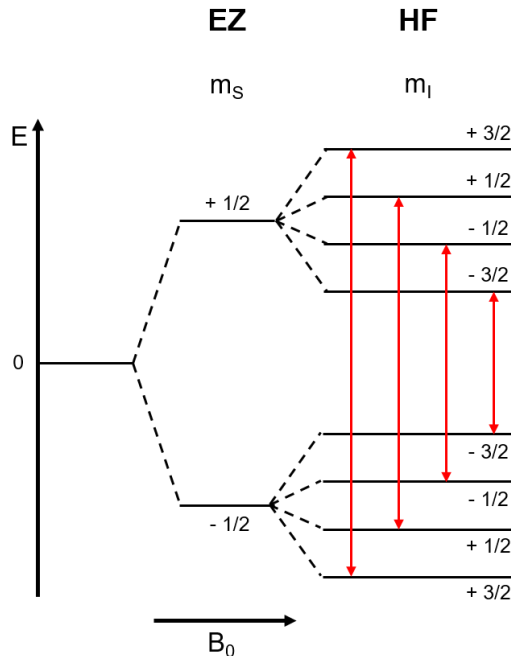


Abbildung 2.7: Energie-Diagramm für ein Spin-System $S = 1/2$ und $I = 3/2$ (adaptiert nach ^[97]).

Kupfer kann auf verschiedene Weisen koordiniert vorliegen: Ein trigonal-planarer oder tetragonaler Kupferkomplex wird auch als Typ 1-Kupferkomplex bezeichnet.^[98] Dieser tritt häufig bei kleinen Proteinen auf und ist durch unterschiedliche g_{xx} und g_{yy} -Werte

gekennzeichnet und ein A_{zz} , welches kleiner 100 G ist.^[99] Weiterhin werden Proteine, welche Kupfer in einer Typ 1-Form koordinieren, auch „blue copper proteins“ genannt, da diese im Bereich von 600 nm Licht stark absorbieren.^[98]

Weiterhin kann Kupfer auch in einer quadratisch-planaren oder oktaedrische Geometrie koordiniert sein, welche als Typ 2-Kupferkomplex bezeichnet werden. Für diesen sind identische g_{xx} und g_{yy} -Werte, identische A_{xx} und A_{yy} -Werte und ein A_{zz} -Wert, welcher meist größer als 140 G ist, charakteristisch.^[99] Für Letzteren ist das Molekülkoordinatensystem in Abbildung 2.8 dargestellt.

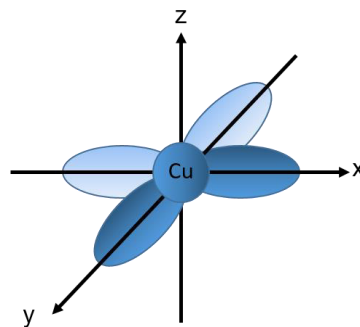


Abbildung 2.8: Orientierung eines Typ2-Kupfer(II)-Komplexes.

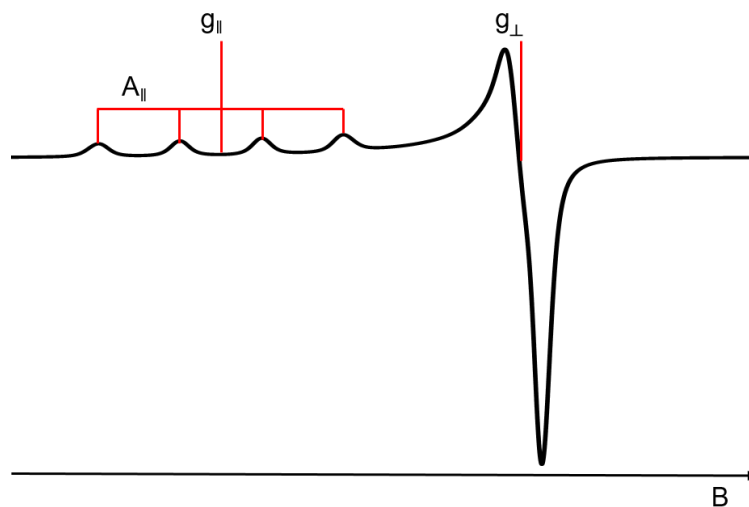


Abbildung 2.9: cw-X-Band-Kupferspektrum eines oktaedrisch-verzerrten Kupfer(II)-Komplexes mit Kennzeichnung des axialen und äquatorialen Bereichs im Spektrum.

Die Achse entlang des externen Magnetfeldes wird auch als parallel (\parallel) gekennzeichnet und die g- und A-Werte entsprechend als g_{\parallel} - und A_{\parallel} -Werte, wobei gilt: $g_{\parallel} = g_{zz}$ und $A_{\parallel} = A_{zz}$. Folglich werden die anderen Achsen auch als senkrecht (\perp) zu dem externen Magnetfeld bezeichnet, wobei $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$ und $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$ die äquatoriale Ebene des Kupferkomplexes darstellt. Für die axiale Orientierung gilt weiterhin $g_{\parallel} > g_{\perp} = g_e$.^[100]

Neben der Geometrie des Kupfers liefert die EPR-Spektroskopie auch Informationen über Liganden. *Peisach* und *Blumberg*^[101] entwickelten eine Auftragung, um von den axialen Parametern g_{\parallel} und A_{\parallel} auf gebundene Liganden schließen zu können, ohne die Elektron-Kern-Superhyperfeinwechselwirkungen oder Simulationen der Spektren berücksichtigen zu müssen.^[102]

2.1.5. Continuous-Wave EPR-Spektrometer

Das einfache EPR-Experiment wird durch eine kontinuierliche Anregung der Probe durch eine Mikrowelle in einem Magnetfeld realisiert, wobei die Abschwächung der Mikrowelle durch eine Probe detektiert wird.^[103] In der EPR ist es üblich, die Mikrowellenfrequenz konstant zu halten und das Magnetfeld zu variieren. Die gebräuchlichste Frequenz ist das X-Band mit einer Frequenz von etwa 9,5 GHz.^[103] Ein schematischer Aufbau eines cw-EPR-Spektrometers ist in Abbildung 2.10 dargestellt.

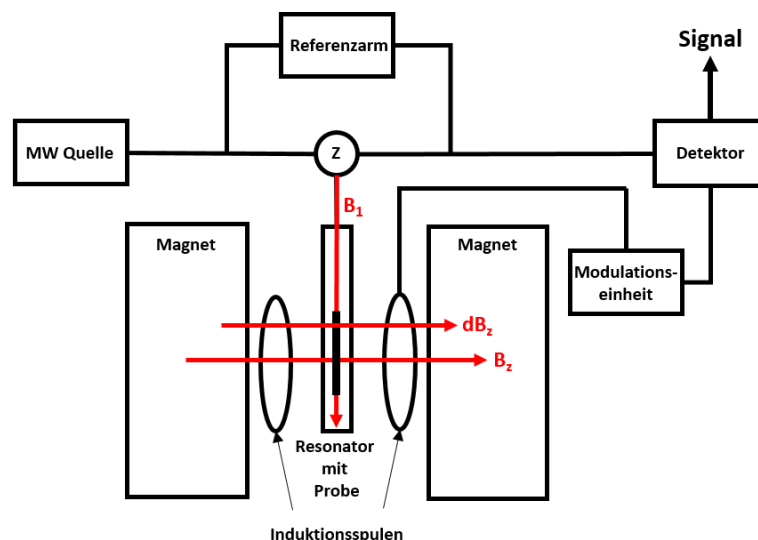


Abbildung 2.10: Schematischer Aufbau eines cw-Spektrometers (adaptiert nach ^[103,104]).

Die Mikrowelle wird in einem Klystron oder einer Gunn-Diode erzeugt und dann durch den Mikrowellenleiter in Richtung des Resonatorraums geleitet. Der Resonator muss vor der Messung abgeglichen werden. Dabei wird die Impedanz des Resonators mit der Mikrowelle so eingestellt, dass keine Mikrowelle durch diesen reflektiert wird und kein Energieaustausch zwischen der Mikrowelle und dem Resonator auftritt.^[103]

Die Probe soll nun in Resonanz gebracht werden, indem das homogene Magnetfeld verändert wird. Sobald gilt, dass die magnetische Energie des Magnetfeldes der der Aufspaltung der Elektronenspins ($\Delta E_{mag} = \Delta E_{str}$) entspricht, findet eine Energieabsorption statt. Die durch

die Probe durch Absorption veränderte Mikrowelle wird in dem Resonator reflektiert und zum Detektor, meist eine Mikrowellendiode, geleitet. Dieser detektiert die Absorption in Abhängigkeit des Magnetfeldes. Messtechnisch wird die reflektierte Mikrowelle durch einen Zirkulator von der eingestrahlten Mikrowelle abgetrennt, da diese sonst keine Änderung an der Diode detektiert werden würde.^[103]

Da durch die thermische Spinpolarisation bei Raumtemperatur nur etwa 0,16 % der Spins zu dem Absorptionssignal beitragen (Anwendung von Gleichung (2.4) für X-Band-Frequenz und Raumtemperatur)^[103,105], muss das Signal verstärkt werden. Dies erfolgt über eine Modulation des Magnetfeldes durch Induktionsspulen. Zu dem Magnetfeld (B_z) wird eine zusätzliche sinusförmige Modulationswelle (δB_z), meist mit einer Frequenz von 100 kHz, senkrecht zu der Mikrowelle und parallel zu dem Magnetfeld addiert. Das hat zur Folge, dass so ein sich zeitlich änderndes Magnetfeld kreiert wird. Dies erhöht die Messempfindlichkeit und das Spektrum wird als Ableitung der Intensität nach dem Magnetfeld aufgezeichnet.^[103,106]

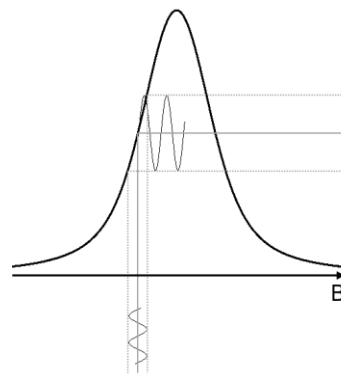


Abbildung 2.11: Signaldetektion durch Verwendung einer Modulationswelle (adaptiert nach ^[106]).

2.1.6. Puls-EPR-Spektroskopie

Neben den cw-EPR-Messungen gibt es auch die Möglichkeit, gepulste EPR-Spektren aufzunehmen. Diese bieten die Möglichkeit durch zeitaufgelöste Messungen Relaxationseffekte zu bestimmen und somit einzelne Wechselwirkungsbeiträge des Spin-Hamilton-Operators zu bestimmen.^[107–109] Spezifische Wechselwirkungen können beispielsweise in ESEEM-Experimenten, in Form von Elektron-Kern-Wechselwirkungen, oder DEER-Experimenten, in Form von Abstandsmessungen durch dipolare Wechselwirkungen, erfasst werden.

2.1.6.1. Elektronenspinecho-detektierte Spektren (ESE)

Die meisten Puls-EPR-Experimente basieren auf der Detektion des Elektronenspin-Echos. Das Spinecho beschreibt das Wiederauftreten der Magnetisierung als ein Echo der ursprünglichen Magnetisierung nach einem Puls oder einer Pulssequenz. Eingeführt wurde die Methode von E. L. Hahn^[110], weshalb die einfachste Pulssequenz zur Messung des Spin-Echos auch als Hahn-Echo bezeichnet wird. Die Pulssequenz ist in Abbildung 2.12 (A) und das zugehörige Vektorschema der Magnetisierung in (B) dargestellt.

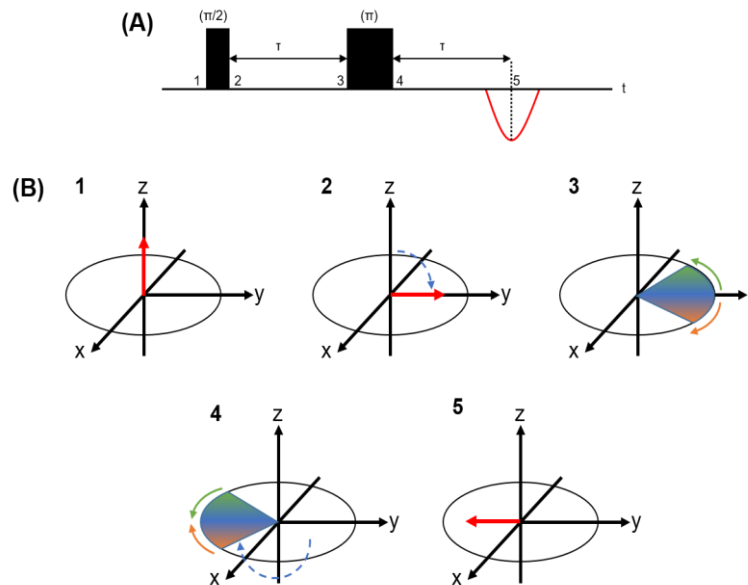


Abbildung 2.12: Pulssequenz zur Entstehung des Primärechos durch die Pulssequenz $(\pi/2)$ - τ - (π) - τ (A) und die Magnetisierung in Vektorschreibweise an verschiedenen Positionen der Sequenz (B).

Zu Beginn des Experimentes erfolgt die Magnetisierung des Elektronenspins durch das externe Magnetfeld entlang der z-Achse, zu sehen in Abbildung 2.12 (1). Durch den $(\pi/2)$ -Puls entlang der x-Achse flippt die Magnetisierung der Spins in die y-Achse (2). Innerhalb der Evolutionszeit τ präzidieren die Spins mit ihrer jeweiligen Larmorfrequenz. Es erfolgt eine Defokussierung (3). Der zweite Puls, ein (π) -Puls, invertiert die phasenverschobenen Spinpakete, wobei die Rotationsrichtung nicht verändert wird (4). In der zweiten Evolutionszeit τ refokussieren die Spinpakete, welche als wieder zunehmende Magnetisierung detektiert werden (5). Das Experiment wird zur Aufnahme von ESE-Spektren mehrfach bei verschiedenen Magnetfeldern wiederholt, wobei die gleiche Pulssequenz und die gleiche Mikrowellenfrequenz verwendet werden. Zu beachten ist, dass durch diese Pulssequenz nur inhomogene Spinpakete refokussiert werden. Die Magnetisierung kann aber auch durch beispielsweise Relaxationsprozesse verloren gehen, das wird hier nicht erfasst.

2.1.6.2. Elektronenspinecho-Enveloppen-Modulationsspektren (ESEEM)

ESEEM-Experimente erlauben Aussagen über die nukleare Hyperfein- und Quadrupolaufspaltung von paramagnetischen Kernen, welche in normalen EPR-Spektren nicht ausreichend aufgelöst werden. In diesen Messungen werden die nuklearen Übergangsfrequenzen über EPR-Übergänge ermittelt. Bei den ESEEM-Experimenten werden die Kernübergänge durch eine Vermischung der Frequenzen von semi-verbotenen und erlaubten EPR-Übergängen erhalten. Damit ist es möglich, schwache Hyperfeinwechselwirkungen von paramagnetischen Kernen mit weiteren Kernen in der Umgebung, aufzulösen.^[111,112]

Bei ESEEM-Messungen werden die Echo-Intensitäten durch eine Reihe von Mikrowellenpulsen erhalten, welche durch Evolutionszeiten separiert werden. Dabei erhält man zunächst die Zeitdomäne des Experimentes. Je nach Art des Experimentes unterscheidet man in ein 2-Puls-ESEEM, bei welchem ein primäres Echo detektiert wird, oder ein 3-Puls-Experiment, bei welchem ein stimuliertes Echo verfolgt wird. Die Pulsabfolge ist in Abbildung 2.13 schematisch gezeigt.

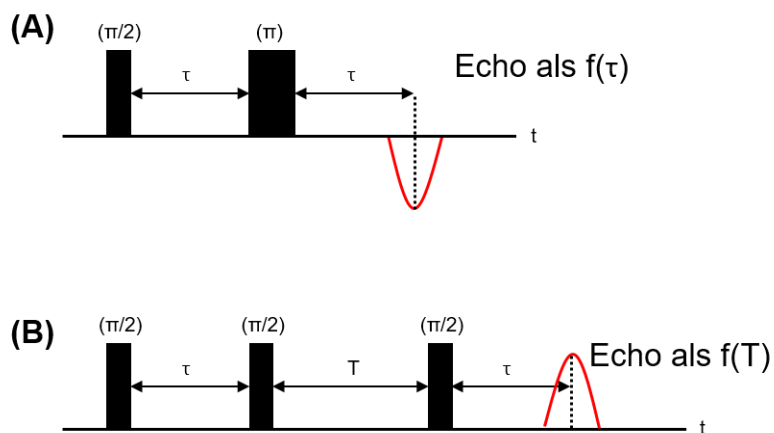


Abbildung 2.13: Pulssequenz eines 2-Puls-ESEEM-Experimentes (A) und eines 3-Puls-ESEEM-Experimentes (B). Bei dem 2-Puls-Experiment wird nach dem $\pi/2$ -Puls nach der Evolutionszeit τ ein π -Puls angewendet. Nach einer weiteren Evolutionszeit τ wird die Echointensität als Funktion von τ bei einem bestimmten Magnetfeld gemessen.

Für ein 3-Puls-Experiment besteht die Pulsfolge aus 3 $\pi/2$ -Pulsen, welche durch die Evolutionszeit τ und die der Zeit T getrennt werden. Nach dem 3. Puls wird nach einer weiteren Evolutionszeit τ die Intensität des stimulierten Echos gemessen. Der erste Puls erzeugt eine Magnetisierung (transversale Magnetisierung) in die xy -Ebene aus der Gleichgewichtsmagnetisierung. Diese dephasieren während der Evolutionszeit τ . Der zweite $\pi/2$ -Puls rotiert

den Magnetisierungsvektor in die xz-Ebene. Der letzte Puls rotiert die Magnetisierung erneut in die xy-Ebene, sodass das Echo detektiert werden kann. Durch den zweiten Puls werden die Kern-Kohärenzen erzeugt, welche nach der Entwicklungszeit T durch den dritten Puls auf die Elektronenspins übertragen werden.^[103,113,111]

Im Gegensatz zu dem 2-Puls-ESEEM-Experiment wird hier die Modulation der Echointensität durch die Kern-Interaktionen in Abhängigkeit der Entwicklungszeit T gemessen und enthält keine Summen- oder Differenzeffekte der Kernfrequenzen. Die Relaxationsprozesse bei einem 3-Puls-Experiment basieren auf der Elektronenspin-Gitter-Relaxationszeit (T_1) und sind deutlich länger als bei dem 2-Puls-Experiment, welches auf der Elektronenspin-Spin-Relaxationszeit (T_2), weshalb es zu einer besseren Frequenzauflösung führt.^[114]

Die erhaltene Zeitdomäne enthält Informationen über die verschiedenen Echomodulationen und die Frequenzen der Modulationen. Um diese in die Frequenzdomäne zu transferieren, müssen die Zeitspuren Fourier-transformiert werden.^[111]

Für ^{14}N -Kerne ist für X-Band-Frequenzen die „exact cancellation“ Bedingung meist erfüllt, indem die Hyperfeinkopplung gleich zweimal der Larmorfrequenz des Kernes ist ($A_{iso} = 2\nu_I$) sodass die ^{14}N -Superhyperfeinwechselwirkung in Form von drei schmalen Linien im Bereich zwischen 0-2 MHz erscheint.^[111,113,115] Die Kern-Zeeman-Interaktion und die Elektron-Kern-Hyperfeininteraktion heben sich auf, sodass die Aufspaltung nur durch ^{14}N -Quadrupolinteraktionen hervorgerufen wird.

Für die drei Frequenzlinien gelten die Zusammenhänge von Gleichung (2.28) bis (2.30), wobei κ die Quadrupolkopplungskonstante und η den Asymmetrieparameter darstellt.^[116] Letzterer beschreibt, in wie weit der elektrische Feldgradient von der axialen Symmetrie abweicht.

$$\nu_+ = \kappa(3 + \eta) \quad (2.28)$$

$$\nu_- = \kappa(3 - \eta) \quad (2.29)$$

$$\nu_0 = 2\kappa\eta \quad (2.30)$$

Die Symmetrie der Ladungsverteilung des Kernes wird durch den elektrischen Feldgradienten beschrieben, welche von der Art der Bindung abhängig ist. Daher können die Quadrupolkopplungsparameter für ^{14}N für eine nähere Beschreibung der Umgebung des Stickstoffkernes genutzt werden, da diese sensitiv für die entsprechende Umgebung des Kernes sind. Damit sind auch Aussagen über die strukturelle Umgebung des ungepaarten Elektrons durch stickstoffhaltige Aminosäureseitenketten möglich.^[116]

2.2. Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Methode um die Größe, Größenverteilungen und auch die Form von Nanopartikeln bestimmen zu können.^[117] Die Bestimmung erfolgt über den hydrodynamischen Radius R_H , welcher als Radius einer hypothetischen sphärischen, harten Kugel angenommen werden kann, welche sich mit dergleichen Geschwindigkeit bewegt wie das Partikel.^[118,119] In der DLS wird das von Makromolekülen oder Partikeln gestreute Licht zeitabhängig gemessen. Dafür wird eine Probe mit einem monochromatischen Lichtstrahl bestrahlt. Alle Moleküle in Lösung folgen der Brown'schen Molekularbewegung. Diese ist abhängig von der Temperatur, der Viskosität und von der Größe der Partikel, weshalb sich kleine Partikel schneller in der Lösung bewegen als große Partikel.^[118,120] Weiterhin ist diese Bewegung dafür verantwortlich, dass das gestreute Licht der Partikel, über einen bestimmten Zeitraum gemessen, fluktuiert. Die Fluktuation des detektierten Streulichtes entsteht durch die Interferenz verschiedener Streulichtzentren, hier die Partikel, welche durch die verschiedenen Positionen des Teilchens zu verschiedenen Zeitpunkten induziert werden.

Für die Berechnung der Größenverteilungen wird die Autokorrelation verwendet. Diese ergibt sich aus den detektierten Streuintensitäten. Dafür wird die Streuintensität $\langle I(t) \rangle$ zum Zeitpunkt t mit der Streuintensität $\langle I(t + \tau) \rangle$ zum Zeitpunkt $(t + \tau)$ verglichen, wobei τ die Korrelationszeit beschreibt. Je kleiner τ ist, desto besser wird die Streuintensität $\langle I(t) \rangle$ mit der Streuintensität $\langle I(t + \tau) \rangle$ übereinstimmen, was einen hohen Korrelationswert zwischen beiden Intensitätszeitpunkten bedeutet. Das Partikel in der Probe besitzt dann eine große Übereinstimmung zwischen den beiden Positionen. Je größer τ wird, desto geringer wird die Übereinstimmung zwischen $\langle I(t) \rangle$ und $\langle I(t + \tau) \rangle$. Die mathematische Definition der Autokorrelation der Streuintensitäten, $G_2(\tau)$, ist in Gleichung (2.31) gezeigt, wobei t_M die Messdauer darstellt.

$$G_2(\tau) = \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle = \lim_{t_M \rightarrow \infty} \frac{1}{t_M} \int_{t=0}^{t_M} I(t) \cdot I(t + \tau) dt \quad (2.31)$$

Die normalisierte Intensitätsautokorrelationsfunktion $g_2(\tau)$ ergibt sich durch Division der mittleren quadrierten Streuintensität.

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t)^2 \rangle} \quad (2.32)$$

Neben der Intensität kann auch die Amplitude des elektrischen Feldvektors \vec{E} verwendet werden. Die Feldautokorrelationsfunktion $g_1(\tau)$ hängt über die Siegert-Relation^[118] direkt mit

der Intensitätsautokorrelationsfunktion $g_2(\tau)$ zusammen, wobei B die Basislinie und β den Kohärenzfaktor darstellt, welcher von den Streueigenschaften des Moleküls und dem Geräteaufbau abhängt.^[118,119]

$$g_2(\tau) = B + \beta |g_1(\tau)|^2 \quad (2.33)$$

Für monodisperse Partikel zeigt der Verlauf der Feldautokorrelationsfunktion einen exponentiellen Abfall, welcher von der Zerfallskonstanten Γ abhängig ist.

$$g_1(\tau) = e^{-\Gamma\tau} \quad (2.34)$$

Da es sich bei proteinhaltigen Proben selten um monodisperse Systeme handelt, muss für ein polydisperses System das intensitätsgewichtete Integral über alle Zerfallsraten $G(\Gamma)$ gebildet werden.

$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) \cdot e^{-\Gamma\tau} d\Gamma \quad (2.35)$$

Die Zerfallskonstante steht über Gleichung (2.36) in direktem Zusammenhang mit dem Diffusionsverhalten von Partikeln.

$$\Gamma = Dq^2 \quad (2.36)$$

Aus dem Zusammenhang der Stokes-Einstein-Gleichung kann der hydrodynamische Radius R_H aus dem translationalen Diffusionskoeffizienten D berechnet werden.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (2.37)$$

Die Berechnung der Partikelgröße erfolgt über Anpassung einer Funktion an die Autokorrelationsfunktion. Für eine monomodale Verteilung der Partikelgröße wird häufig die Kumulantenanalyse genutzt, welche jedoch ausschließlich für gaußartige Verteilungen genutzt werden kann.^[118,119] Für polydisperse Proben, wie zumeist biologische Proben, muss eine Anpassung gewählt werden, welche die Verteilung der Diffusionseigenschaften verschiedener Partikel berücksichtigt.^[118] In dieser Arbeit wurde dafür der CONTIN-Algorithmus genutzt, welcher eine inverse Laplace-Transformation zur Anpassung nutzt.^[121] Dynamische Lichtstreuung wird neben der Bestimmung der Partikelgröße auch für viele biologische Anwendungen genutzt. Dazu zählt die Bestimmung des Aggregationsverhaltens von Proteinen^[118], die Analyse der Protein Interaktion mit anderen Biomolekülen^[118], wie RNA/DNA oder anderen Proteinen, oder zur Abschätzung der Exzentrizität von Partikeln in Lösung^[96]. Weiterführend kann die dynamische Lichtstreuung auch genutzt werden, um die Denaturierung von Proteinen in Lösung zu verfolgen.^[122]

2.3. UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

Durch die Absorption von Photonen werden Valenzelektronen vom Grundzustand (S_0) in einen der angeregten Zustände (S_i) angehoben. Das Elektron besetzt ein energetisch höheres Orbital. Es handelt sich dabei jedoch um einen metastabilen Zustand. Die Abgabe der Überschussenergie kann durch verschiedene strahlende und strahlungslose Prozesse erfolgen. Die Prozesse können vereinfacht in dem Jablonski-Termschema, siehe auch Abbildung 2.14, zusammengefasst werden.

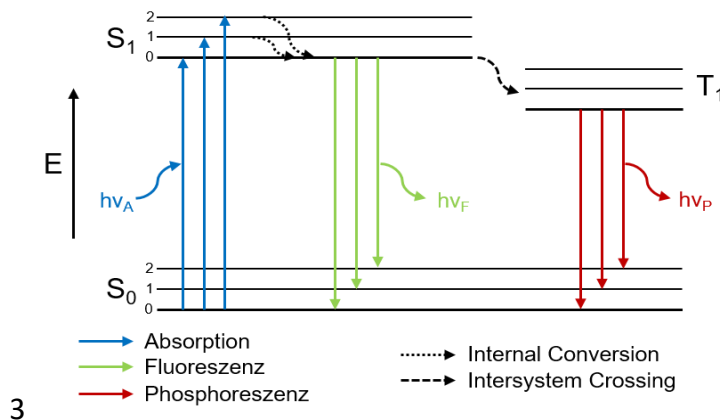


Abbildung 2.14: Jablonski-Termschema zur Verdeutlichung von Prozessen mit Photonenabsorption und Photonenemission (adaptiert von ^[123]).

Der elektronische Übergang vom Grundzustand in elektronisch angeregte Zustände durch Photonenabsorption erfolgt innerhalb sehr kurzer Zeitspannen im Bereich von etwa 10^{-15} s, sodass sich der Kernabstand bei dem Elektronenübergang nicht ändert.^[123]

Das angeregte Elektron gelangt von den höheren vibratorischen Schwingungsniveaus durch strahlungslose interne Konversion in den Grundzustand des ersten elektronisch angeregten Schwingungszustandes ($S_{1,0}$). Dies erfolgt innerhalb von etwa 10^{-12} s oder weniger.^[123] Die Rückkehr in den Grundzustand kann durch Emission von Fluoreszenz, durch strahlungslose Desaktivierung oder durch Phosphoreszenz erfolgen. Nachfolgend soll ausschließlich auf die Fluoreszenz eingegangen werden. Die Fluoreszenz findet ausschließlich von dem Nullpunktschwingungsniveau ($S_{1,0}$) statt. Da die Lichtemission deutlich langsamer verläuft als die elektronischen und vibratorischen Relaxationen, sammeln sich die Population der angeregten Moleküle in diesem Zustand. Von dort finden die Fluoreszenzübergänge in die vibratorischen Niveaus des Grundzustandes statt, sodass ein Fluoreszenzspektrum als Abbild der elektronischen-vibratorischen Energieniveaus des Grundzustandes auffassen kann. In Gegensatz dazu kann das Absorptionsspektrum als Abbild der elektronischen-vibratorischen Energieniveaus der angeregten Zustände verstanden werden. Neben der Fluoreszenz gibt es

noch die Möglichkeit, dass die Energie aus dem S_1 -Zustand durch strahlungslose Spin-Umkehr-Prozesse in Triplet-Zustände überführt werden können. Erfolgt dann die Rückkehr in den Grundzustand S_0 durch Emission von Licht, wird dies als Phosphoreszenz bezeichnet. Alternativ kann es auch strahlungslos durch einen weiteren Spin-Umkehr-Prozess erfolgen. Es handelt sich bei der Spinumkehr von Singulettzuständen zu Tripletzuständen um verbotene Übergänge nach der Spinauswahlregel, sodass die Übergangswahrscheinlichkeiten sehr viel kleiner, aber auch sehr viel langlebiger sind als bei der Fluoreszenz.^[123,124]

Im Allgemeinen ist es nötig, Fluorophore in biologische Systeme, wie beispielsweise Membranen, Lipidmische, Saccharide, Oligonukleotide oder Proteinen einzubringen. Dies erfolgt über Labeling der Substanz mit einem Fluorophor. Dies hat häufig zur Folge, dass sich aufgrund der kovalenten Bindung des Fluorophors die strukturellen und funktionalen Eigenschaften der Probe ändern.^[125] Um dies zu vermeiden, kann bei Proteinen auf die intrinsische Fluoreszenz von aromatischen Aminosäuren zurückgegriffen werden. Dabei sticht vor allem Tryptophan heraus, welche nur eine natürliche Häufigkeit von etwa 1,1 % bei löslichen, cytoplasmatischen Proteinen besitzt.^[126] Die Indolgruppe absorbiert bei etwa 280 nm und emittiert im Bereich von 340 nm. Das Emissionspektrum ist dabei stark von der Polarität der Umgebung abhängig. Im gefalteten Zustand des Proteins, also einer bevorzugt hydrophoben Umgebung, findet eine Blauverschiebung zu geringeren Wellenlängen statt, wohingegen im ungefalteten oder denaturierten Zustand eine Rotverschiebung zu größeren Wellenlängen auftritt.^[123] Neben Tryptophan können auch die Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin als intrinsische Fluorophore genutzt werden. Phenylalanin wird durch seine geringe Quantenausbeute nur beobachtet, wenn keine der anderen aromatischen Aminosäuren anwesend sind. Tyrosin hat eine ähnliche Quantenausbeute wie Tryptophan, die Emission wird jedoch durch Interaktionen mit der Peptidkette oder durch Energietransfer auf Tryptophan gequencht.^[123] Generell kann das Quenching von Fluoreszenz durch zwei Prozesse beschrieben werden: das statische und das dynamische Quenching. Bei dem statischen Quenching bilden das Quenchemolekül und das Fluorophor einen Komplex, welcher eine verringerte Fluoreszenz aufweist als das Fluorophor alleine. Bei dem dynamischen Quenching wird die Energie des angeregten Fluorophors auf das Quenchemolekül übertragen. Dabei findet die Energieabgabe in Form von Wärme und nicht von emittiertem Licht statt. Ursächlich für Quenching der Tryptophanfluoreszenz sind neben Ionen und Molekülen, wie Iodid, Kupfer(II), Acrylamid oder Natriumdodecylsulfat^[123,127–129], auch Teile des Proteins sein.

Asparaginsäure und Glutaminsäure fungieren in ihrer neutralen Form, Lysin und Arginin in ihrer geladenen Form als Quenchingmoleküle. Auch Histidin kann bei geringem pH-Wert durch Bildung von π -Stapelkomplexen mit der Indolgruppe zum Quenching beitragen.^[129]

3. Auswertung und Diskussion

3.1. Aufreinigung und allgemeine Charakterisierung des HPRGs

3.1.1. Affinitätschromatographie

Der erste Schritt der Aufreinigung ist an *Patel et al.*^[71] angelehnt. Die Grundlage für die Aufreinigung stellt eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) dar. Diese basiert auf der unterschiedlichen Affinität von Proteinen und Aminosäuren zu Metallionen.^[130] Die Aminosäuren, welche sich an der Proteinoberfläche befinden, werden von meist zweiwertigen Metallionen, wie Kupfer(II), Cobalt(II) oder Nickel(II), gebunden und mit einem Salzgradienten oder pH-Gradienten eluiert.^[130] Bei den bindenden Aminosäuren handelt es sich hauptsächlich um die Imidazolgruppe des Histidins und die Thiolgruppe des Cysteins^[130,131], wobei letztere aber meist in Form von Disulfidbrückenbindungen kovalent gebunden sind.

Das Säulenmaterial besteht häufig aus einem Agarosematerial, welches kovalent einen Metallion-chelatisierenden Liganden gebunden hat.^[132] Dieser bindet, je nach Art des Liganden über drei bis fünf Bindungspositionen die entsprechenden Metallionen. Folglich können noch ein bis drei Aminosäurereste pro Metallion gebunden werden. Für Nickel-NTA ist die Bindung in Abbildung 3.1 schematisch gezeigt. NTA bindet über vier Bindungspositionen das Metallion, hier Nickel, sodass das Protein über zwei Bindungspositionen an das Säulenmaterial koordinieren kann.

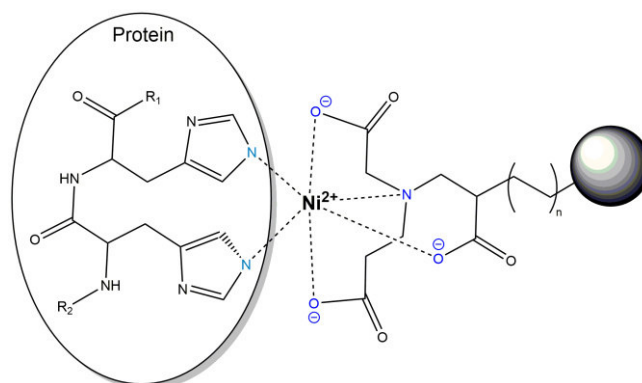


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Bindung der Histidin-Seitenketten an eine mit Nickel beladene Affinitätssäule (adaptiert nach^[133]).

Normalerweise werden IMACs für, mit einem His-Tag versehene, rekombinant hergestellte Proteine genutzt. Da HPRG jedoch über sehr viele Histidine verfügt, welche auch noch vorrangig in der intrinsisch ungeordneten Histidin-reichen Region vorkommen, kann dies als natürlicher His-Tag aufgefasst werden.^[134] In dieser Arbeit wurde mit Cobalt(II) als Metallion

gearbeitet, da in vielen Fällen Proteine spezifischer bindet als Nickel(II).^[130,135] Trotz der höheren Spezifität konnte das HPRG in diesem Schritt nur mit Albumin co-aufgereinigt werden.^[134,25]

Die Aufreinigung erfolgte mit einer „HiTrap TALON Crude“ Säule der Firma Cytiva, welche mit dem „TALON Superflow“ Medium gepackt sind. Dieses besteht aus einem Agarosematerial mit einem vierzähligen kovalent gebundenen Liganden, welcher mit Cobalt beladen ist.^[135] Die ausführliche Beschreibung des Aufreinigungsprozesses kann in Kapitel 5.2 nachgelesen werden. Nach Beladen der Säule mit Kaninchenserum erfolgte die Elution von unspezifisch gebundenen Proteinen mit einem imidazolhaltigen Puffer. Durch die strukturelle Ähnlichkeit von Imidazol und Histidin verdrängt das Imidazol das Histidin von den zweiwertigen Cobaltionen und das Protein eluiert von der Säule.^[136] Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

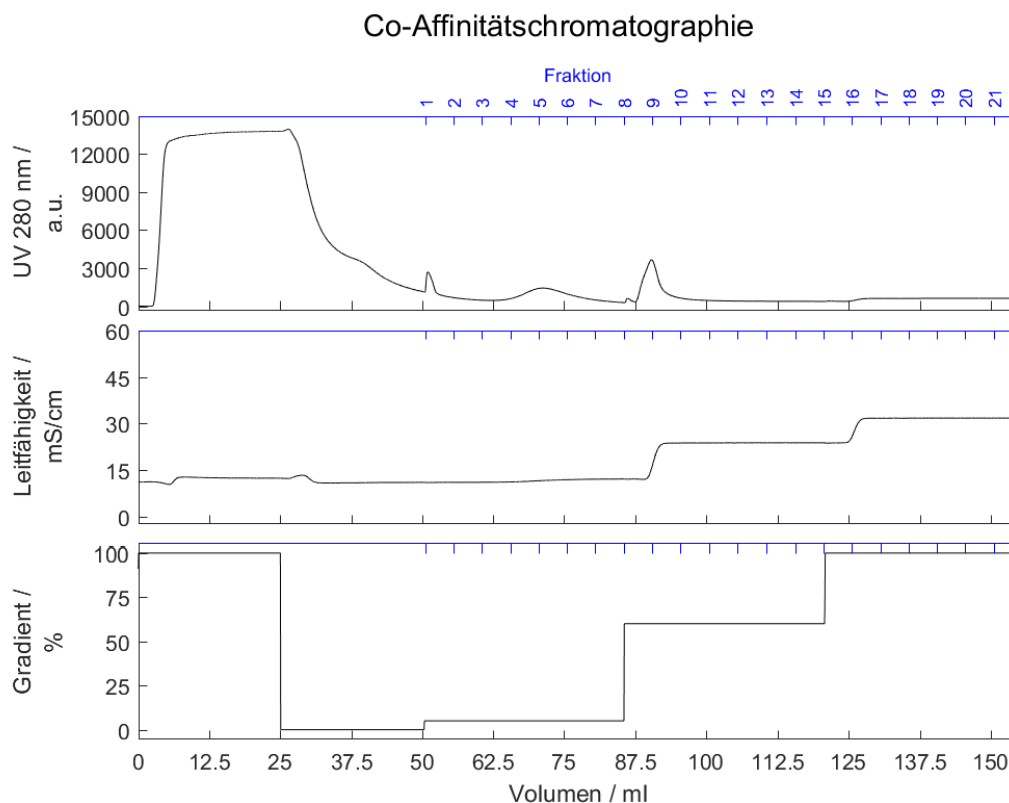


Abbildung 3.2: Elutionsprofil der Aufreinigung mittels Co(II)-Affinitätschromatographie und Elution mit einem Imidazolhaltigen Puffer.

Die eluierten Fraktionen wurden auf einem SDS-PAGE-Gel auf Proteingehalt und Reinheit des Proteins überprüft. Dabei wurden keine reduzierenden Reagenzien, wie DTT, oder eine thermische Reduktion der Disulfidbrückenbindungen verwendet. Dies bietet den Vorteil, dass Albumin, als größte Kontaminante, und HPRG auf dem Gel getrennt werden können,

wohingegen bei reduzierenden Bedingungen die Banden beider Proteine aufgrund der Entfaltung höherer Strukturen sehr nahe beieinanderliegen. Weiterhin binden Glykoproteine weniger SDS durch ihren hohen Zuckeranteil, weshalb diese generell etwas langsamer wandern als Proteine ohne Glykosilierung gleicher Masse.^[137] Das SDS-PAGE-Gel bei nicht reduzierenden Bedingungen ist in Abbildung 3.3 gezeigt.

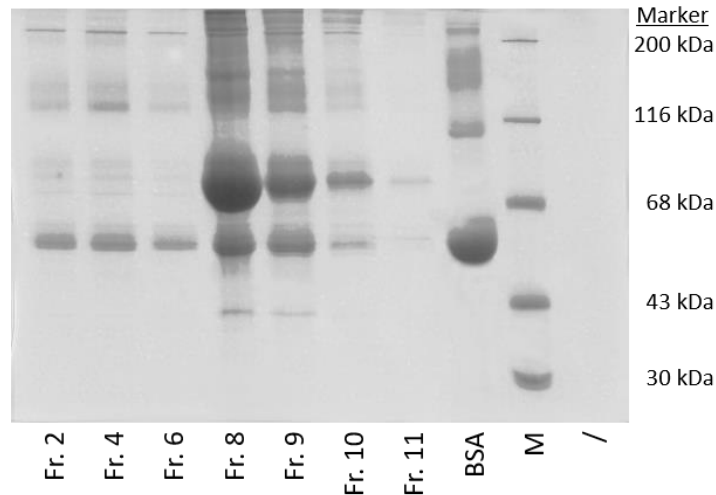


Abbildung 3.3: SDS-PAGE mit einem 10 % Trenngel unter nicht-reduzierenden Bedingungen der Fraktionen der Co(II)-Affinitätschromatographie mit Marker (M) und bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenz.

Als Referenz wurde neben dem Marker auch eine BSA-Lösung aufgegeben. Man erkennt anhand der UV-Detektion bei 280 nm in Abbildung 3.2, dass in den Fraktionen 2 bis 6 vorrangig Proteine von der Säule eluiert werden, welche auf dem Gel als vorrangig Albumin identifiziert werden konnten. Bei Erhöhung des Gradienten auf 60% eluiert in den Fraktionen 8 und 9 ein scharfer Peak, welcher auf dem Gel als Proteingemisch identifiziert werden konnte. Neben einer größeren Menge eines Proteins, welches nach dem Marker eine molekulare Masse von etwa 80-85 kDa besitzt und demnach vermutlich zu HPRG gehört, wird auch noch Albumin eluiert. Auch Anpassungen des Gradienten konnte keine vollständige Separation der beiden Proteine erzielen.

3.1.2. Kationenaustauschchromatographie

Da ein einzelner Chromatographieschritt nicht ausreicht, um HPRG vollständig von anderen Proteinen zu isolieren, muss noch ein weiterer Reinigungsschritt ergänzt werden. Hierfür wurde eine Ionenaustauschchromatographie gewählt, wie es auch schon von *Patel et al.*^[71] durch Verwendung eines Anionenaustauschers etabliert wurde. Jedoch fanden *Colwell et al.*^[72] heraus, dass zwar ein Großteil der Kontaminanten entfernt werden konnten, dennoch kein

reines Protein erhalten werden konnte. Eigene Messungen, zu sehen in Kapitel A.1.1, bestätigten diese Aussage.

Grundsätzlich basiert das Prinzip des Ionenaustausches auf der unterschiedlichen Ladung des Proteins bei unterschiedlichen pH-Werten.^[138,139] Diese entstehen durch die Ladung der Seitenketten der Aminosäuren, wobei Lysin, Arginin und Histidin eine positive Ladung bei physiologischem pH-Wert ausweisen, wohingegen Asparaginsäure und Glutaminsäure eine negative Ladung beitragen.^[140] Der pH-Wert, bei welchem die Nettoladung des Proteins null ist, wird auch als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet.^[141]

Bei pH-Werten, die kleiner als der isoelektrische Punkt sind, wird das Protein positiv geladen sein und an negativ geladene Materialien binden. Bei pH-Werten, die größer als der isoelektrische Punkt sind, gilt der entsprechend umgekehrte Fall: Das Protein ist negativ geladen und bindet an positiv geladene Materialien.^[142,143] Schematisch ist das Ladungs-pH-Diagramm für die Proteine HPRG und Albumin in Abbildung 3.4 gezeigt.

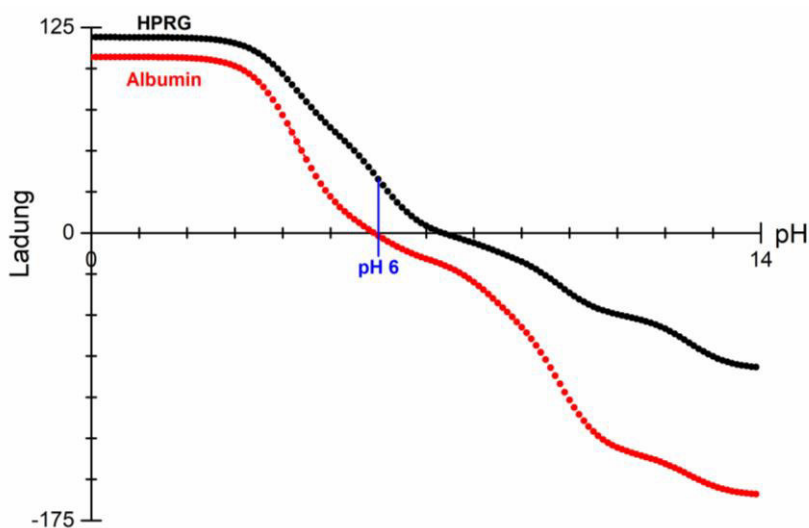


Abbildung 3.4: Ladungs-pH-Diagramm für HPRG und Albumin. Die Kurven wurden mithilfe von des Webtools ProtPi v2.2 (<https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool>) für die Proteinsequenzen von HPRG (UniProtKB - G1U754) und Albumin (UniProtKB - P49065) berechnet. Dabei wurden auch die fünf N-Glykosilierungen des HPRGs mit in die Kalkulation miteinbezogen.

Das Säulenmaterial besteht aus einer Matrix, an welche geladene Liganden gebunden sind oder direkt aus geladenen Polymeren.^[142] An diese können die Proteine binden, vorausgesetzt, sie tragen eine Ladung. Die Elution erfolgt entweder durch einen Salzgradienten, meist einen Natriumchlorid-Gradienten, oder ein pH-Gradienten.

Für die Aufreinigung des HPRGs wurde der Kationenaustauscher „SP Sepharose FF“ gewählt. Dieser besteht aus einer Agarosematrix, an welcher negativ geladene Sulfopropylgruppen gebunden sind.^[140,144] Als Puffer wurde ein Phosphatpuffer pH 6 gewählt und die Elution

erfolgte mit einem linearen Natriumchlorid-Salzgradienten. Der isoelektrische Punkt des HPRGs liegt bei etwa 7,2 bis 7,4, wohingegen der pI von Albumin im Bereich von 5,8 bis 6,2, teilweise wird sogar mit 6,4^[145] angegeben, liegt^a. Der pH-Wert des Puffers soll um 0,5 bis 1,5 pH-Einheiten geringer sein als der pI des zu isolierenden Proteins.^[146] Durch die geringe Ladung des Albumins bei pH 6 von -1,6, sollte Albumin nicht an den Kationenaustauscher binden bzw. bei sehr viel geringen Salzkonzentrationen eluieren als HPRG, welches eine Ladung von etwa +33 hat und entsprechend stark an den Kationentauscher gebunden sein sollte. Folglich sind hohe Salzkonzentrationen für die Elution nötig. Das Elutionsprofil der HPRG-enthaltenen Fraktionen der Cobalt(II)-Affinitätssäule ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

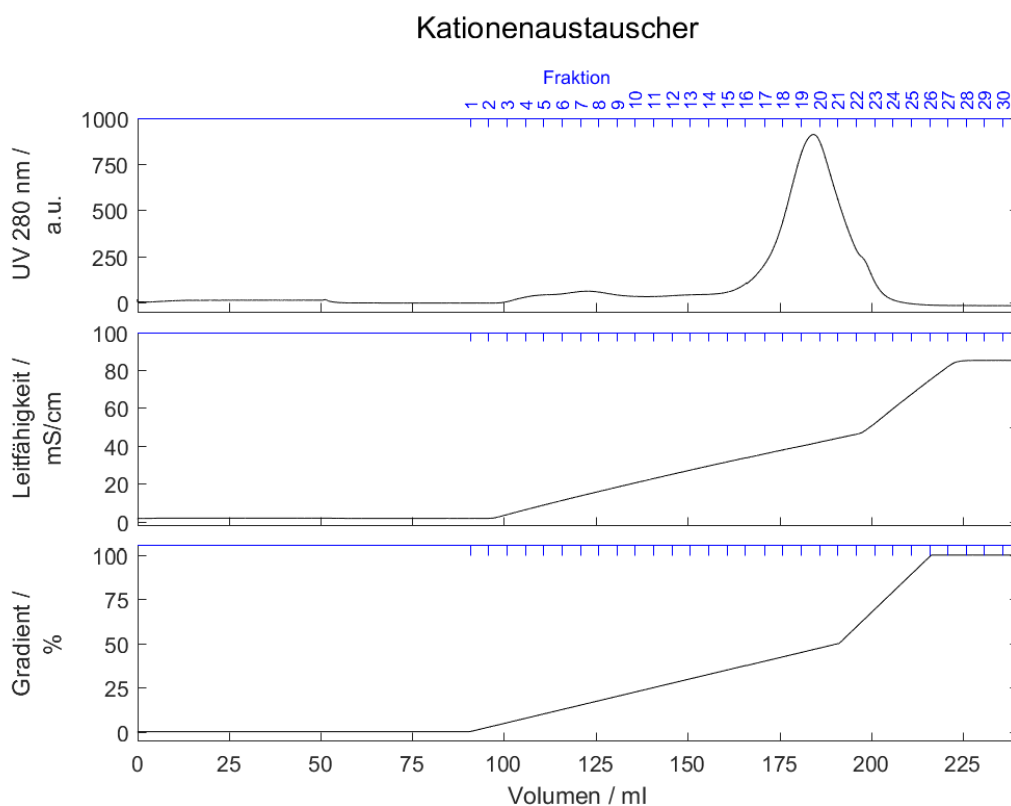


Abbildung 3.5: Elutionsprofil der Aufreinigung mittels Kationenaustauscher und Elution mit einem Natriumchlorid-Salzgradienten.

Man erkennt anhand der UV-Detektion, dass im Bereich von 0 bis 50 ml nur sehr wenig Protein nicht von dem Tauscher gebunden wird, wodurch auch in dem nachfolgenden Waschschrift

^a Die Ladungen bei den verschiedenen pH-Werten wurden durch Kalkulationen auf den Webseiten Protein Calculator v3.4 (<http://protcalc.sourceforge.net>), ExPASy (https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool) und ProtPi v2.2 (<https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool>) für die Sequenz von rbHPRG (UniProtKB - G1U754) und RSA (UniProtKB - P49065) erhalten. Zu beachten ist dabei, dass die Berechnung nur für die Aminosäuresequenz durchgeführt werden kann, ohne Beachtung der Proteinkonformationen. Daher sind die angegebenen Werte als Richtwert zu verstehen.

kein unspezifisch gebundenes Protein eluiert. Sobald der Salzgradient angelegt wird, eluiert ein breiter Proteinpeak, welcher auf den Gelen in Abbildung 3.6 als Albuminfraktionen identifiziert werden konnte. Ab Fraktion 15 beginnt HPRG von der Säule zu eluieren, was einer Salzkonzentration von 350 mM entspricht. Da hier jedoch noch eine Verunreinigung als schmale Bande auf dem Gel auf Höhe der BSA-Referenz zu erkennen ist, scheint es noch eine Mischfraktion aus beiden Proteinen zu sein. Ab Fraktion 17 ist keine Kontaminante mehr zu identifizieren, weshalb von einem isoelektrisch reinen Protein ausgegangen wird. Die Gelbande des HPRGs ist sehr breit, was aufgrund des Glykosilierungsgrades typisch für Glykoproteine ist. Weiterhin ist sowohl in der UV-Intensität des Elutionsprofils, als auch an der Intensität der Gelbande zu erkennen, dass eine große Menge HPRG über einen breiten Fraktionsbereich eluiert werden kann.

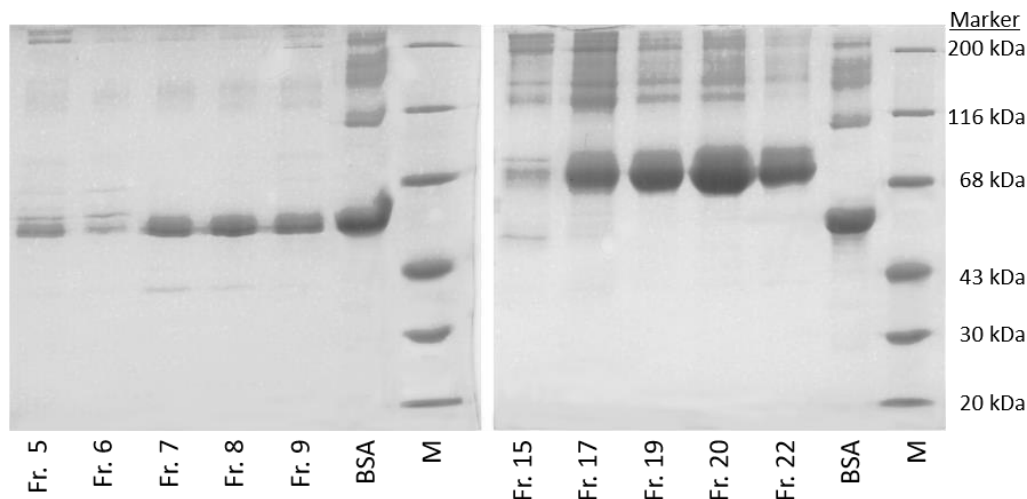


Abbildung 3.6: SDS-PAGE mit einem 10 % Trenngel unter nicht-reduzierenden Bedingungen der Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie mit Marker (M) und bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenz.

3.1.3. Reinheit des isolierten Proteins

Die Reinheit des Proteins über die verschiedenen Aufreinigungsschritte ist in Abbildung 3.7 gezeigt. Aufgrund von Vereinigung mehrerer Fraktionen der vorher beschriebenen Aufreinigung können die Bandenintensitäten in dieser Abbildung im Vergleich zu den vorherigen variieren.

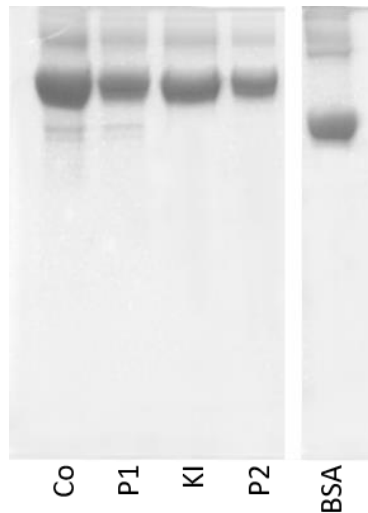


Abbildung 3.7: SDS-PAGE mit einem 12 % Trenngel unter nicht-reduzierenden Bedingungen der einzelnen Aufreinigungsschritte. Co- vereinigte Fraktionen (Fr. 8-10) der Co-Affinitätschromatographie, welche HPRG enthalten; P1 – Puffertausch in den Startpuffer für den Kationenaustauscher; KI - vereinigte Fraktionen (Fr. 17-22) des Kationenaustauschers, welche HPRG enthalten; P2 – Puffertausch in Wasser zur Lyophilisation.

Man erkennt, dass nach der Co(II)-Affinitätschromatographie neben der starken HPRG-Bande noch eine andere Bande unterhalb zu erkennen ist, welche durch den Vergleich mit der BSA-Referenz Albumin zugeordnet werden kann. Diese Verunreinigung bleibt auch nach dem Puffertausch in den Startpuffer für den Kationenaustausch erhalten. Nach der Kationenaustauschchromatographie ist diese Bande nicht mehr zu erkennen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Verunreinigung insofern eliminiert werden konnte, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze von < 30 ng/Protein der SDS-PAGE, angefärbt mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue G250^[147], liegt.

Zur genaueren Bestimmung der Reinheit der Probe wurde eine Massenspektrometrie von der Arbeitsgruppe Carla Schmidt (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Diese ergab für die vereinigten Fraktionen nach der Kationenaustauschchromatographie einen Anteil von etwa 92 % HPRG und einen Anteil von etwa 3 % Albumin in der Probe. Der restliche Anteil setzt sich aus verschiedenen Minorkontaminanten durch weitere Proteine zusammen. Dabei wurden diese jeweils in Anteilen deutlich unter einem Prozent gefunden.

3.1.4. Quantifizierung der Aufreinigung

Die Quantifizierung erfolgt über den BCA-Test. Die entsprechende Durchführung ist in Kapitel 5.4 beschrieben. Die Kalibrierung mit einem bovinen Albumin-Standard wurde in Doppelbestimmung und die Probenmessungen in 4-fach-Bestimmung bei unterschiedlichen

Verdünnungen durchgeführt. Die mittleren Ergebnisse mit den Standardabweichungen nach den einzelnen Aufreinigungsschritten sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Quantifizierung der Aufreinigungsmethode über den BCA-Test. Alle Angaben auf die Isolation aus 25 ml Kaninchenserum bezogen.

	Proteinmenge	Abweichung	prozentuale Ausbeute nach ^[6]
Ausgang: Serum	1472,29 mg	29,26 mg	6543,94 ± 130,06 %
Co(II)-Affinitätschromatographie	12,46 mg	0,54 mg	55,56 ± 2,41 %
Kationenaustauscherchromatographie und Puffertausch	9,99 mg	0,07 mg	44,39 ± 0,32 %

In dem verwendeten Kaninchenserum betrug die Gesamtmenge an Protein etwa $(1,47 \pm 0,03)$ g/25 ml, was etwa der 65-fachen Menge an maximal möglichem HPRG entspricht. Da bei dem BCA-Test alle Proteine in der Lösung erfasst werden und der Test nicht spezifisch für ein bestimmtes Protein ist, ist diese Abweichung nicht überraschend, da alle Serumproteine ermittelt werden.

Nach der Co(II)-Affinitätschromatographie befinden sich lediglich noch $(12,46 \pm 0,54)$ mg Protein in Lösung, bezogen auf die Isolation aus 25 ml Serum. Die SDS-PAGE-Gele zeigten jedoch, dass neben HPRG auch noch weitere Proteine als Kontaminante in den Fraktionen erhalten waren, sodass davon ausgegangen werden kann, dass neben HPRG auch noch eine Reihe weiterer Serumproteine quantifiziert wurde. Nach dem anschließendem Umpufferungsschritt für die Kationenaustauschchromatographie wurde keine Quantifizierung durchgeführt, da dabei kein Protein abgetrennt werden sollte.

Nach der Kationenaustauschchromatographie und dem Puffertausch wurden nur noch $(9,99 \pm 0,07)$ mg Protein ermittelt. Damit wurden noch einmal etwa 20 % von Proteinen in Bezug zu der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie abgetrennt. Die erhaltenen, vereinigten Proteinfractionen konnte anhand der Gelelektrophorese als „rein“ beurteilt werden.

Als Resultat ergibt sich, dass etwa 44 % des im Kaninchenserum erhaltenen Serums bei der Aufreinigung isoliert wurden, wenn von einer Gesamtmenge von rbHPRG von 900 mg/l^[6] ausgegangen wird.

Vermutlich liegt der größte Verlust bei der Isolation von HPRG aus Serum durch die Affinitätschromatographie. Es war bisher nicht möglich, mithilfe dieser Methode ein reines Protein zu erhalten, sodass immer eine Co-Aufreinigung mit Albumin erfolgte. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass in den albuminhaltigen Waschfraktionen ebenfalls HPRG von der Säule eluiert, was auch in der Abbildung 3.3 in den Fraktionen 2 bis 6 zu erkennen ist. Vermutlich bindet HPRG nicht vollständig an die Säule. Bei der Kationenaustauschchromatographie wurde auf den entsprechenden Gelen in Abbildung 3.6 bei geringen Salzgehalten kaum HPRG mit dem Albumin von der Säule eluiert, sodass der Verlust von HPRG hier deutlich geringer ausfallen wird.

3.1.5. Radikalisches HPRG

Nach der Aufreinigung zeigt sich, dass reines HPRG in Puffer ohne Zugabe von Sonden bereits ein EPR-Signal zeigt. Das entsprechende cw-X-Band-EPR-Spektrum ist in Abbildung 3.8 gezeigt. Bereits *Wake et al.*^[62] beobachteten eine antioxidative Aktivität von humanem HPRG über Fluoreszenzquenchingmethoden. Diese Untersuchungen zeigten auch, dass HPRG die Bildung von Hydroxylradikalen in Lösung zu hemmen und Peroxylradikale aus der Lösung zu entfernen scheint. Dies scheint konzentrationsabhängig zu erfolgen. Weiterhin stellten sie fest, dass HPRG effektiver oxidiert werden kann als HSA und eine signifikant höhere antioxidative Kapazität besitzt.^[62] Die strukturelle Herkunft des antioxidativen Verhaltens konnte jedoch nicht vollständig geklärt werden.

Anhand des gemessenen EPR-Spektrums von HPRG in Puffer ist zu erkennen, dass HPRG dabei selbst ein ungepaartes Elektron trägt. Ein 3-Linienspektrum erhält man, wenn in unmittelbarer Nähe ein Kern mit einem Kernspin von $I = 1$ vorhanden ist. Für biologische Proben tritt eine Kernspinquantenzahl von 1 nur bei ¹⁴N-Stickstoff auf, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass HPRG über seine stickstoffhaltigen Aminosäurereste Radikale aus seiner Umgebung aufnehmen und stabilisieren kann.

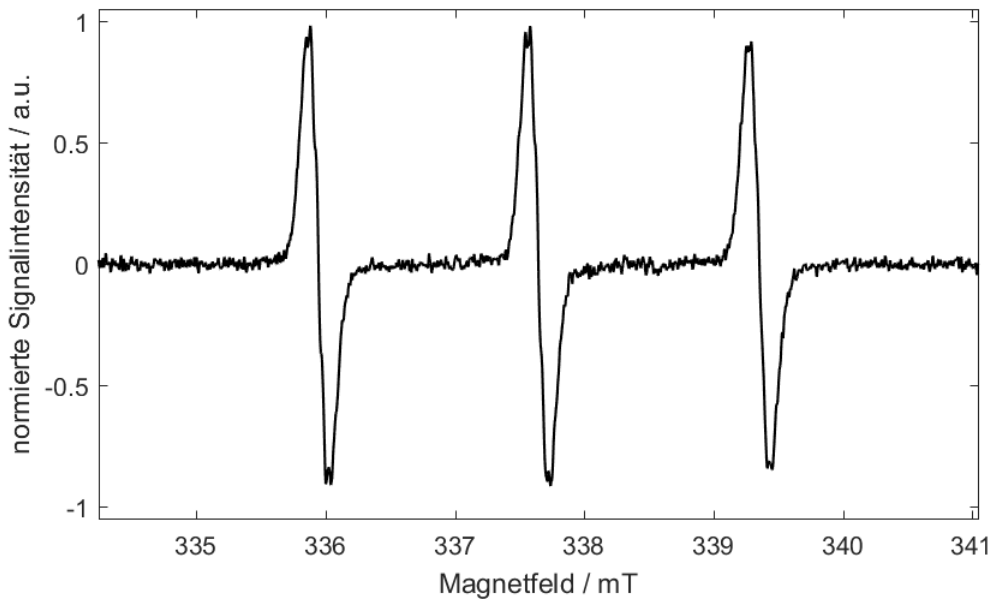


Abbildung 3.8: cw-X-Band Messung des reinen HPRGs in PBS pH 7,4.

Das Spektrum in Abbildung 3.8 weist eine große Hyperfeinaufspaltung auf. Die Simulation des Spektrums ergibt einen Wert für die isotrope Hyperfeinkopplungs-konstante von 47,7 MHz bei einem isotropen g-Wert von 2,0054. Die Parameter sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Dies deutet auf einen geringen Abstand des Radikals zum Stickstoff hin. Bei Nitroxidsonden wird ein solches Phänomen bei einer polaren Umgebung beobachtet. Das ungepaarte Elektron befindet sich dann durch die zwitterionische Form des Nitroxids näher am Stickstoff, weshalb die Hyperfeinaufspaltung in polarer Umgebung größer ist als in unpolarer Umgebung.

Tabelle 3.2: Simulationsparameter für das cw-X-Band-EPR-Spektrum von HPRG in PBS pH 7,4.

Probe	Anteil / %	g_{iso}	$A_{N,iso}$ / MHz	τ / ps	T
HPRG in PBS	100	2,0054	47,65	140,2	0,66

Um die Hyperfeinaufspaltung mit bekannten Nitroxidsonden vergleichen zu können, wurden die Spektren des HPRG-Radikals und der Sonden in Abbildung 3.9 gegenübergestellt. Es ist zu erkennen, dass die Hyperfeinaufspaltung von HPRG ähnlich der von TEMPOL in Puffer ist. Die Breite und die Form des Spektrums lässt vermuten, dass kein Heisenberg-Austausch stattfindet, was durch die Simulation des Spektrums bestätigt werden konnte. Da die Heisenberg-Austauschwechselwirkung nur bei einer Orbitalüberlappung stattfinden kann, ist davon auszugehen, dass sich im Falle mehrerer ungepaarter Elektronen bei einem HPRG-Molekül ein genügend großer Abstand zwischen ihnen befindet.



Abbildung 3.9: Gegenüberstellung des HPRG-Radikals mit verschiedenen Nitroxidsonden in PBS pH 7.4. Die roten Markierungen sind Hilfslinien, ausgehend vom HPRG-Spektrum, zur Identifikation der Nulldurchgänge und somit auch zur Hyperfeinaufspaltung. Die blauen Spektren zeigen eine gute Übereinstimmung in der Hyperfeinaufspaltung.

Weiterhin erkennt man deutlich bei dem Vergleich der Spektren von HPRG mit denen der Sonden, dass sich das Spektrum vom HPRG von der Form her unterscheidet. Zum einen haben die 3 Signale der Stickstoffaufspaltung nahezu die gleiche Intensität, zum anderen wird das typische 3 Linien cw-X-Band-Spektrum von schwachen, weiteren Aufspaltungen überlagert, welche unaufgelöste Hyperfeinkopplungen darstellen. Dabei findet die Hyperfeinaufspaltung nicht nur durch das Atom, an welchem sich das ungepaarte Elektron befindet, statt, sondern auch weitere benachbarte Atome wie Kohlenstoff oder Wasserstoff spalten das EPR-Signal in weitere Linien auf. Die Nitroxidsonden in Abbildung 3.9 zeigen dieses spezielle Verhalten nicht. Man kann davon ausgehen, dass die Aufspaltung einer Stickstoff-Linie beim HPRG durch mindestens 4 weitere Linien überlagert wird. Verdeutlicht wird dies in Abbildung 3.10 am

Beispiel des Zentralfeldsignals, wobei die roten Markierungen die 4 weiteren Aufspaltungen kennzeichnen.

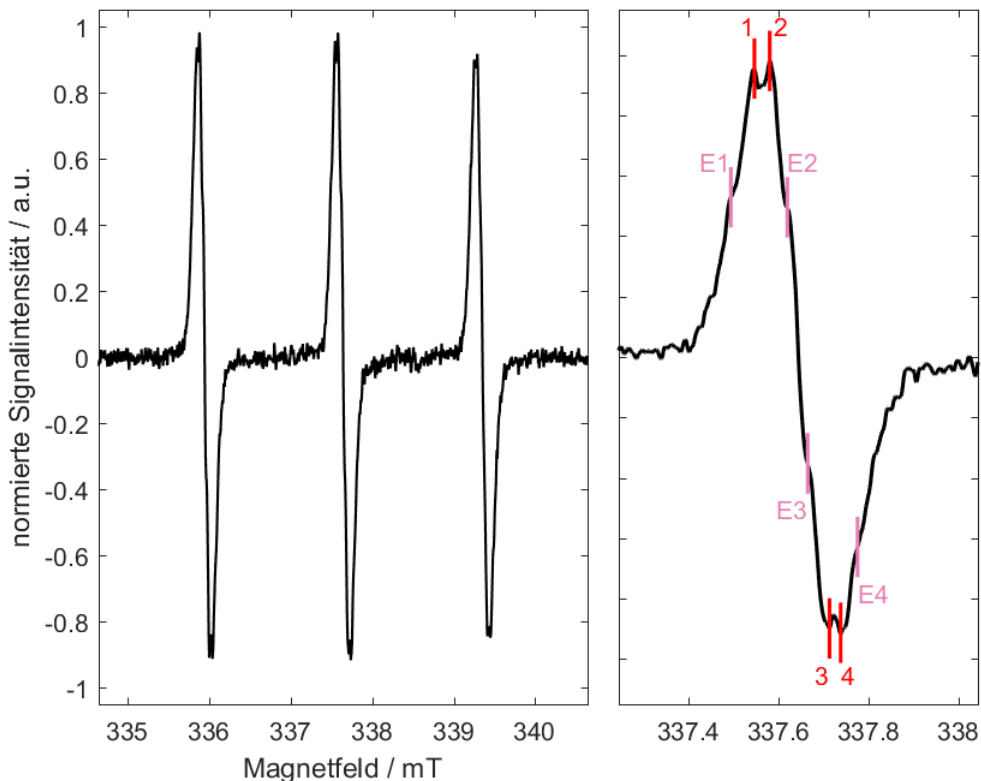


Abbildung 3.10: Darstellung des normierten EPR-Spektrums von reinem HPRG in PBS-Puffer (links) und die exemplarisch vergrößerte Darstellung des Zentralfeldsignals mit Markierung der sicheren Aufspaltungen (rot) und der weiteren, mögliche Aufspaltungen (rosa) (rechts).

Es wäre auch möglich, dass zusätzlich zu diesen Schultern an den Flanken der Stickstoffsignale, in rosa gekennzeichnet, auch noch weitere Hyperfeinkopplungen vorhanden sind. Diese wären jedoch sehr schlecht aufgelöst, sodass in dieser Arbeit von lediglich 4 Linien ausgegangen wird.

Es scheint, dass die weiteren Hyperfeinkopplungen aufgrund der Aufspaltungsmuster der Abstände der einzelnen Signale durch $I=1/2$ -Kerne verursacht werden. In biologischen Proben weisen ^1H , ^{13}C , ^{15}N diesen Kernspin auf, wobei durch die Isotopenverteilung vermutlich die ^1H -Kerne die Aufspaltung auslösen. ^{13}C und ^{15}N liegen nur mit einem Anteil von 1,07 % bzw. 0,368 % vor, weshalb diese vermutlich nicht im Spektrum zu sehen sein werden.

Die Magnetfelder der einzelnen Aufspaltungen und die entsprechenden Intensitäten, analog zu Abbildung 3.10, sind für das Tieffeld-, Zentralfeld-, und Hochfeldsignal der Stickstoffaufspaltung in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Aufreinigung und allgemeine Charakterisierung des HPRGs

Tabelle 3.3: Ausgelesene Magnetfeld und (normierte) Intensitäten der einzelnen Superhyperfeinaufspaltungen für das Tieffeld-, Zentralfeld-, und Hochfeldsignal der Stickstoffaufspaltung. Die Signale 1-4 stellen die Werte für die rot markierten Aufspaltungen und die Signale E1-E4 die rosa markierten Aufspaltungen in Abbildung 3.10 dar.

	Tieffeld		Zentralfeld		Hochfeld	
	B / mT	I / a.u.	B / mT	I / a.u.	B / mT	I / a.u.
Signal 1	335,851	0,9398	337,546	0,9582	339,258	0,9064
Signal 2	335,881	0,9866	337,580	1,0000	339,264	0,8735
Signal 3	335,999	-0,9158	337,713	-0,9109	339,415	-0,8525
Signal 4	336,039	-0,9234	337,738	-0,9280	339,449	-0,8558
Signal E1	335,805	0,6132	337,493	0,5335	339,211	0,5873
Signal E2	335,920	0,4747	337,619	0,4980	339,323	0,5020
Signal E3	335,962	-0,3724	337,664	-0,3503	339,376	-0,3284
Signal E4	336,080	-0,6220	337,776	-0,6351	339,490	-0,5836

Dabei werden die in Abbildung 3.10 rot gekennzeichneten Aufspaltungen als Signal 1 bis 4 und die weiteren möglichen Aufspaltungen in rosa als Signal E1 bis E4 bezeichnet. Aufgrund der ähnlichen Magnetfeldabstände zwischen Signal (1,2) zu Signal (3,4) bzw. zwischen Signal (1,3) zu Signal (2,4) wird von zwei unterschiedlichen $I=1/2$ -Kernen ausgegangen. Die schematische Aufspaltung ist in Abbildung 3.11 gezeigt.

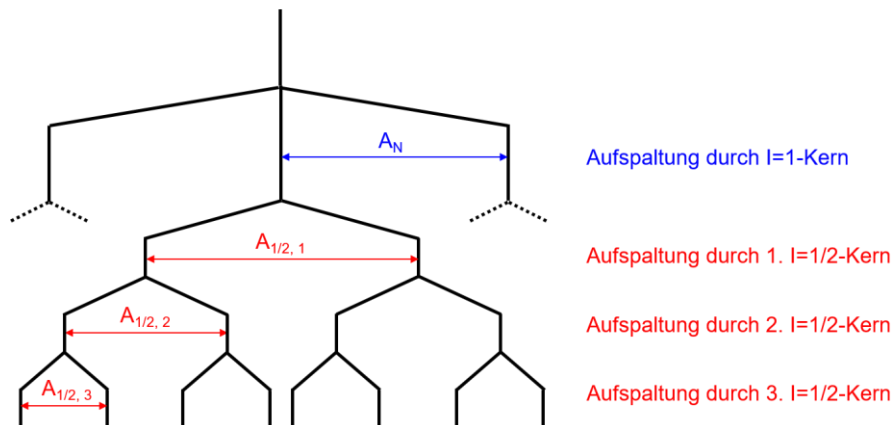


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des Aufspaltungsmusters durch einen $I=1$ -Kern mit der Hyperfeinaufspaltung A_N und der unaufgelösten Hyperfeinwechselwirkung durch drei nicht-äquivalente $I=1/2$ -Kerne mit unterschiedlicher Hyperfeinkopplungskonstante $A_{1/2,i}$, wobei gilt: $A_N > A_{1/2,i}$ und weiterhin $A_{1/2,1} > A_{1/2,2} > A_{1/2,3}$. Zur vereinfachten Darstellung ist die Aufspaltung nur für ein Signal des $I=1$ -Kerns gezeigt.

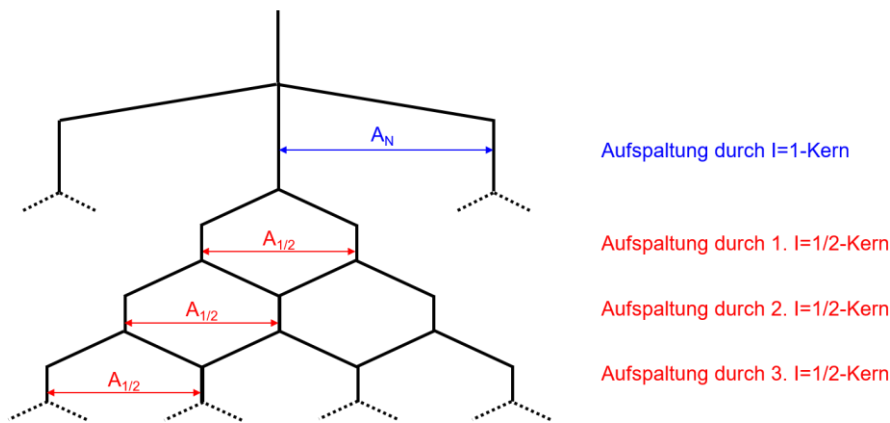


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Aufspaltungsmusters durch einen $I=1$ -Kern mit der Hyperfeinaufspaltung A_N und der unaufgelösten Hyperfeinwechselwirkung durch äquivalente $I=1/2$ -Kerne mit identischer Hyperfeinkopplungskonstante $A_{1/2}$, wobei $A_N > A_{1/2}$.

Zur Vollständigkeit ist auch in Abbildung 3.12 die Aufspaltung durch äquivalente Protonen dargestellt. Dafür wären 3 äquivalente Protonen notwendig und die Abstände zwischen den Hyperfeinkopplungen müssten zwischen allen Signalen identisch sein. Da dies nicht der Fall ist, wird von dem ersten Fall mit 2 nicht-äquivalenten Protonenarten ausgegangen. Für die Annahme, dass die unaufgelöste Hyperfeinkopplung 8 Aufspaltungen liefert, würden sich 3 nicht-äquivalente Protonenarten oder 7 äquivalente Protonen ergeben, wobei auch hier durch die unterschiedlichen Abstände zwischen den Aufspaltungen von ersterem ausgegangen wird. Es können auch mehr als Kerne beteiligt sein, jedoch ist dies nicht sicher aus den cw-X-Band-Spektren ablesbar.

Anhand der bisherigen Daten kann abgeschätzt werden, an welchen Aminosäuren sich das ungepaarte Elektron bevorzugt befinden muss:

- a) Das ungepaarte Elektron befindet sich in unmittelbarer Umgebung zu einem Stickstoffkern.
- b) Es müssen sich mindestens 2, eventuell auch 3, nicht-äquivalente Kerne mit einem Kernspin von $I=1/2$ in der Nähe des ungepaarten Elektrons befinden, wobei es sich dabei vermutlich um Protonen handelt.
- c) Da keine Austauschverbreiterung in dem Spektrum zu erkennen ist, und somit keine direkte Elektron-Elektron-Wechselwirkungen vorhanden sind, ist ein ungepaartes Elektron zu einem anderen Elektron, und damit gegebenenfalls zu anderen elektrontragenden Aminosäuren, entsprechend weit entfernt.

Nach diesen Bedingungen wären Aminosäuren als Träger des ungepaarten Elektrons möglich, welche in ihrer Seitenkette ein sekundäres Amin tragen, welches von CH-Bindungen umgeben ist, wobei mindestens zwei nicht-äquivalente Protonen vorliegen müssen. Neben Lysin, Glutamin, und Asparagin (als primäre Amine und ohne ausreichende Protonenumgebung) ist auch das in die Peptidbindung eingebundene Stickstoff unwahrscheinlich als Träger des Elektrons, da hier ebenfalls keine benachbarten Protonen vorhanden sind. Arginin mit der endständigen Guanidinogruppe würde vermutlich weitere Stickstoffkopplungen zeigen, weshalb auch hier nicht davon ausgegangen wird, dass sich das ungepaarte Elektron an dieser Aminosäure befindet. Somit bleiben noch Tryptophan, Arginin und Histidin als mögliche Radikalträger.

Als posttranslationelle Modifikation sind bei rbHPRG nur fünf Glykosilierung über die Asparagin-Stickstoffe^[25], neben der Ausbildung von fünf Disulfidbrückenbindungen zwischen den Thiolgruppen der Cysteine^[14], bekannt. Es ist unwahrscheinlich, dass das ungepaarte Elektron durch die Glykosilierung bedingt wird, jedoch müsste hier noch HPRG vollständig deglykosiliert werden, um genauere Aussagen treffen zu können.

In der Literatur sind verschiedene stabile, auf Aminosäuren basierte Radikale bekannt. Die am besten radikalstabilisierenden Aminosäuren sind Tyrosin, Tryptophan, Glycin und Cystein, wobei es sich jeweils um ein sauerstoff-basiertes, ein stickstoff-basiertes, ein kohlenstoff-basiertes und ein schwefelbasiertes Radikal handelt, sodass nur Tryptophan als möglicher Radikalträger bei HPRG in Frage kommt.^[148] Weiterhin ist bekannt, dass auch Histidin ein Radikal stabilisieren kann, welches sich delokalisiert in dem Imidazolring befindet.^[149–153] Dieser Aminosäure wird bereits eine wichtige Rolle bei der Proteinoxidation über die Bildung radikalischer Zwischenstufen zugesprochen.^[154]

Anhand des cw-X-Band-Spektrums können keine weiteren Informationen über den Ursprung des „radikalischen HPRGs“ gewonnen werden. Es sind noch Messungen bei höheren Frequenzen, wie beispielsweise W-Band, notwendig, um Wechselwirkungen und die chemische Umgebung besser auflösen zu können. Weiterhin wäre es möglich durch Puls-EPR-Messungen, z.B. ESEEM- oder ENDOR-Messungen die Umgebung um das ungepaarte Elektron zu erforschen. Mittels ESEEM-Spektroskopie ist es möglich, anhand der Korrelation der ¹⁴N-Quadrupolparameter den Ursprung des ungepaarten Elektrons genauer zu bestimmen.^[116]

3.2. Antioxidatives Verhalten des HPRGs

Wie bereits in Kapitel 3.1.5 erwähnt, zeigt reines HPRG ein EPR-Spektrum mit 3 Linien, was typisch für stickstoffbasierte Radikale ist. Das Verhalten und der Auf- und Abbau dieses Protein-Radikals wurde mit einer Reihe von Reaktionen untersucht, welche grundlegend auf der *Fenton*-Reaktion beruhen. Um die Effekte besser einordnen zu können, wurde mit TEMPO, als Referenzsubstanz mit einer EPR-aktiven Nitroxidgruppe, gearbeitet.

Die *Fenton*-Reaktion basiert auf der Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Anwesenheit von Metallionen. Entdeckt wurde die Reaktion erstmal von *H.J.H. Fenton* Ende des 19. Jahrhunderts bei der Oxidation von Weinsäure bei Anwesenheit von Eisen.^[155] Diese Reaktion gilt als ursächlich für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS), welche oxidativen Schaden an Proteinen oder DNA auslösen können.^[156,157] Der oxidative Stress kann dann zu Krebserkrankungen, kardiovaskulären oder neurodegenerativen Erkrankungen führen.^[156] Die Oxidation von Metallionen durch Wasserstoffperoxid ist in Abbildung 3.13 im oberen Abschnitt gezeigt. Weiterhin können auch Superoxidanionradikale bei der Umsetzung von oxidierten Metallionen zu ihrer reduzierten Form entstehen.

Neben der *Fenton*-Reaktion spielt auch die *Haber-Weiss*-Reaktion eine große Rolle bei der Entstehung von ROS. Hierbei werden Hydroxylradikale bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid aus Peroxylradikalen oder Superoxidanionenradikalen gebildet.^[158]

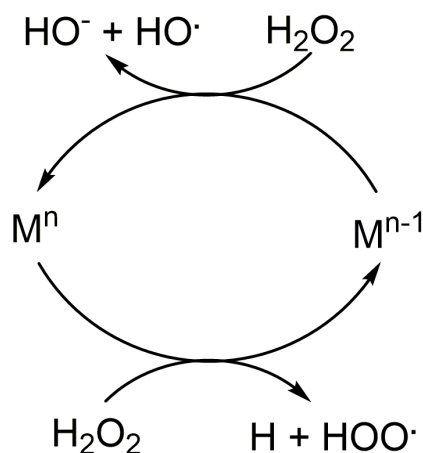


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des Ablaufs der *Fenton*-Reaktion (adaptiert nach ^[159]).

Generell können Radikalreaktionen an Proteinen auf verschiedene Weisen erfolgen: Dazu zählen unter anderem die Reaktion zwischen Protein und Radikal durch Wasserstoffabstraktion, Elektronentransfer oder Additionsreaktionen.^[160] Weiterhin kann die Struktur des Proteins durch Fragmentierungen, Dimerisationen oder Disproportionierung

verändert werden.^[160–162] Radikalreaktionen können sowohl an den Peptidbindungen als auch an den Seitenketten der Aminosäuren stattfinden, wobei die Selektivität der Reaktion durch die umgebenden funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten bedingt sind, welche die Produkte der Reaktion stabilisieren oder destabilisieren können.^[162] Auch die Art der ROS hat durch ihre unterschiedliche Reaktivität einen Einfluss auf den Reaktionsort. Beispielsweise kann ein Hydroxylradikal an allen Aminosäuren Reaktionen eingehen, wohingegen Peroxylradikale bevorzugt an Cystein, Methionin, Tryptophan und Tyrosin binden.^[158,162] Das Ausmaß des Schadens an Proteinen hängt von vielen Faktoren ab, wie beispielsweise von der Konzentration der ROS oder der Zugänglichkeit des bevorzugten Angriffsziels an dem Protein. Weiterhin spielt auch die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion eine große Rolle.^[162]

Für die Messung des Verhaltens des HPRG-Radikals wurde nicht-reduziertes Protein verwendet, d.h. HPRG, welches bereits selbst ein Radikal aufweist. Dies diente dazu, um sicher zu sein, dass ein struktureller Auf- und Abbau des EPR-aktiven Moleküls möglich ist. Alle im folgenden dargestellten Spektren wurden auf die jeweilige Referenz, das erste Spektrum in der Legende, auf die Amplitude des Zentralfeldsignals normiert, um eine Vergleichbarkeit zwischen den TEMPO und HPRG-Spektren und den jeweiligen Bedingungen zu ermöglichen. Weiterhin besteht so die Möglichkeit, die prozentualen Änderungen der Signalintensität bei Zugabe von Metallionen oder Wasserstoffperoxid abschätzen zu können. Bei einer Normierung auf das Doppelintegral würden Spektren mit einem schlechteren SNR, wie beispielsweise bei dem Abbau des Radikals durch das Antioxidans Ascorbinsäure, unverhältnismäßig überbewertet werden.

3.2.1. Vergleich des HPRGs mit TEMPO

Zunächst soll das Verhalten des HPRGs mit dem von TEMPO bei verschiedenen Reaktionsbedingungen untersucht werden. Die jeweiligen EPR-Spektren sind in Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15 zusammengefasst.

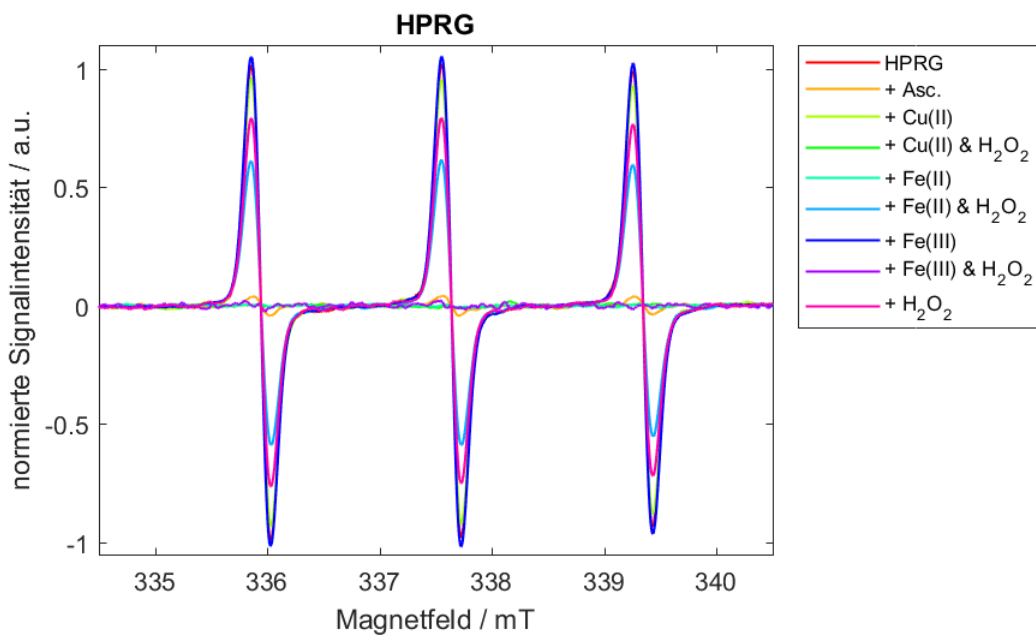


Abbildung 3.14: Amplitudennormierte cw-EPR-Spektren des radikalischen HPRG unter verschiedenen Bedingungen in PBS pH 7,4.

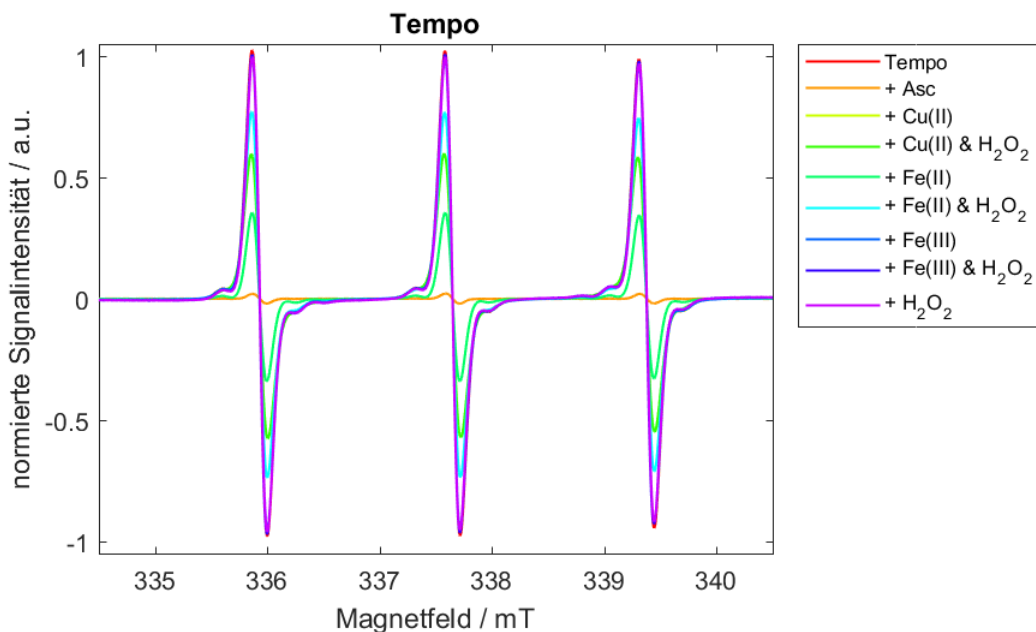


Abbildung 3.15: Amplitudennormierte cw-EPR-Spektren von TEMPO unter verschiedenen Bedingungen in PBS pH 7,4.

Man kann bei beiden Messreihen feststellen, dass keine Reaktionsbedingung neues EPR-aktives Radikal entstehen lässt. Da die Spektren auf die jeweilige Referenz, HPRG und TEMPO in PBS ohne Zugabe von weiteren Substanzen, amplitudennormiert wurden, müssten bei einer Zunahme von EPR-aktiven Substanzen in der Lösung jeweils die Signalintensitäten über 1 steigen. Daher ist von keiner Bildung einer neuen, stabilen Radikalspezies auszugehen.

Weiterhin bauen beide Systeme ihre EPR-aktive Spezies mit der Zugabe von Ascorbinsäure ab. Ascorbinsäure gilt als Antioxidans, welches durch Selbstoxidation Radikale in Lösung abfangen kann.^[163] Durch Ein-Elektronenoxidation kann aus Ascorbinsäure bzw. Ascorbat als physiologisch aktive Form, zunächst der Semidehydroascorbinsäure-Radikal bzw. Ascorbat-Radikal und bei einer weiteren Oxidation die Dehydroascorbinsäure gebildet werden.^[163]

Bei Zugabe von den Metallionen Kupfer(II), Eisen(II) und Eisen(III), ohne Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, unterschieden sich die Messreihen nur leicht voneinander. Die Zugabe von Kupfer(II) und Eisen(III) scheint keinen Einfluss auf das paramagnetische Zentrum zu haben, da sich diese Spektren nicht von denen der Ausgangsradikale unterscheiden. Eisen(II) bewirkt einen Abbau bei TEMPO, sodass die Signalintensität nur noch etwa 35 % von der Ausgangsintensität beträgt. Bei HPRG hingegen ist der Abbau der Signalintensität deutlich drastischer, sodass keine EPR-aktive Spezies mehr messbar ist.

Bei dem Vergleich der Messungen mit Wasserstoffperoxid unterscheiden sich ebenfalls die Messungen von HPRG und TEMPO. Während Wasserstoffperoxid allein keinen Einfluss auf das paramagnetische Zentrum von TEMPO hat, ist bei HPRG ein deutlicher Abbau der Signalintensität erkennbar, sodass die Intensität etwa im Bereich von HPRG mit Ascorbinsäure liegt.

Bei der Zugabe von Metallionen und Wasserstoffperoxid findet bei beiden Messreihen bei Eisen(II) ein mittlerer Abbau der Signalintensität statt. Bei HPRG beträgt der Abbau etwa 50 %, wohingegen der Abbau bei TEMPO nur etwa 25 % beträgt. Ein deutlich größerer Unterschied ergibt sich bei der Zugabe von Eisen(III) und Wasserstoffperoxid. Auf TEMPO hat dies keinen Einfluss, wohingegen bei HPRG kein EPR-Signal mehr messbar ist. Ähnlich verhält es sich bei HPRG mit Kupfer(II) und Wasserstoffperoxid. Nach der Zugabe ist kein EPR-Signal mehr messbar, wohingegen bei TEMPO die Signalintensität um etwa 40 % abnimmt.

Eisen(II), das hier als reduzierte Form der Eisensalze vorliegt, scheint einen deutlich größeren Einfluss auf die paramagnetischen Zentren von TEMPO und HPRG zu haben als die anderen beiden Metallionen, welche in ihrer höheren Oxidationsstufe vorliegen.

Es wurde bereits gezeigt, dass Eisen(II) zu Eisen(III) oxidiert werden kann durch die Umwandlung von Nitroxiden in Hydroxylaminen.^[164] Daher nimmt auch bei TEMPO die Signalintensität bei Anwesenheit von Eisen(II) ab.

Bei HPRG findet ein noch viel stärkerer Abbau des HPRG-Radikals bei Anwesenheit von Eisen(II)-Ionen statt. Das legt die Vermutung nahe, dass durch eventuelle Koordination des

Eisens in der Nähe des Radikals des HPRGs eine Reduktion des HPRG-Radikals zu einem Hydroxylamin oder einer ähnlichen Struktur, je nach Radikalspezies, bewirkt wird. Mit Kupfer(II) und Eisen(III) findet kein Abbau der radikalischen Strukturen statt. Die Reaktion von einem Nitroxid zu einem Oxoniumion bei der Anwesenheit von Metallionen der höheren Oxidationsstufe gehört nicht zu den favorisierten Reaktionen.^[164]

Für TEMPO wurde bereits gezeigt, dass die Spinsonde die Hydroxylradikalbildung durch Eisen(II) und Wasserstoffperoxid hemmen kann, indem Eisen(II) zu Eisen(III) oxidiert wird und dementsprechend das Nitroxid zu seiner Hydroxylamin-Form reduziert wird. Folglich findet die *Fenton*-Reaktion zwischen Metallion und Wasserstoffperoxid in einem deutlich geringen Ausmaß statt als ohne Nitroxid-Anwesenheit, was auch die eigenen Messungen zeigen.^[164]

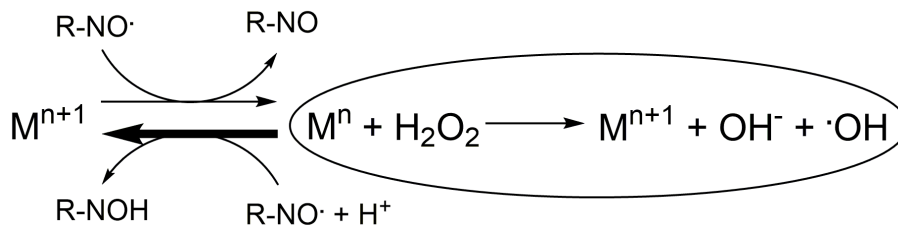


Abbildung 3.16: Einfluss von Nitroxiden auf die *Fenton*-Reaktion (Kreis) (adaptiert nach ^[164]).

Im Gegensatz zu TEMPO zeigt HPRG deutlich stärkere Effekt bei der Anwesenheit von Metallionen und Wasserstoffperoxid. Durch die Koordination von HPRG mit Eisen(II) befindet sich vermutlich das paramagnetische Zentrum des Proteins nahe des Metallions, wodurch Abbaueffekte deutlich verstärkt werden. Die antioxidative Wirkung des HPRGs besteht in der Hemmung der Bildung von Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid.^[65] Dies wurde durch ein HORAC-Assay bestimmt, bei dem standardmäßig Cobalt(II) zu Cobalt(III) durch Wasserstoffperoxid oxidiert wird und die so entstehenden Hydroxylradikale durch Wasserstofftransfer eine Farbreaktion an Fluorescein auslösen.^[165] Indem Eisen(II) durch HPRG zu Eisen(III) oxidiert wird, wird die *Fenton*-Reaktion gehemmt und es entstehen keine Hydroxylradikale. Im Vergleich zu der Messung von TEMPO mit Wasserstoffperoxid und Eisen(II) kann man feststellen, dass mit HPRG eine deutlich stärkere Abnahme des EPR-Signals erfolgt. Dies kann darauf hindeuten, dass bei HPRG durch die Koordination des Metalls eine weniger starke sterische Hinderung, im Vergleich zu TEMPO mit den Methylgruppen in den alpha-Positionen zu der Nitroxidgruppe, erfährt, weshalb das HPRG-Radikal schneller abgebaut werden kann.

Bei Anwesenheit von Eisen(III) und Kupfer(II) zeigt HPRG im Vergleich zu TEMPO und auch im Vergleich zu den Messungen mit Eisen(II) und Wasserstoffperoxid eine stärkere Abnahme der Signalintensität. An dieser Stelle muss noch einmal erwähnt werden, dass bei der Zugabe von Kupfer(II) und Eisen(III) die Signalintensität bei TEMPO und HPRG nicht abnimmt und demnach auch keine Umwandlung von einem Nitroxid (oder ähnlicher Struktur) in ein Oxoniumion (oder ähnliche Struktur) erfolgt. Beide Metallionen können aber durch Wasserstoffperoxid zu Superoxidationradikalen reduziert werden.^[166] Dabei entstehen auch Kupfer(I) und Eisen(II). Von letzterem ist aus den vorherigen Messungen bereits bekannt, dass die Konzentration des HPRG-Radikals drastisch abnimmt. Die entstandenen Superoxidationen können auch mit Kupfer(II), entstanden aus der Reaktion von Kupfer(I) durch HPRG-Anwesenheit, erneut zu Kupfer(I) und Sauerstoff reduziert werden. Es findet also eine Kettenreaktion statt, bei welcher das HPRG-Radikal sehr schnell abgebaut werden kann. Es wäre weiterhin möglich, dass aus dem verbleibenden Wasserstoffperoxid und Kupfer(I) auch Hydroxylradikale entstehen, welche zusätzlich als sehr reaktive Sauerstoffspezies den Abbau des HPRG-Radikals induzieren können. Aus den aktuellen EPR-Messungen geht jedoch nicht hervor, auf welchen Wegen der Abbau schlussendlich genau erfolgt. Im Vergleich zu HPRG ist die Nitroxidgruppe als Träger des ungepaarten Elektrons vermutlich viel stärker abgeschirmt, sodass diese Reaktionen mit TEMPO zwar stattfinden, jedoch ist die Abnahme der Signalintensität nach dem gleichen Zeitraum deutlich schwächer ausgeprägt.

3.2.2. Vergleich des reduzierten HPRGs mit reduziertem TEMPO

Als nächstes sollte das Verhalten des mit Ascorbinsäure reduzierten HPRGs und TEMPOs bei verschiedenen Reaktionsbedingungen untersucht werden. Die jeweiligen EPR-Spektren sind in Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18 zusammengefasst. Hierbei wurde mit einem Überschuss an Ascorbinsäure gearbeitet, damit die ungepaarten Elektronen der EPR-aktiven Spezies möglichst vollständig auf Ascorbinsäure übergehen.

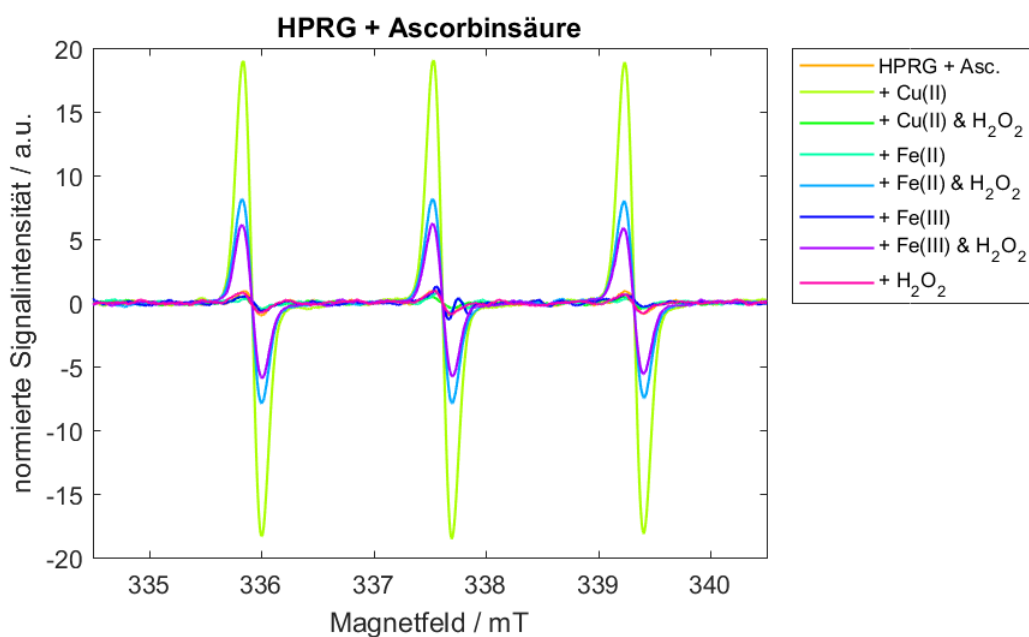


Abbildung 3.17: Amplitudennormierte cw-EPR-Spektren des mit Ascorbinsäure reduzierten HPRGs unter verschiedenen Bedingungen in PBS pH 7,4.

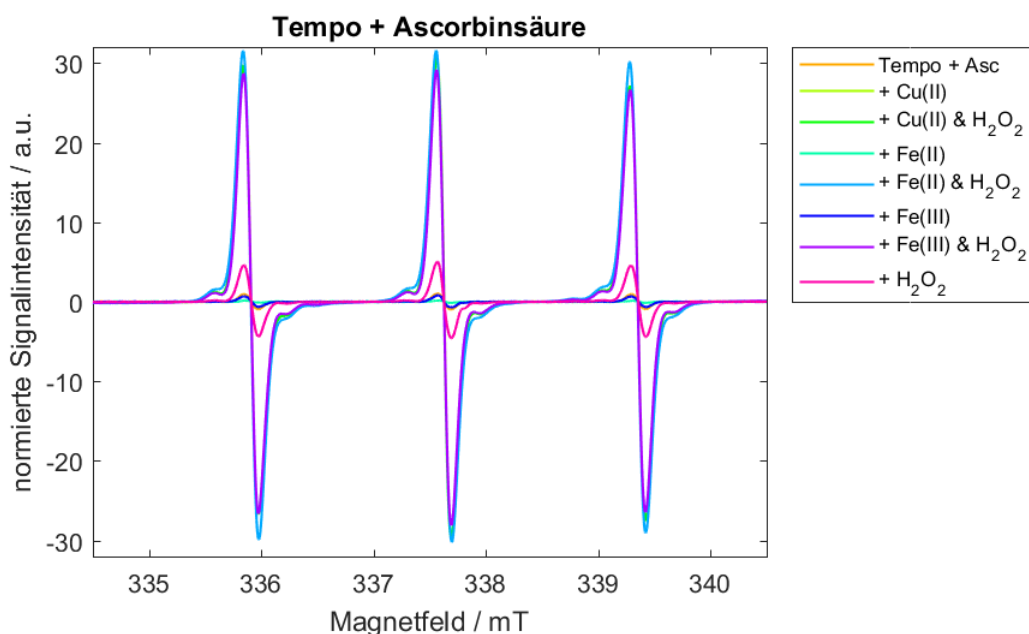


Abbildung 3.18: Amplitudennormierte cw-EPR-Spektren von mit Ascorbinsäure reduziertem TEMPO unter verschiedenen Bedingungen in PBS pH 7,4.

Als Referenzmessung dient jeweils die EPR-Messung von HPRG bzw. TEMPO mit Ascorbinsäure. Alle weiteren Messungen wurden entsprechend auf diese Messung amplitudennormiert. Sobald die Signalintensität den Wert von eins übersteigt, findet ein Aufbau der radikalischen, stickstoffbasierten Spezies statt. Der Unterschied dieser Messungen im Vergleich zu denen aus Kapitel 3.2.1 liegt in der Art der Reaktion. Während ohne Anwesenheit von Ascorbinsäure vermutlich vor allem Radikal-Radikal-Reaktionen eine Rolle spielten, sodass die Konzentration an EPR-aktiven Molekülen abnahm, werden hier vorrangig Radikalübergänge und Abstraktionsvorgänge charakterisiert, welche EPR-aktive Moleküle erzeugen. Da nun neben den radikalischen Spezies, welche Reaktionen eingehen, auch Ascorbinsäure als antioxidativ wirksame Substanz in allen Proben vorhanden ist, werden hier auch Konkurrenzreaktionen stattfinden. Hier müssen weiterführende Messungen angeschlossen werden, um die Reaktionsmechanismen auflösen zu können. Daher sollen alle Schlüsse aus den Spektren als mögliche, noch zu bestätigende Theorien verstanden werden: Bei der Zugabe von Metallionen unterscheiden sich die Effekte nicht zwischen HPRG und TEMPO. Eisen(II) und Eisen(III) bewirken keine Änderung bezüglich der Ausbildung einer paramagnetischen Spezies. Bei Kupfer(II) hingegen nahm die Signalintensität bei HPRG etwa um das 18-fache zu, bei TEMPO sogar um etwa das 30-fache.

Bei der Zugabe von Wasserstoffperoxid ohne Metallionen anwesenheit stieg die Signalintensität nur geringfügig bei der TEMPO-Probe an, wohingegen bei HPRG-Anwesenheit kein EPR-Signal zu beobachten war.

Bei der Zugabe von Wasserstoffperoxid und Metallionen nahm das Signal bei TEMPO bei allen Reaktionspartnern zu, währenddessen eine Zunahme bei HPRG nur jeweils bei Eisen(II) und Eisen(III) mit Wasserstoffperoxid erfolgte. Kupfer(II) in Kombination mit Wasserstoffperoxid zeigte keinen Einfluss auf die Signalintensität bei HPRG, dafür stieg die Intensität bei TEMPO ebenfalls auf etwa das 30-fache an.

Weiterhin zeigen die Referenzmessungen ohne Anwesenheit einer radikalischen Spezies in Abbildung A.8, dass Ascorbinsäure Radikale aufnimmt. Dies erfolgt bei der Zugabe von Wasserstoffperoxid, von Eisen(II) mit Wasserstoffperoxid und von Eisen(II) mit Wasserstoffperoxid. Zu erklären ist das über das Reduktionsverhalten der Ascorbinsäure. Eisen(II) und Wasserstoffperoxid bilden ein *Fenton*-System, welches Hydroxylradikale bildet. Diese Radikale können auf die Ascorbinsäure übergehen, weshalb hier die Dehydro-Ascorbinsäure beziehungsweise das Semidehydroascorbinsäure-Radikal entsteht.^[167,168]

Gleichzeit kann Ascorbinsäure aber auch das entstehende Eisen(III) zu Eisen(II) reduzieren, welches dann wiederum an der Reaktion zu Hydroxylradikalen beteiligt ist.^[169] Weiterhin kann auch durch Luftsauerstoff aus der Ascorbinsäure unter Bildung verschiedener ROS die reduzierten Formen der Ascorbinsäure gebildet werden.^[169]

Bei Anwesenheit von reduziertem TEMPO als Nitroxid bewirken alle drei Metallionen mit Wasserstoffperoxid einen Anstieg des EPR-Signals von TEMPO. Das durch Ascorbinsäure reduzierte TEMPO liegt als Hydroxylamin vor, indem ein Wasserstofftransfer stattfindet.^[170,171]

Das TEMPO in seiner Hydroxylaminform kann wiederum mit Wasserstoffperoxid in seine radikalische Form umgewandelt werden unter Bildung von Hydroxylradikalen.^[172] Zusätzlich können durch überschüssige Ascorbinsäure Eisen(III) bzw. Kupfer(II) in ihre reduzierten Metallionen überführt werden, wobei ebenfalls durch Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale entstehen. Diese können durch Ascorbinsäure abgefangen werden, solange noch ausreichend Kapazität dafür vorhanden ist. Ergänzend zu den beschriebenen Vorgängen muss auch ein mögliches Gleichgewicht zwischen den Effekten, wie sie zwischen TEMPO und den Metallionen ohne Ascorbinsäure-Anwesenheit auftraten, berücksichtigt werden. Ersteres Phänomen erklärt auch, warum ein TEMPO-Signal nur bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid entsteht.

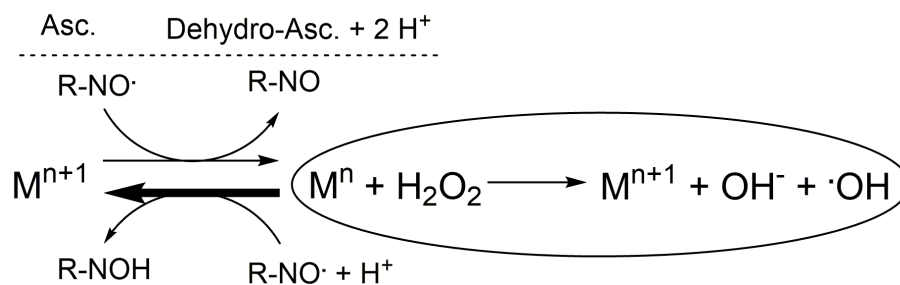


Abbildung 3.19: Einfluss von Nitroxiden auf die *Fenton*-Reaktion (Kreis) bei Anwesenheit von Ascorbinsäure (adaptiert nach ^[164] und ergänzt nach ^[173]).

Ohne Metallionen-anwesenheit ist bei HPRG mit Ascorbinsäure und Wasserstoffperoxid kein HPRG-Radikal zu beobachten. Daher kann vermutet werden, dass bei HPRG durch Ascorbinsäure das stickstoffbasierte Radikal nicht in ein Hydroxylamin umgewandelt wird. Daher lässt sich weiter vermuten, dass bei HPRG das Radikal nicht über eine NO-Bindung delokalisiert vorliegt, wie es bei Nitroxidradikalen der Fall ist.

Damit geht einher, dass der Oxidations-Reduktionsprozess nicht wie bei TEMPO abläuft und so auch die Effekte der Metallionen anders ausfallen als bei TEMPO. Bei der Messung von

reduziertem HPRG ist nur bei Eisen(II) und Eisen(III) mit Wasserstoffperoxid eine Ausbildung eines stickstoffbasierten EPR-Signals zu beobachten.

Mit Kupfer(II) ist keine Ausbildung des HPRG-Radikals zu beobachten. Vermutlich spielt hier die Bindung der Metallionen und die damit verbundene räumliche Nähe zum Protein mit in die Reaktionen rein. Während für HPRG eine starke Kupfer-Bindung publiziert wird^[63], ist für die Bindung von Eisen(II) nur wenig bekannt. Für Eisen(III) wurde bisher angenommen, dass keine Interaktion mit hHPRG stattfindet.^[62] Da somit eventuelle Interaktionen mit den Metallionen weitere Effekte dazukommen, welche auf die spezifische Radikalerzeugung anspielen, muss im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Komplexität möglicher Reaktionen auf eine Klärung des genauen Mechanismus verzichtet werden.

3.2.3. Vergleich des HPRGs mit TEMPO unter Bestrahlung

Sichtbares und UV-Licht löst in verschiedenen Biomolekülen und auch Medikamenten Effekte wie Degradation, Radikalbildung oder Energietransfer aus.^[174–176] Daher wurde als weitere Messreihe ein Bestrahlungsexperiment durchgeführt. Dazu wurde eine HPRG Probe für 15 h mit blauem Licht nahe dem UV-Bereich mit einer Wellenlänge von 419 nm bestrahlt, um mögliche Effekte durch eine kleine Wellenlänge bzw. eine hohe Energie der Strahlung erfassen zu können, jedoch keine destruktiven Änderungen durch Einwirken von UV-Strahlung zu erzielen. Als Referenz wurde jeweils eine HPRG- und TEMPO-Probe mit gleicher Konzentration über den gleichen Zeitraum unter Lichtausschluss gemessen, um Temperatur- oder Alterungseffekte auszuschließen. Die im folgenden gezeigten Spektren wurden jeweils auf die erste Messung (bei 0 h) amplitudennormiert. In Abbildung 3.20 ist das Verhalten von HPRG in Puffer und in Abbildung 3.21 das Verhalten von TEMPO bei der Bestrahlung zu sehen. Die Vergleichsmessungen über den gleichen Zeitraum sind im Anhang in Abbildung A.5 und Abbildung A.6 aufgeführt.

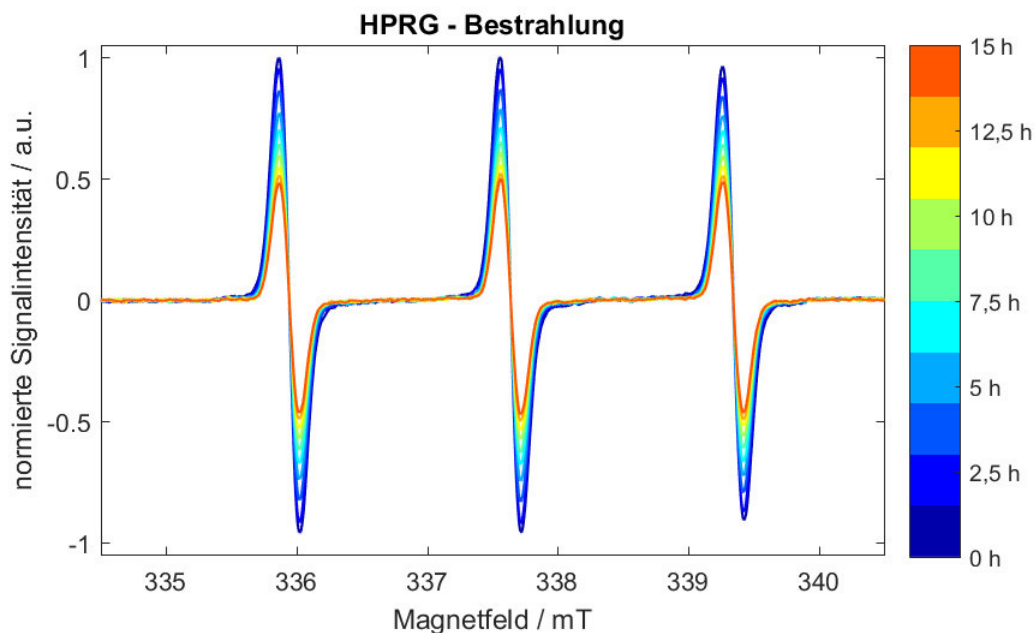


Abbildung 3.20: Amplitudennormierte EPR-Spektren des radikalischen HPRGs bei der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 419 nm über einen Zeitraum von 15 h in PBS pH 7,4.

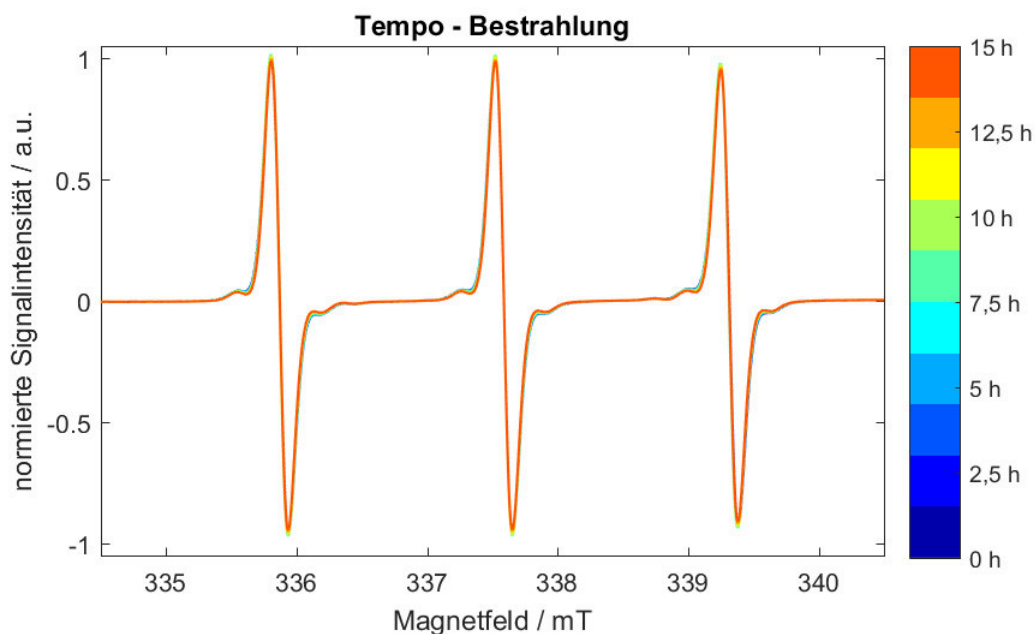


Abbildung 3.21: Amplitudennormierte EPR-Spektren von TEMPO bei der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 419 nm über einen Zeitraum von 15 h in PBS pH 7,4.

Man erkennt in Abbildung 3.20, dass die Signalintensität bei der Bestrahlung von HPRG mit blauem Licht abnimmt. Dieser Abbau erfolgt kontinuierlich. In der Referenzmessung ohne Bestrahlung zeigt HPRG keinen Unterschied in der Signalintensität nach 15 h, sodass diese Änderungen lichtinduziert sein müssen.

Im Gegensatz zu HPRG findet bei der bestrahlten TEMPO-Probe keine Abnahme der Signalintensität statt. In der Referenzmessung von TEMPO ohne Bestrahlung zeigt sich ebenfalls keine Änderung in der Signalintensität.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sich die Zahl aktiver Spinmoleküle, und demnach auch die Zahl EPR-aktiver paramagnetischer Zentren über diesen Zeitraum nicht ändert.^[177] Auch die Spektrenform zeigt keine Änderung über die Zeit – die Hyperfeinaufspaltung oder das Rotationsverhalten ändert sich nicht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass bei der Bestrahlung mit Licht kein Abbau der TEMPO Moleküle zu desaktivierten TEMPO-Formen stattfindet. Weiterhin bewirkt die Bestrahlung keine Änderung in der chemischen Umgebung, weshalb auch keine Änderung in der Molekülstruktur detektierbar ist.

Die Messungen im Vergleich legen die Vermutung nahe, dass das unterschiedliche Verhalten von TEMPO und HPRG auf unterschiedliche chemische Strukturen des paramagnetischen Zentrums zurückzuführen sind. Durch die Bestrahlung mit energiereichem sichtbarem Licht wird das paramagnetische Zentrum beim HPRG insofern beeinflusst, sodass das Radikal nicht mehr stabilisiert werden kann und es zu einer Abnahme der Signalintensität kommt. Da bei TEMPO keine Veränderung auftritt, findet keine Radikaldesaktivierung, beispielsweise durch lichtkatalysierte Abbaureaktionen, statt. Bisher kann keine Aussage dazu getroffen werden, ob die Ursache der Signalabnahme bei HPRG durch eine Degradation des Proteins, einer Fragmentierung oder einer Konformationsänderung oder ähnliches bedingt wird.

3.2.4. Zusammenfassung

Die Messungen zeigten, dass sich das HPRG nicht wie ein typisches Nitroxidradikal, wie beispielsweise TEMPO, verhält. HPRG zeigt bei der Bestrahlung einen Abbau des stickstoffbasierten paramagnetischen Zentrums. Bei der Zugabe von Wasserstoffperoxid oder Eisen(III) und Wasserstoffperoxid baut die Signalintensität des HPRG-Radikals ab, wohingegen bei TEMPO kein Effekt zu beobachten ist. Bei der Anwesenheit von Ascorbinsäure baut das HPRG-Radikal bei der Zugabe von Kupfer oder Wasserstoffperoxid zusammen mit den beiden Eisensalzen auf, während das Nitroxidsignal bei TEMPO auch noch durch Kupfer(II) und Wasserstoffperoxid oder Wasserstoffperoxid alleine wiederaufgebaut wird. Alle beschriebenen Effekte sind grafisch in Abbildung 3.22 noch einmal zusammengestellt.

Aus den bisherigen Messungen geht nicht hervor, über welche genauen Reaktionswege der Auf- und Abbau des paramagnetischen Zentrums bei HPRG erfolgt. Hierbei spielen vermutlich eine Vielzahl von Effekten, wie die Radikalstabilität und die sterische Hinderung oder die mögliche Bindung von Metallionen eine große Rolle. Weiterhin kann vermutet werden, dass das Redoxpotential der einzelnen beteiligten Partner auf sämtliche Reaktionen einwirkt. Ergänzend dazu wurden alle Messungen unter Luftatmosphäre durchgeführt, sodass auch an allen Reaktionen Luftsauerstoff beteiligt sein könnte, weshalb weitere, bisher nicht betrachtete reaktive Sauerstoffspezies an allen Reaktionen beteiligt waren, und gegeben falls so auch chemische Gleichgewichte verschieben konnten.

Bei nachfolgenden Messungen müssten neben elektrochemischen Potentialen einzelner Redoxpaare auch die Kinetik und damit auch die Geschwindigkeitskonstanten berücksichtigt werden. Weiterhin muss eine Möglichkeit gefunden werden, selektiv bestimmte ROS zu erzeugen, diese EPR-spektroskopisch nachzuweisen und deren isolierte Effekte auf HPRG zu betrachten.

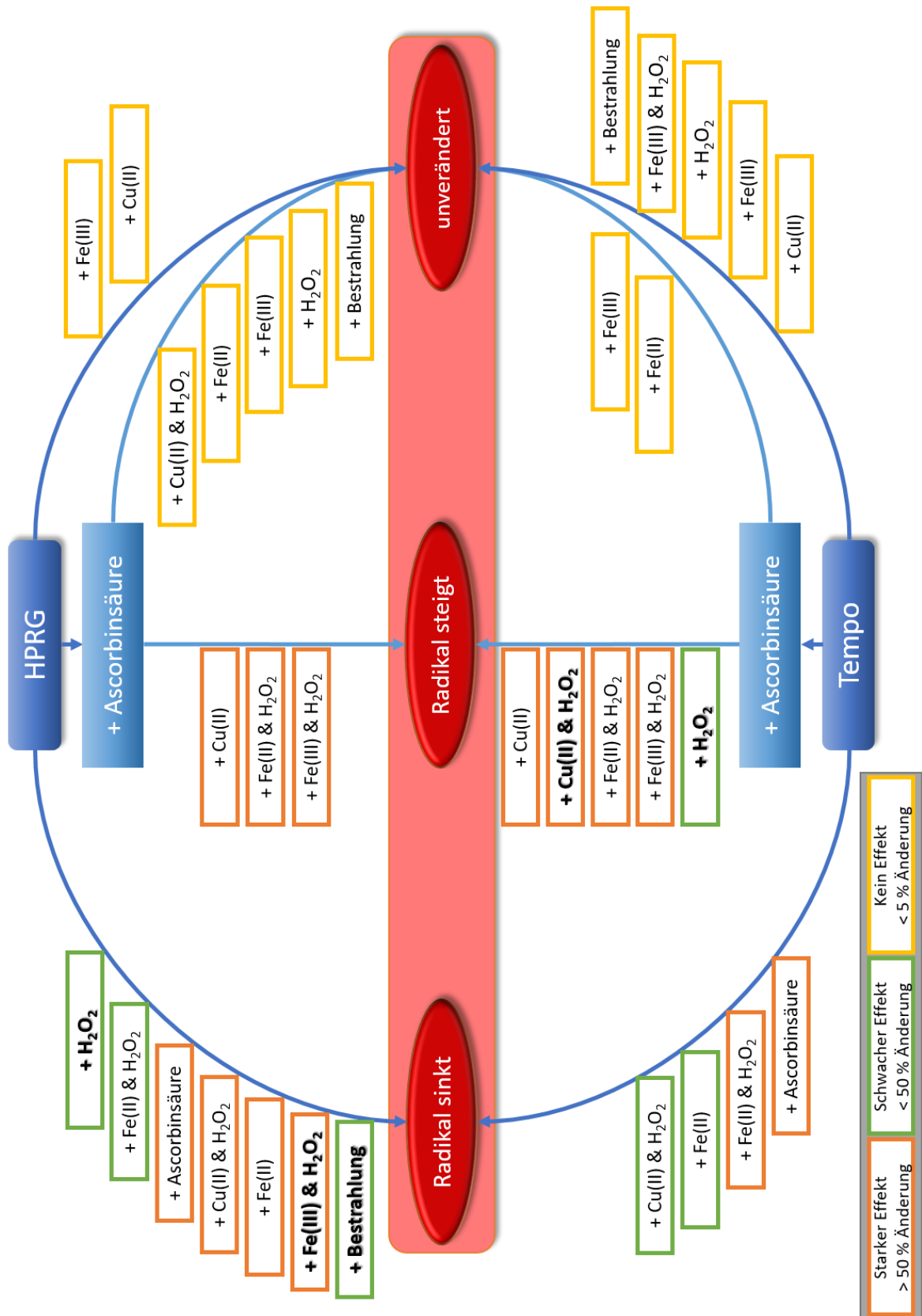


Abbildung 3.22: Zusammenfassung der Effekte verschiedener Reaktionsbedingungen auf TEMPO und auf das HPRG-Radikal.

3.3. EPR-spektroskopische Untersuchung der Ligandenbindung

Die Verwendung verschiedener Spinsonden ermöglicht es unterschiedliche Arten von Wechselwirkungen zu untersuchen.^[178] Mit diesem Ansatz können so auch HPRG-Liganden und zugehörige Peptid-Liganden-Interaktionen charakterisiert werden. Als mögliche Liganden wurden 5- und 16-DSA als Fettsäureanaloga und TOAC als Aminosäureanaloga verwendet, da HPRG dafür bekannt ist, derartige Moleküle im Körper zu binden, wie bereits ausführlich in Kapitel 1.1.3 diskutiert wurde. Weiterhin wurden CAT-1 und Fremys Salz als positiv geladener bzw. zweifach negativ geladener Ligand verwendet, um Rückschlüsse auf geladene Liganden ziehen zu können.

Außerdem wurden noch weitere Spinsonden, wie TEMPO, TEMPOL, TEMPON, 4-Aminotempo oder 4-Carboxytempo, verwendet. Bei diesen Messungen (nicht gezeigt) zeigten jedoch weder die Peptide, noch HPRG einen Unterschied zur Referenz, weshalb von keiner entsprechenden Interaktion ausgegangen wird.

3.3.1. Ligand: Doxylstearinsäure als Fettsäureanaloga

3.3.1.1. 5-Doxylstearinsäure

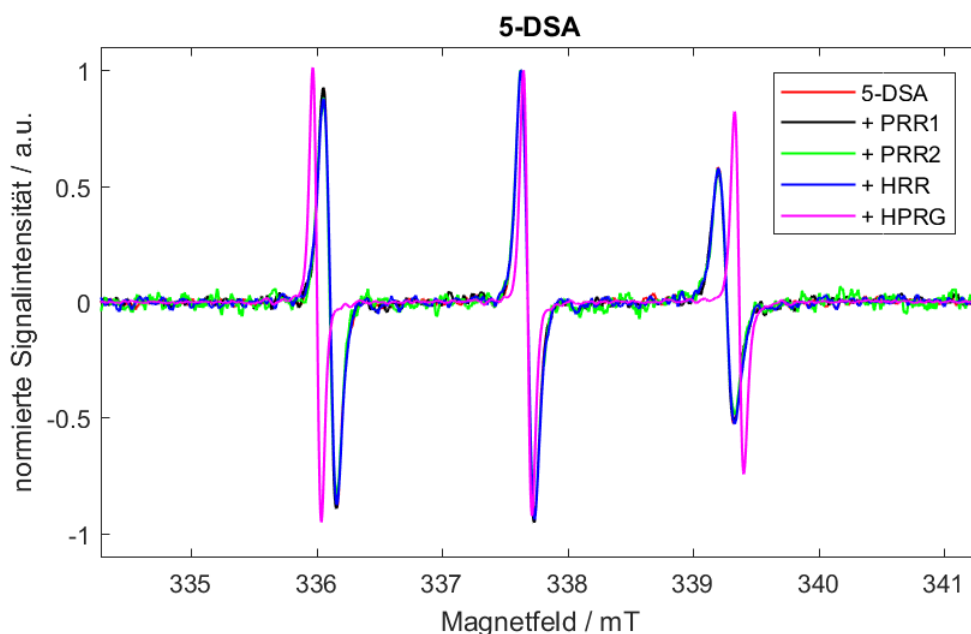


Abbildung 3.23: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 5-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.

In Abbildung 3.23 sind die normierten cw-EPR-Spektren von 5-DSA mit HPRG und den Peptiden gezeigt. Auffällig ist, dass sich optisch die Messung der Sonde mit HPRG sowohl von der Größe der Hyperfeinaufspaltung, als auch von der Form des Spektrums, bezogen auf das

Intensitätsverhältnis der einzelnen Signale, und der Signalbreite, von den anderen unterscheidet.

Die Simulation ergibt für HPRG eine Hyperfeinaufspaltung von 47 MHz, im Vergleich dazu liegen die Hyperfeinaufspaltungen der Peptide und der reinen Sonde in Puffer bei etwa 44,1 MHz. Die Simulationen für die einzelnen Spektren und die zugehörigen Simulationsparameter sind in Abbildung A.11 und Tabelle 3.4 gezeigt. Die um etwa 3 MHz größere Hyperfeinaufspaltung deutet auf eine deutlich polarere Umgebung des Radikals hin. Weiterhin ist das Rotationsverhalten der Sonde im Vergleich zur Referenz verändert. Das wird auch in den Simulationsparametern über die Anisotropie widerspiegelt. Diese beträgt bei HPRG 0,38, was für eine deutlich isotropere Rotation der Sonde spricht. In Kombination mit der Hyperfeinaufspaltung scheint demnach eine attraktive Interaktion zwischen der Sonde und HPRG stattzufinden. Durch diese Wechselwirkungen kann die NO-Bindung des 5-DSA Moleküls, welches normalerweise bevorzugt in einer mizellaren Struktur vorliegt, besser und schneller in allen Raumrichtungen rotieren, weshalb die Anisotropie und die Rotationskorrelationszeit abnehmen.

Tabelle 3.4: Simulationsparameter von der Spinsonde 5-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.

Probe	Anteil / %	g_{iso}	a_{iso} / MHz	τ_c / ps	T_A
5-DSA	100	2,0052	44,10	176,64	0,41
5-DSA + PRR1	100	2,0052	44,17	248,97	0,57
5-DSA + PRR2	100	2,0055	44,17	257,87	0,75
5-DSA + HRR	100	2,0054	44,17	231,12	0,64
5-DSA + HPRG	100	2,0056	47,00	42,24	0,38

Die anderen Simulationen zeigen ebenfalls Unterschiede zwischen der Referenz und den Peptiden. Die Rotationskorrelationszeiten sind bei den peptidhaltigen Proben mit etwa 230 bis 258 ps deutlich langsamer als bei der Referenzmessung, bei welcher die Sonde eine Rotationskorrelationszeit von etwa 176 ps besitzt. Dies lässt auf eine sterische Hinderung und somit auf eine leicht veränderte Struktur des 5-DSAs bei Peptidanwesenheit schließen. Dies wird durch die Bestimmung der Anisotropie bestätigt. Diese beträgt bei der Referenz 0,41, wohingegen bei den peptidhaltigen Messungen die Werte 0,57 für die PRR1, 0,64 und HRR,

sowie 0,75 für die PRR2 erhalten werden. Die NO-Bindung der Sonde kann weniger gut in den drei Raumrichtungen rotieren.

In Abbildung A.10 sind die nicht normierten Spektren der einzelnen Proteine mit der Sonde gezeigt. In denen wird ersichtlich, dass HPRG generell eine deutlich höhere Signalintensität aufweist als die Sondenreferenz, jedoch durch die geringere Linienbreite keine Änderung im Doppelintegral vorhanden ist – womit die effektiven Sondenkonzentrationen bei allen Proben gleich waren.

Während der Temperaturreihe, zu sehen in Abbildung A.9, ist ebenfalls ein unterschiedliches Verhalten von HPRG und den Peptiden zu der Referenz zu beobachten. Für die Messung von 5-DSA in Puffer steigt die Signalintensität und auch das Doppelintegral kontinuierlich an.

Bei den Messungen mit der PRR1 nimmt die Signalintensität bis etwa 40 °C zu, jedoch baut das Signal dann sehr schnell ab, sodass eine Messung nur bis etwa 60 °C erfolgen kann. Es scheint, dass bei 40 °C eine Änderung in der räumlichen Struktur des Peptids stattfindet, weshalb es zu dem raschen Abbau der Sonde kommt. Eine Desaktivierung von Sonden kann durch eine Änderung in der Solvathülle erfolgen, wodurch es zu einer Disproportionierung der Nitroxide kommt.^[179,180] Durch eine Umstrukturierung des Peptids oder auch durch beispielsweise eine Fragmentierung, kann solch einer Änderung erfolgen, weshalb es zu einer Desaktivierung kommen kann. Weiterhin steigt bei höheren Temperaturen die Beweglichkeit von Molekülen, wodurch eine Desaktivierung noch zusätzlich gefördert wird.

Die Messungen mit den Peptiden PRR2 und HRR verhalten sich analog zu der Referenzmessung, weshalb von keiner starken Änderung im Solvationsverhalten der Sondenmoleküle durch die Peptide ausgegangen werden kann. Es findet zwar eine Interaktion zwischen Sonde und Peptiden, wie oben beschrieben, statt, jedoch werden die Sonden vermutlich durch die Peptide nicht derart in ihrer Solvathülle beeinflusst, sodass keine Desaktivierung, wie sie bei der PRR1 beobachtet wurde, erfolgt.

Bei HPRG nimmt von 5 °C an die Signalintensität kontinuierlich bis hin zu etwa 80 °C ab.

Obwohl eine höhere Temperatur eine schnellere Rotation der Sonde zur Folge hat, wird bei Anwesenheit von HPRG dieser Effekt überkompensiert, was ebenfalls für eine Interaktion zwischen HPRG und 5-DSA spricht. Die Solvation der Sonde wird durch HPRG im Vergleich zu der Messung ohne Protein verändert, jedoch findet keine sprunghafte Änderung dieser durch beispielsweise Änderungen in der räumlichen Struktur des Proteins statt.

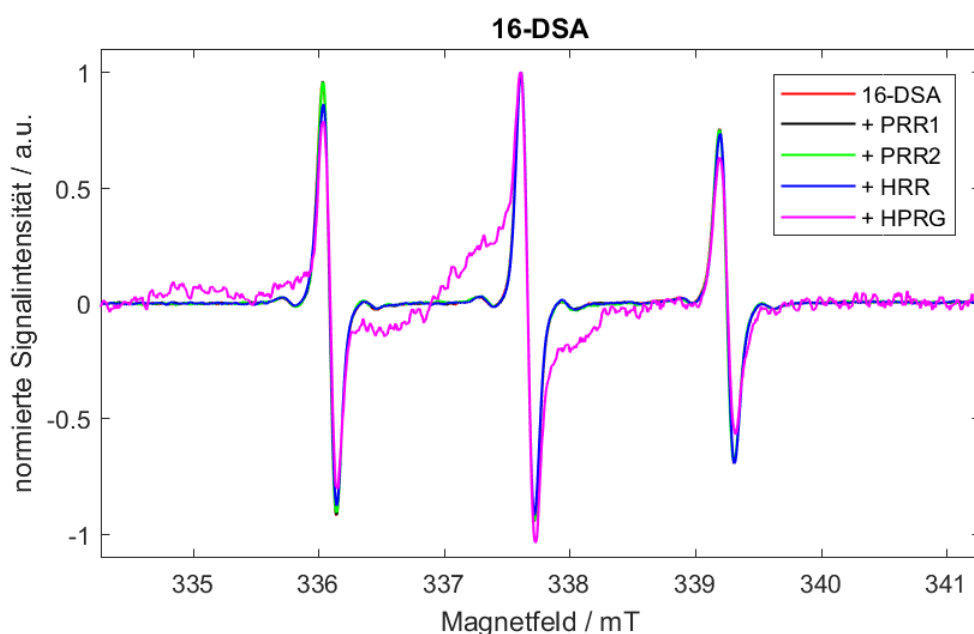
3.3.1.2. 16-Doxylstearinsäure

Abbildung 3.24: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 16-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.

In Abbildung 3.24 sind die normierten Spektren der Messungen mit der Spinsonde 16-DSA gezeigt. Hier wird deutlich, dass sich, ähnlich wie bei 5-DSA, die Messung mit HPRG von den anderen Messungen unterscheidet. Hier sind zwei unterschiedliche Arten von 16-DSA-Molekülen zu erkennen, was durch die Simulation in Abbildung A.14 und die zugehörigen Simulationsparameter in Tabelle 3.5 bestätigt wird. Eine Spezies, welche den Parametern der 16-DSA Referenz in Puffer gleicht, liegt in einem Anteil von 14 % vor, die zweite Spezies mit einem Anteil von 86 %. Demnach wird es sich bei der ersten Komponente um ungebundenes, freies 16-DSA und bei der zweiten Komponente um gebundenes 16-DSA handeln. Vom g -Wert her sind sich beide Komponenten ähnlich, jedoch unterscheiden sie sich stark in der Hyperfeinaufspaltung und in der Rotationskorrelationszeit. Die höhere Hyperfeinaufspaltung von 50,0 MHz lässt auf eine deutlich polarere Umgebung schließen, wobei gleichzeitig eine langsamere Rotation der Sonde mit einer Rotationskorrelationszeit von etwa 6,3 ns stattfindet. Dies deutet ebenfalls auf eine Interaktion der Spinsonde mit dem Protein hin.

Die Peptide zeigen sowohl von den Spektren, als auch von den Simulationsparametern kaum einen Unterschied bezüglich Rotationskorrelationszeiten oder Hyperfeinaufspaltung zur Referenz. Einzig die Anisotropie scheint sich bei den Messungen mit PRR1 und HRR leicht zu unterscheiden, was ein Hinweis auf ein entsprechend leicht verändertes Rotationsverhalten der Sonde bei Peptidanwesenheit liefert. Dabei rotiert die Sonde mit PRR1 leicht isotroper,

mit der HRR leicht anisotroper als ohne Peptidanwesenheit. Demnach könnte davon ausgegangen werden, dass auch mit diesen beiden Peptiden eine Interaktion mit 16-DSA beobachtet werden kann, welche aber deutlich weniger stark ausgeprägt sind als bei dem vollständigen Protein.

Vermutlich ist die Aminosäuresequenz bei diesen Peptiden zu kurz, um bessere Interaktion mit der Sonde eingehen zu können. Es können sich keine Bindungstaschen ausbilden, wie es bei dem vollständigen Protein der Fall ist, weshalb nur geringe Änderungen in den Spektren und deren Simulationsparametern beobachtet werden. Gleichermäßen liefern die Messungen aber auch den Hinweis, dass in diesen beiden Regionen eine Fettsäureinteraktion stattfinden kann.

Tabelle 3.5: Simulationsparameter von der Spinsonde 16-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.

Probe	Anteil / %	g_{iso}	a_{iso} / MHz	τ_c / ps	T_A
16-DSA	100	2,0054	44,20	111,28	0,70
16-DSA + PRR1	100	2,0053	44,20	113,70	0,64
16-DSA + PRR2	100	2,0055	44,17	117,14	0,72
16-DSA + HRR	100	2,0057	44,17	122,48	0,78
16-DSA + HPRG	14	2,0056	44,20	111,28	0,70
	86	2,0057	50,0	6359,52	0,63

Aus den Temperaturreihen in Abbildung A.12 ist ersichtlich, dass, ähnlich wie schon bei 5-DSA, der Abbau der Sonden durch eine abnehmende Signalintensität auf unterschiedliche Weise erfolgt. Die Intensität bei der Referenzmessung nimmt von 5-90 °C kontinuierlich zu.

Bei der Messung von 16-DSA mit der PRR1 nimmt die Signalintensität bis etwa 40 °C zu, baut dann aber ab, sodass eine Messung des EPR-Signals nur bis 75 °C erfolgen kann. Im Vergleich zu der Messung mit 5-DSA, bei welcher nur bis 60 °C gemessen werden konnte, scheint die Sonde durch das Peptid dennoch vor einem Abbau etwas besser geschützt zu werden. Dies liegt vermutlich an der Position der Doxylgruppe. 16-DSA zeigt zwar mit der HRR ein anderes Rotationsverhalten, jedoch hat dieses keine Auswirkungen auf das Verhalten während der Temperaturreihe. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Solvatation der Sonde durch das Peptid nicht temperaturabhängig geändert wird.

Bei HPRG findet ebenfalls eine Abnahme der Signalintensität statt, welcher jedoch erst ab etwa 70 °C beginnt, und nicht wie bei 5-DSA bereits ab 5 °C. Auch hier wird die Position der

Doxylgruppe ausschlaggebend für dieses Verhalten sein. Dafür erfolgt der Abbau von 16-DSA deutlich schneller. Vermutlich strukturiert sich HPRG ab 60 °C neu oder denaturiert partiell, was eine Sondendesaktivierung als Folge hat.

3.3.2. Ligand: TOAC als Aminosäureanaloga

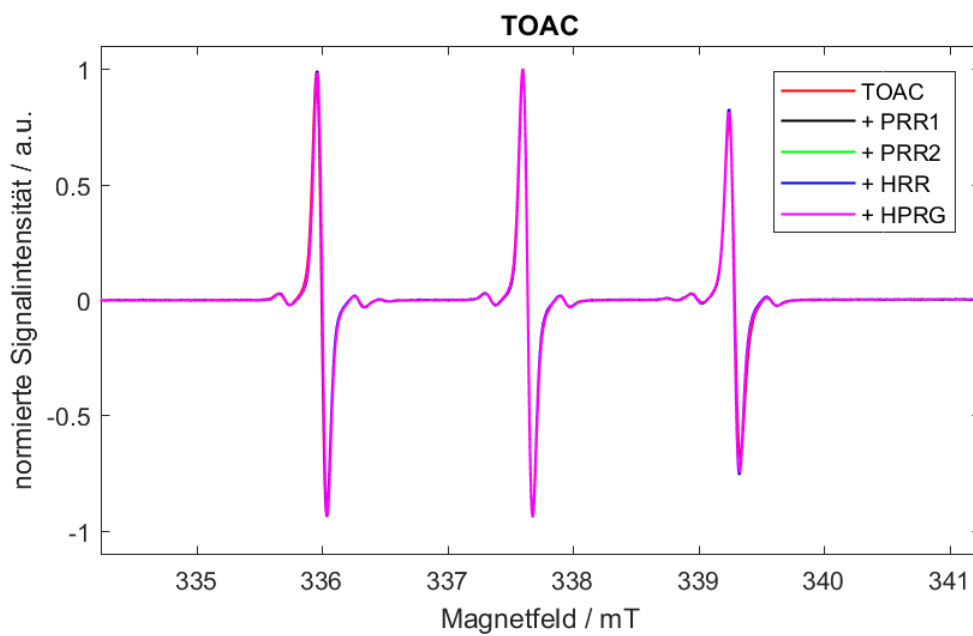


Abbildung 3.25: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde TOAC mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.

In Abbildung 3.25 sind die normierten Spektren der Messungen mit der Spinsonde TOAC gezeigt. Optisch ist in den Spektren kein signifikanter Unterschied bei 20 °C zu erkennen, da sich bei der Darstellung die Linien der einzelnen Signale stark überlagern. Die Simulation in Abbildung A.17 und Tabelle 3.6 zeigt aber, dass sich die Anisotropie, basierend auf den Diffusionstensoren, zwischen der Referenz und den proteinhaltigen Proben unterscheidet, wohingegen aber keine signifikante Änderung in der Hyperfeinaufspaltung oder der Rotationskorrelationszeit erkennbar ist. TOAC in Puffer zeigt im Vergleich zu den Proben mit Protein bzw. Peptid ein deutlich isotroperes Verhalten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine Interaktion zwischen HPRG bzw. den Peptiden und TOAC stattfindet, jedoch diese nur auf schwachen, unspezifischen Wechselwirkungen beruht. Daher ist auch keine Polaritätsänderung oder eine Einschränkung in der Rotationsgeschwindigkeit zu beobachten. Vermutlich ist TOAC als Spinsonde zu klein, um eine sterische Hinderung durch die Proteine zu erfahren, weshalb nur geringfügige Änderungen in den EPR-Spektren vorhanden sind.

Tabelle 3.6: Simulationsparameter von der Spinsonde TOAC mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.

Probe	Anteil / %	g_{iso}	a_{iso} / MHz	τ_c / ns	T_A
TOAC	100	2,0056	45,90	60,41	0,45
TOAC + PRR1	100	2,0056	45,87	61,14	0,63
TOAC + PRR2	100	2,0056	45,77	63,60	0,63
TOAC + HRR	100	2,0058	45,77	63,60	0,63
TOAC + HPRG	100	2,0057	45,80	63,60	0,63

Bei Betrachtung der Temperaturreihen in Abbildung A.15 ist festzustellen, dass die Signalintensität bei allen Proben bereits ab 5 °C abnimmt. Das Doppelintegral zeigt jedoch, dass die Sonden in der Referenz, der PRR2 und der HRR nicht abbauen. Die Änderung in der Signalintensität wird durch eine Zunahme der Linienbreite ausgeglichen, hervorgehend aus den Simulationen, weshalb nicht von einer Desaktivierung der Moleküle ausgegangen werden kann. Bei der Zugabe von der PRR1 zu TOAC findet jedoch ein Abbau ab etwa 35 °C statt, welcher sich bis etwa 65 °C erstreckt. Auch bei HPRG ist eine Abnahme des Doppelintegrals ab 60 °C zu sehen. Demnach kann auch hier von einer sprunghaften Änderung in der Solvation der Sondenmoleküle ausgegangen werden, welcher wahrscheinlich durch Änderungen in der räumlichen Struktur des Proteins bzw. Peptids ausgelöst wird.

3.3.3. Ligand: CAT-1 als positiv geladener Ligand

Bei Verwendung von CAT-1 zeigt bei Raumtemperatur ausschließlich die Messung der PRR2 eine deutliche Interaktion mit der Spinsonde, wie es anhand der Simulationsparameter in Tabelle 3.7 und auch in den normierten Spektren in Abbildung 3.26 zu sehen ist. Die anderen Peptide und auch HPRG unterscheiden sich, sowohl von den Spektren als auch von den Simulationsparametern her, nicht von der Referenz.

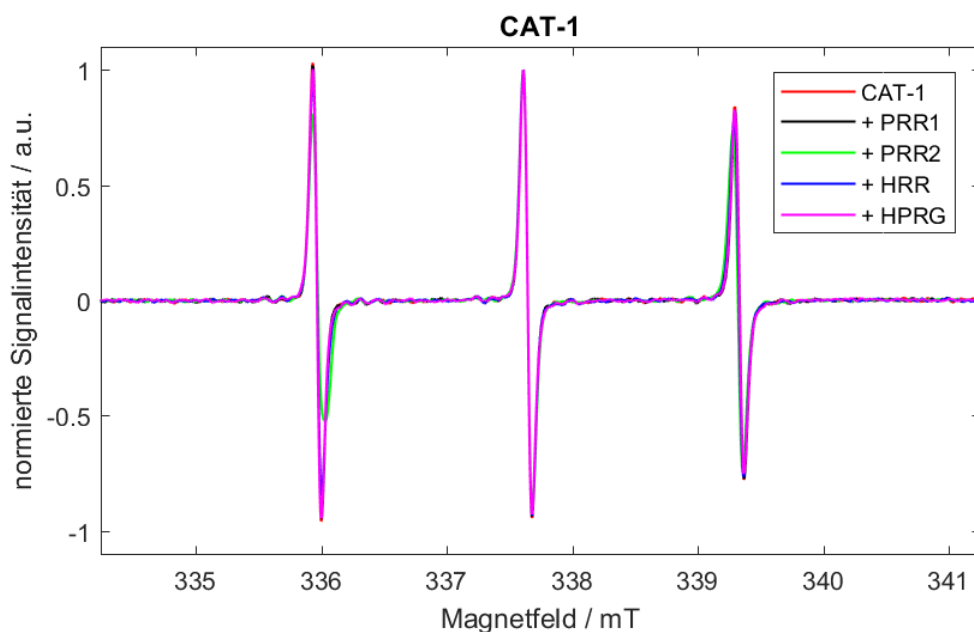


Abbildung 3.26: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der 17-fach deuterisierten Spinsonde CAT-1 mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.

Bei der PRR2 ist in dem Tieffeldsignal eine Schulter zu erkennen, welche als 2. Sonderspezies anhand der Simulationen identifiziert werden konnte. Diese unterscheidet sich leicht in der Hyperfeinaufspaltung, der Rotationskorrelationszeit und der Anisotropie. Die erste Komponente, welche mit einem prozentualen Anteil von 65 % vorliegt, scheint der freien, ungebundenen Sonde zu entsprechen. Dies ist aus den Simulationsparametern in Tabelle 3.7 erkennbar. Die zweite Spezies scheint mit dem Peptid zu interagieren, was durch die höhere Rotationskorrelationszeit von 226,2 ps ersichtlich wird. Weiterhin unterscheidet sie sich vom Rotationsverhalten, sodass die Anisotropie, mit einem Wert von 0,78, im Vergleich zur freien Sonde mit 0,50, deutlich erhöht ist. Die Sonde rotiert weniger isotrop, was als eine spezifische Interaktion zwischen Peptid und Sonde identifiziert werden kann. Weiterhin befindet sich diese Sonderspezies in einer leicht unpolaren Umgebung als die freie Spezies, was aus der geringeren Hyperfeinaufspaltung von 1,1 MHz hervorgeht.

Tabelle 3.7: Simulationsparameter von der 17-fach deuterisierten Spinsonde CAT-1 mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.

Probe	Anteil / %	g_{iso}	$a_{\text{iso}} / \text{MHz}$	τ_c / ns	T_A
CAT-1	100	2,0056	46,93	60,41	0,50
CAT-1 + PRR1	100	2,0057	46,93	60,41	0,50
CAT-1 + PRR2	65	2,0056	46,67	60,41	0,50
	35	2,0055	45,57	226,20	0,78

Probe	Anteil / %	g_{iso}	a_{iso} / MHz	τ_c / ns	T_A
CAT-1 + HRR	100	2,0057	46,93	60,41	0,50
CAT-1 + HPRG	100	2,0057	46,93	60,41	0,50

Die Messung der Temperaturreihen in Abbildung A.18 zeigen, dass lediglich die freie Sonde in Puffer und die Sonde mit Zugabe der HRR bis 90 °C gemessen werden konnte. Die Signalintensität nimmt bei allen Proben ab 5 °C ab, jedoch ist die Abnahme bei den Proben mit PRR1, PRR2 und dem vollständigen Protein deutlich schneller, sodass CAT-1 mit PRR1 nur bis 55 °C, mit PRR2 und HPRG nur bis 75 °C ausgewertet werden konnte. Auffällig ist dabei, dass sich die Spektrenform von CAT-1 mit der PRR2 im Laufe der Temperaturreihe ändert. Ab etwa 50 °C beginnt die zweite, gebundene SONDENSPEZIES zu verschwinden, sodass die Spektren bei höherer Temperatur isotroper erscheinen. Demnach findet eine Änderung an dem Peptid statt, weshalb eine Interaktion zwischen Sonde und Peptid nicht mehr erfolgen kann.

3.3.4. Ligand: Fremys Salz als negativ geladener Ligand

Fremys Salz als zweifach negativ geladener Ligand zeigt vor allem bei der Messung der PRR1 und HPRG sehr starke Effekte. Bei den anderen Peptiden sind die Effekte weniger stark ausgebildet.

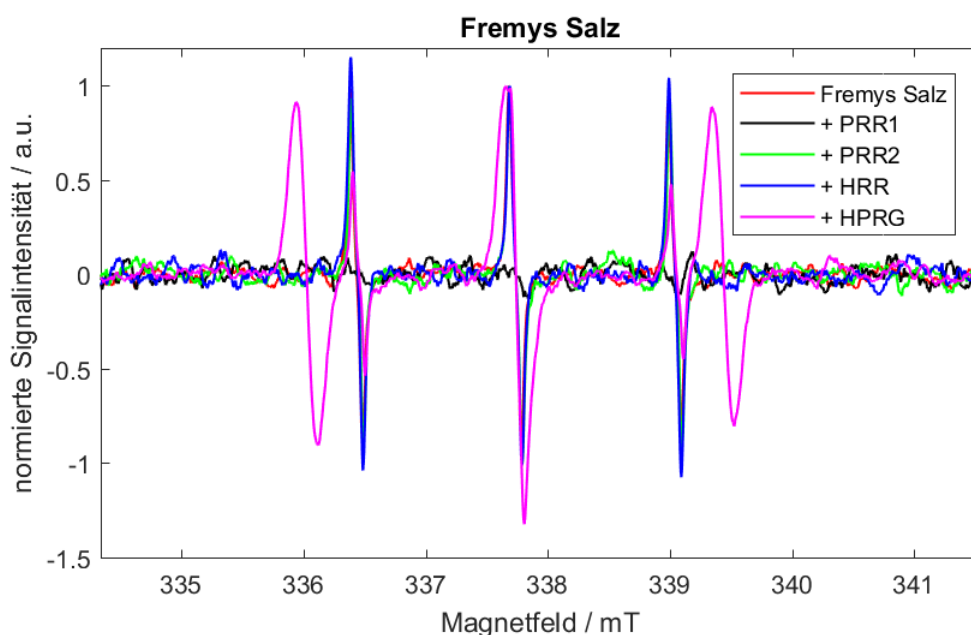


Abbildung 3.27: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde Fremys Salz mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.

Das Peptid PRR1 kann mit Fremys Salz nicht gemessen werden. Sofort nach der Probenpräparation baut die Sonde stark ab, sodass kein EPR-Spektrum messbar ist. Dies deutet auf eine starke Interaktion oder eine hohe Ladungsdichte in der Probe hin, was zu einer Desaktivierung der Sonde führt.

Bei HPRG baut Fremys Salz ebenfalls sehr schnell ab. Jedoch bildet sich hierbei eine zweite Komponente mit einer deutlich höheren Hyperfeinaufspaltung aus.

Tabelle 3.8: Simulationsparameter von der Spinsonde Fremys Salz mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.

Probe	Anteil / %	g_{iso}	a_{iso} / MHz	τ_c / ns	T_A
Fremys Salz (FS)	100	2,0051	36,67	20,47	0,86
FS + PRR1	-	-	-	-	-
FS + PRR2	100	2,0051	36,67	19,44	0,88
FS + HRR	100	2,0051	36,37	20,47	0,86
FS + HPRG	2,5	2,0048	36,37	20,47	0,86
	97,5	2,0049	47,65	140,20	0,66

Die Simulationsparameter von Fremys Salz mit HPRG in Tabelle 3.8 zeigen, dass nur noch etwa 2,5 % der freien Form von Fremys Salz vorliegen, erkennbar an den identischen Simulationsparametern bezogen auf die Referenzmessung. 97,5 % liegen als zweite Spezies in der Probe vor. Bei dem Vergleich der Parameter der zweiten Spezies mit denen des HPRG-Radikals aus Tabelle 3.2 stellt man fest, dass sich die Werte sehr ähnlich sind. Die Hyperfeinaufspaltung ist, wie auch die Rotationskorrelationszeit, für beide Spezies identisch. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um das HPRG-Radikal handelt, welches als 2. Komponente bei der Zugabe von Fremys Salz entsteht. Zur Klärung der Frage, ob es sich nicht doch um eine Fremys Salz Spezies mit identischen Parametern wie die des HPRG-Radikals handelt, wurden Messungen mit ^{15}N -markiertem Fremys Salz durchgeführt. Dies sind in Abbildung 3.28 gezeigt.

Diese Messungen zeigten, dass dabei ein zusätzliches ^{14}N -Radikal entstehen muss – es findet anscheinend ein Radikalübergang zwischen dem ^{15}N -Kern der Sonde und einem ^{14}N -Kern an dem Protein statt. Vermutlich wirkt Fremys Salz hierbei als mögliches Oxidationsmittel auf das Protein, an welchem das entsprechende Radikal entsteht. Dabei kann auch hier nicht analysiert werden, an welcher Position am Protein das Radikal übergeht bzw. gebildet wird.

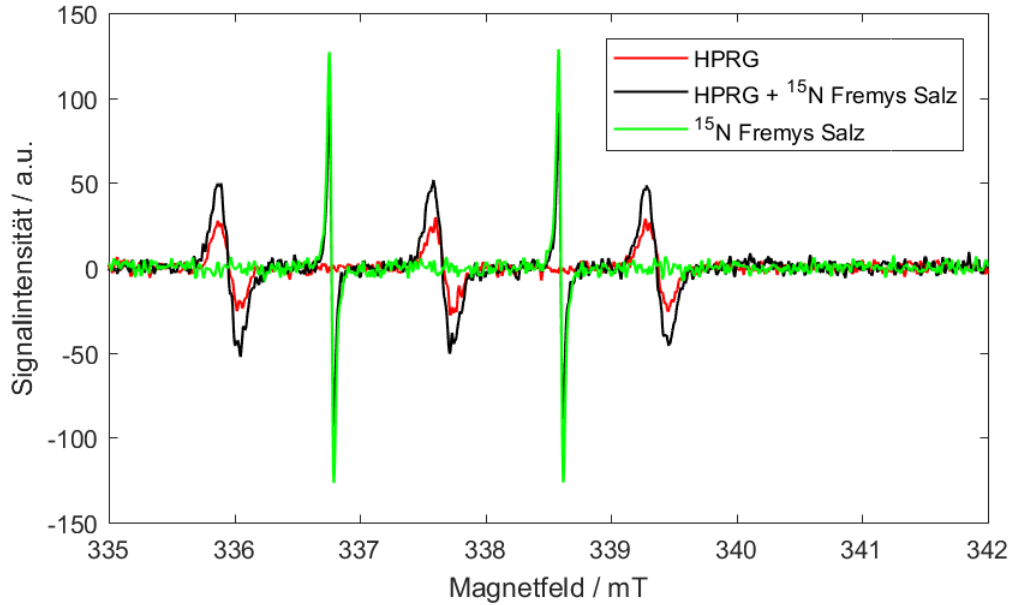


Abbildung 3.28: cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG und ¹⁵N-markiertem Fremys Salz. Da für diese Messung kein reduziertes HPRG verwendet wurde, ist hier neben der Probe und der Sondenreferenz auch HPRG ohne Sondenanwesenheit in gleicher Konzentration gezeigt

In diesem Zusammenhang besteht die Möglichkeit, dass auch bei PRR1 ein entsprechender Radikalübergang stattfindet, wobei das entstehende Radikal durch das Peptid jedoch nicht stabilisiert werden kann, aufgrund nicht-vorhandener Sekundär- bzw. Tertiärstruktur, wie es bei dem vollständigen Protein der Fall ist.

3.3.5. Labeln von HPRG mittels MTSSL

Für rbHPRG werden die Cysteine C264 und C294 als frei angenommen, da sich dort eine Zinkbindungsposition befinden soll.^[14,17] Es besteht daher die Möglichkeit, diese Cysteine zu nutzen, um ein Spinlabel kovalent zu binden. Dazu wurde MTSSL, ein Maleimidoproxyl-Spinlabel, gewählt. Die Reaktion zwischen Aminosäure und Spinlabel ist in Abbildung 3.29 gezeigt.

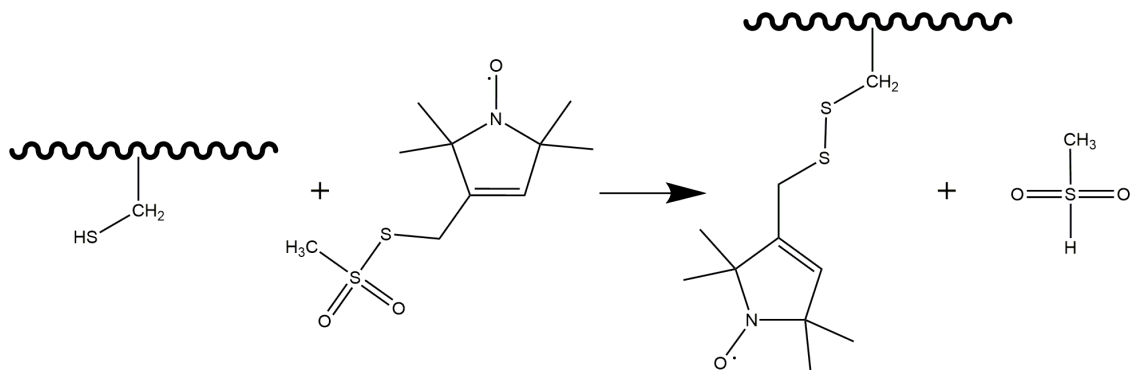


Abbildung 3.29: Reaktion zum Labeling von der Thiolgruppe eines Cysteins mit MTSSL.

Der Labelansatz wurde in PBS pH 7.4 mit einem 10-fachen Überschuss an MTSSL durchgeführt, welches in Ethanol gelöst war. Nach der Probenpräparation wurde der Ansatz im Dunkeln bei 4 °C für 20 h inkubiert. Die Abtrennung des freien Labels von dem gelabelten Protein erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 5.4 gezeigt. In Fraktion 2 und 3 eluiert das Protein, zu sehen in der UV-Detektion bei 280 nm. Da MTSSL nicht UV-aktiv ist, wurde ebenfalls die Leitfähigkeit ebenfalls gemessen. Ab Fraktion 6 bis etwa Fraktion 10 eluiert eine weitere Substanz. Alle Fraktionen wurden EPR-spektroskopisch gemessen und die erhaltenen Spektren für die Fraktionen 2 bis 5 sind in Abbildung 5.5 gezeigt. Hier wird deutlich, dass sich die Spektren, welche von den Fraktionen 2 und 3 stammen, in der Form deutlich von denen des 2. Signals im Bereich der Fraktionen 6 bis 10 unterscheiden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Protein mittels MTSSL möglich war. Die zwei weiteren Signale bei dem Spektrum von Fraktion 5 stammen vermutlich von kovalent verknüpftem MTSSL, welche als Nebenprodukte entstehen können. Diese zusätzlichen Aufspaltungen in Abbildung 5.5 sind typisch für Diradikale.^[181,182]

Um genauere Aussagen über die Rotationsdynamik und über das Verhalten der am Protein gebundenen Spinlabel treffen zu können, wurden Fraktion 2 und 3 vereinigt und über Amicon Ultra – 0,5 ml Ultracel Zentrifugenfilter (MWCO: 30 kDa) aufkonzentriert. Der Vergleich der Spektren zwischen freiem MTSSL und gelabeltem HPRG ist in Abbildung 3.30 zu sehen.

Das Spektrum des freien, ungebundenen MTSSLs (ohne ausgebildete Diradikale) zeigt deutlich schärfere Linien und ein anderes Intensitätsverhältnis zwischen den drei Signalen. Dies deutet bereits auf eine andere Rotationsdynamik hin als bei dem proteingebundenen Spinlabel. Bei dem gelabelten HPRG hingegen sind die Sonden-Signale deutlich verbreitert. Die Rotationsdynamik der Sonde ist hier eine deutlich andere als bei freiem MTSSL. Dies zeigt bereits, dass es möglich ist, HPRG über die freien Cysteine zu labeln.

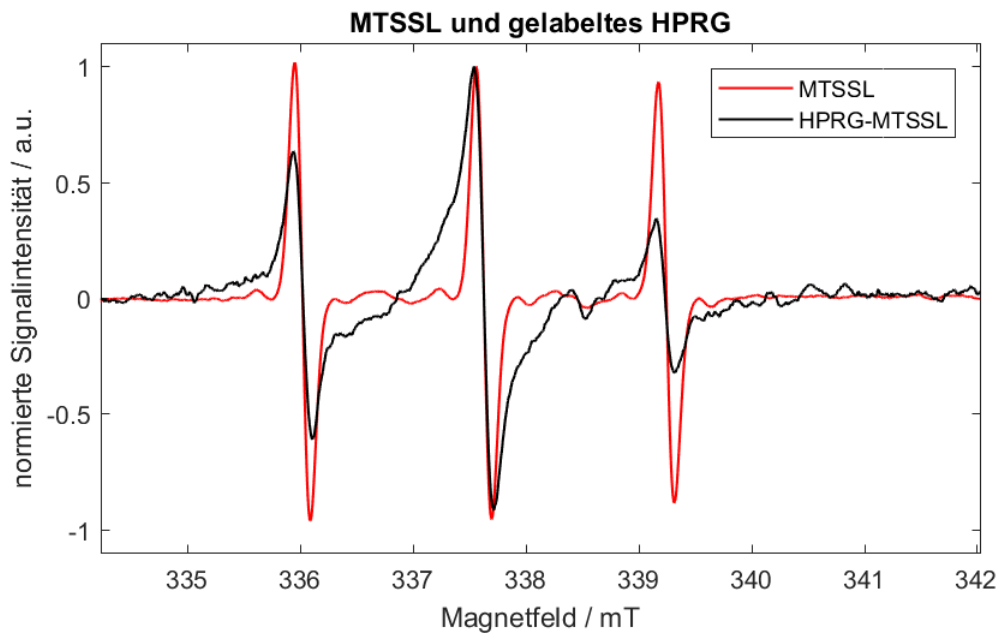


Abbildung 3.30: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde MTSSL und dem mit MTSSL-gelabelten HPRG.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Simulationen in Tabelle 3.9, so werden weitere Unterschiede zwischen dem Sondenverhalten deutlich. Die Simulationen zu den Spektren sind in Abbildung A.26 gezeigt.

Tabelle 3.9: Simulationsparameter für freies MTSSL und mit MTSSL gelabeltes HPRG.

Probe	Anteil / %	g_{iso}	$a_{\text{iso}} / \text{MHz}$	τ_c / ps	$\omega_{\text{ex}} / \text{MHz}$	T_A
MTSSL	100	2,0054	45,07	40,06	0	0,40
HPRG-MTSSL	20	2,0053	44,73	614,00	0	0,86
	80	2,0053	44,73	614,00	9	0,86

Zuerst muss erwähnt werden, dass es nicht möglich war, gelabeltes Protein mit ausschließlich nur einer Sondenspezies zu simulieren. Es liegen zwei unterschiedliche, gelabelte Proteine mit einem Verhältnis von 20:80 vor. Diese beiden Komponenten unterscheiden sich jedoch nur darin, dass einmal eine Austauschwechselwirkung, hier Heisenbergaustausch, vorliegt. Dieser Austauschinteraktion tritt bei Abständen zwischen ungepaarten Elektronen unter etwa 1,5 nm auf, da es sich hierbei um eine direkte Kontaktwechselwirkung handelt.^[85] Es kann davon ausgegangen werden, dass es möglich war, 80 % des gelabelten HPRGs auch über beide freien Cysteine zu labeln. Die Austauschfrequenz zwischen beiden Nitroxidgruppen beträgt 9 MHz. Bei 20 % des gelabelten HPRGs wurde keine Austauschfrequenz ermittelt, weshalb von einfach gelabelten HPRG ausgegangen wird, bei welchem nur ein Cystein für das Spinlabel

zugänglich war. Dies kann mehrere Ursachen haben: Zum einen kann aufgrund sterischer Hinderung bei einem Teil der Proteine kein Labeling erfolgt sein. Zum anderen kann die Nitroxidgruppe bereits abreagiert sein, bedingt durch eine Nähe zu einer anderen paramagnetischen Spezies oder durch Oxidation bzw. Reduktionsprozesse.

Die Hyperfeinaufspaltung ist bei freiem MTSSL mit 45,07 MHz leicht höher als bei dem gebundenen MTSSL, wo diese nur 44,73 MHz beträgt. Dieser Unterschied ist minimal, kann aber auf eine leicht unpolare Umgebung der gebundenen Sonde hindeuten. Wenn die Sonde an das Protein gebunden ist, wird die Nitroxidgruppe des Spinlabels leicht von der polaren Umgebung, hier der PBS-Puffer, abgeschirmt.

Auch die Rotation von MTSSL unterscheidet sich zwischen freiem und gebundenem Spinlabel. Während die Rotationskorrelationszeit von freiem Spinlabel 40,1 ps beträgt, ist sie in ihrer gebundenen Form mit 614,0 ps deutlich langsamer. Das Label rotiert langsamer, da die Rotation in zwei Achsen durch die kovalente Bindung deutlich eingeschränkt wird. Dies wird auch durch die Berechnung der Anisotropie bestätigt. Für die freie Sonde beträgt die Anisotropie 0,40, wohingegen bei dem gelabelten Protein ein Wert von 0,86 berechnet wurde. Betrachtet man die Temperaturreihen von freiem MTSSL und gelabeltem HPRG in Abbildung A.25, so fällt auf, dass bei MTSSL mit steigender Temperatur zunächst ein Diradikal zwischen 30 °C und 40 °C ausbildet, dessen Signalintensität mit steigender Temperatur jedoch wieder abnimmt. Bei kovalent verknüpften MTSSL findet diese Ausbildung nicht statt. Die Signalintensität nimmt bei HPRG bis etwa 70 °C zu, dann nimmt die Signalintensität wieder ab. Weiterhin ändert sich die Rotation des Spinlabels dahingehend, dass diese mit steigender Temperatur deutlich schneller und isotroper rotiert, was bei freiem MTSSL nicht zu beobachten ist. Dort ändert sich nur die Signalintensität, aber nicht deren Verhältnisse zueinander. Die zweite, kovalent verknüpfte MTSSL-Spezies (mit Heisenbergaustauschwechselwirkung) scheint sich während der gesamten Temperaturreihe kaum zu ändern. Die Signalintensität und die Signalform bleibt während der Reihe in den nicht normierten Spektren nahezu konstant, was auf eine deutliche Einschränkung der Rotation und auch auf eine Art Einschluss der involvierten Spinlabel hindeutet. Erst ab etwa 50 °C nimmt die Signalintensität, zu erkennen vor allem als Schulter des Zentralfeldsignals leicht ab, was auch eine Konformationsänderung des Proteins bei eben dieser Temperatur schließen lässt.

3.3.6. Zusammenfassung

Zusammenfassen lässt sich sagen, dass deutliche Unterschiede zwischen den Peptiden bzw. HPRG bezüglich der Interaktion mit den Sonden besteht. Während HPRG vor allem mit den Fettsäureanaloga, 5-DSA und 16-DSA, und Fremys Salz interagiert, zeigt PRR2 mit CAT-1 eine Interaktion.

Das Peptid PRR1 hingegen liefert keine Informationen über eine Wechselwirkung mit den Sonden, zeigt aber immer einen schnelleren Abbau des Sondersignals, sodass es sich dabei vermutlich um einen peptidspezifischen Effekt handelt. Die Ursache muss durch eine Änderung in der Solvation in der Probe bedingt sein, ausgelöst durch die Peptidanwesenheit. Eine Abnahme des Doppelintegrals findet mit allen Sonden im Temperaturbereich zwischen 30-40 °C statt, wobei die EPR-Spektren nur bis maximal 70 °C auswertbar sind. Folglich scheint in diesem Temperaturbereich das Peptid PRR1 eine strukturelle Änderung zu erfahren, welches sich in der Änderung der Solvation auswirkt. Die genaue strukturelle Änderung kann mittels EPR-Spektroskopie nicht weiter bestimmt werden. Man könnte aber vermuten, dass es sich hierbei um eine Fragmentierung, eine Umfaltung oder eine nicht vom Puffer kompensierte pH-Wert-Änderung handelt, welche temperaturabhängig durch das Peptid induziert wird.

Es gibt deutliche Unterschiede zwischen den Messungen von 5-DSA und 16-DSA mit HPRG, obwohl es sich bei beiden Sonden um Fettsäureanaloga handelt. Die Position der Doxylgruppe hat dabei einen großen Einfluss auf die Art der Interaktion mit dem Protein. Wohingegen bei HPRG mit 16-DSA deutlich eine zweite Spezies neben reinem 16-DSA zu erkennen ist, ist bei 5-DSA eine veränderte Hyperfeinaufspaltung und Rotationsdynamik festzustellen, aber kein Zweikomponenten Spektrum. Man kann also davon ausgehen, dass die Doxylgruppe als Nitroxid-tragende Gruppe bei 16-DSA in der Rotation eingeschränkt ist. Im Vergleich dazu ist eine deutliche freiere Rotation der Doxylgruppe bei 5-DSA zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass beide Fettsäureanaloga an dem hydrophoben Teil an dem HPRG binden.

Das Peptid PRR2 zeigt, wie oben bereits beschrieben, mit CAT-1 eine deutliche Interaktion in Form einer zweiten, rotationseingeschränkten Komponente der Sonde. Da HPRG keine Interaktion zeigt, ist davon auszugehen, dass diese Region im vollständigen Protein nicht, oder nicht ausreichend detektierbar, für diese Sonde zugänglich ist oder die Bindung durch unspezifische Interaktionen überlagert und mittels EPR-Spektroskopie nicht aufgelöst werden.

Weiterhin interagiert die PRR2 ebenfalls mit 5-DSA, was anhand der langsameren Rotation der Sonde im Vergleich zur Referenz erkennbar ist. Die Interaktion mit 16-DSA scheint nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt zu sein. Daher kann vermutet werden, dass für die Interaktion die Carboxylgruppe der Doxylstearinsäure verantwortlich ist, welche sich bei 5-DSA näher an der Doxylgruppe befindet und so eine Einschränkung der Rotation beobachtet werden kann. Auch mit den anderen beiden Peptiden zeigen die fettsäureanalogen Sonden eine veränderte Rotationsdynamik als bei der Referenz, welche keine Peptide beinhaltet. Mit 5-DSA ist die Rotation generell deutlich anisotroper und die Rotationskorrelationszeit ist deutlich größer als bei der Referenz. Die Sonde rotiert langsamer und eingeschränkter. Bei 16-DSA hingegen ist keine Änderung in der Rotationskorrelationszeit zu sehen, aber im Rotationsverhalten. Bei PRR1 rotiert die Sonde isotroper, wohingegen sie bei Zugabe von dem Peptid der HRR anisotroper rotiert. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass bei PRR1 bevorzugt eine Interaktion an dem hydrophilen Teil der Fettsäure stattfindet, wohingegen bei der HRR die Interaktion an dem hydrophoben Teil erfolgt.

Bei TOAC zeigt die Zugabe der Peptide bzw. des Proteins eine leicht veränderte Rotationsdynamik, jedoch keine interpretierbare Interaktion. Vermutlich ist die Sonde zu klein, um Interaktionseffekte durch Rotationseinschränkung oder Änderungen in der Hyperfeinaufspaltung auflösen zu können.

Schaut man sich das gelabelte HPRG an, so erkennt man zum einen, dass es möglich ist, HPRG über die freien Cysteine zu labeln und zum anderen, dass es ebenfalls möglich ist, über beide Cysteine gleichzeitig zu labeln, was durch die hohe Austauschwechselwirkung belegt wird.

3.4. pH-abhängiges Lösungsverhalten des HPRGs

Um die Untersuchungen der pH-abhängigen Kupferbindungsstudien an HPRG durchführen zu können, muss geklärt werden, ob der pH-Wert selbst einen Einfluss auf die Struktur des HPRGs hat. Dazu wird das elektrophoretische Verhalten untersucht. Weiterhin wurden Fluoreszenzmessungen und Messungen der dynamischen Lichtstreuung von HPRG und cw-EPR-Messungen des radikalischen HPRGs bei verschiedenen pH-Werten angefertigt.

3.4.1. Elektrophoretisches Verhalten

Für eine Untersuchung der Fragmentierung des Proteins durch eine saure oder basische Umgebung wurden nicht-reduzierende SDS-PAGEs angefertigt, um die strukturellen Änderungen des Proteins über einen längeren Zeitraum nachvollziehen zu können. Dazu wurden die Proben bei 37 °C über einen Zeitraum von 4 Wochen inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten gelelektrophoretische Messungen von diesen Proben angefertigt. Exemplarisch sind hier die Bilder der Gele nach einem Tag Inkubation in Abbildung 3.31 und nach einer dreiwöchigen Inkubation in Abbildung 3.32 gezeigt.

Da es sich bei HPRG um ein Glykoprotein handelt, welches durch den hohen Zuckeranteil nicht die gleiche Menge SDS wie ein nicht-glykosiliertes Protein bindet, können die Molekulargewichte des Proteins bzw. von den Fragmenten des Proteins nicht exakt anhand des Markers abgelesen werden.

Nach einem Tag Inkubation ist auf dem Gel nur eine geringe Änderung des Proteins zu erkennen. Alle Proteinproben erscheinen als zwei, eng beieinanderliegende Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 70-75 kDa. Eine weitere, nicht genau definierte Bande findet sich im Bereich über 116 kDa, bei welchen vermutlich von Proteindimeren ausgegangen werden kann. HPRG läuft auf den nicht-reduzierenden Gelen meist in Form von zwei, nahe beieinanderliegenden Banden, welche vermutlich durch unterschiedliche Proteinkonformere herrührt, da keine Aufspaltung der Sekundärstrukturen durch Zugabe von Reagenzien wie DTT oder β -Mercaptoethanol erfolgt.^[183,184] Bei den pH-Werten ab pH 8,5 tritt noch eine zusätzliche, schmale Bande im Bereich von 50 kDa auf. Bei pH 12 wirkt die Proteinbande im Vergleich zu den anderen Proben weniger aufgelöst. Dies kann bereits auf eine partielle Hydrolyse des Proteins im Basischen hindeuten. Auch im Bereich der Proteindimere bei knapp über 116 kDa ist die Bande bei pH 12 weniger stark ausgebildet, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass durch den pH-Wert bereits erste Fragmentierungen auftreten.

pH-abhängiges Lösungsverhalten des HPRGs

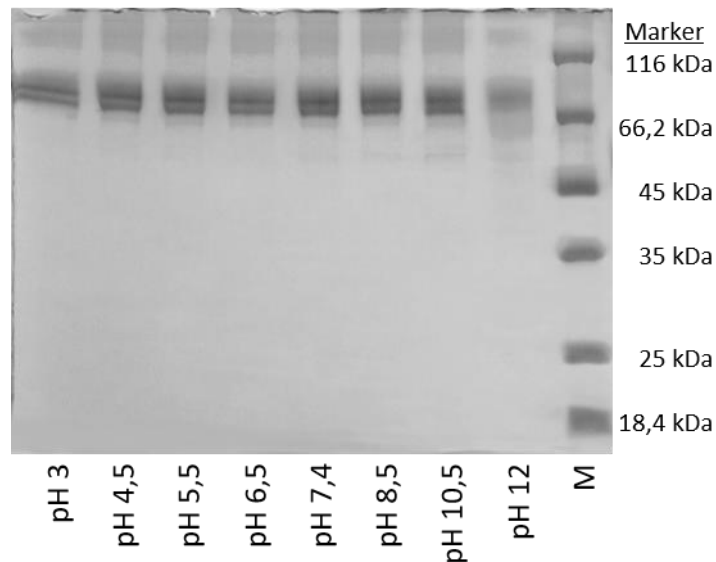


Abbildung 3.31: SDS-PAGE mit einem 10 % Trenngel unter nicht-reduzierenden Bedingungen von HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten mit Marker (M) und bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenz. Das Gel wurde nach einem Tag Inkubation im jeweiligen Puffer angefertigt.

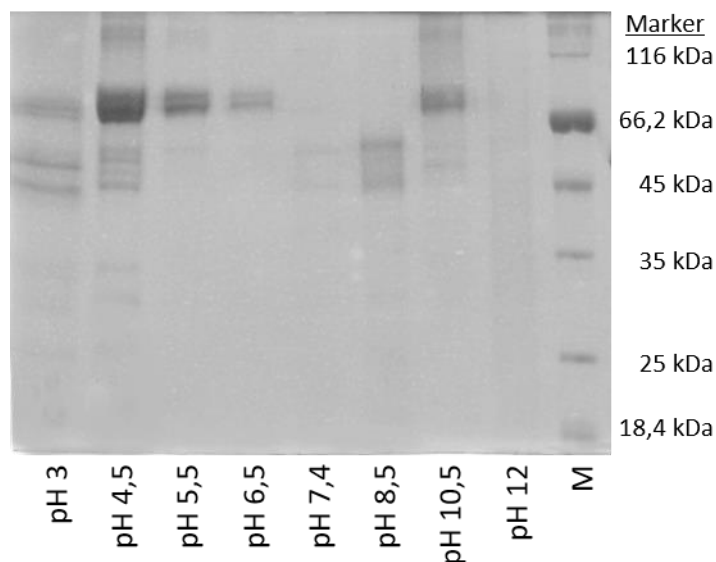


Abbildung 3.32: SDS-PAGE mit einem 10 % Trenngel unter nicht-reduzierenden Bedingungen von HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten mit Marker (M) und bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenz. Das Gel wurde nach drei Wochen Inkubation im jeweiligen Puffer angefertigt.

Nach 3 Wochen Inkubation bei 37 °C bei verschiedenen pH-Werten ist das HPRG, mehr oder weniger vollständig, fragmentiert. Bei pH 12 ist HPRG vollständig in einzelne Peptidstrukturen, möglicherweise auch in einzelne Aminosäuren, fragmentiert, welche unterhalb der Markerbande bei 25 kDa liegen. Ähnlich verhält es sich bei pH 3, nur das noch einzelne Banden im Bereich von 45 bis 66 kDa erkennbar sind.

Auffällig ist, dass vor allem bei pH 4,5, pH 5,5 und pH 6,5 anscheinend keine große Änderung bezüglich der zu den Messungen nach einem Tag vorhanden ist. Bei pH 4,5 fand eine leichte

Fragmentierung des Proteins in kurzkettige Proteine mit den Molekulargewichten im Bereich von 45-55 kDa statt, jedoch ist immer noch die Ursprungsbande fast unverändert mit einer Molekularmasse von etwa 70-75 kDa zu erkennen. HPRG ist durchaus im schwach sauren Medium stabil. Die erhöhte Stabilität im Vergleich zu neutraler oder basischer Umgebung ist vermutlich auf die physiologische Funktion von HPRG zurückzuführen. Durch den geringen pH-Wert und die damit verbundene positive Ladung des Proteins kann unter anderem die Assoziation mit beispielsweise Zink oder die Spaltung durch Serinproteasen reguliert werden.^[57] Es kann davon ausgegangen werden, dass HPRG bevorzugt in saurer Umgebung stabiler ist als in basischer Umgebung. Zu beachten ist auch, dass bei physiologischen Bedingungen bei pH 7,4 ebenfalls nach 3 Wochen ein Abbau des Proteins erfolgt.

Die Gelbilder zeigen, dass grundsätzlich eine zeitnahe Messung des intakten Proteins, auch bei sehr sauren oder basischen pH-Werten, möglich ist. Nach etwa einem Tag beginnt eine Fragmentierung, welche nach einigen Tagen bei allen pH-Werten beginnt, jedoch schneller verläuft, je drastischer die Bedingungen sind.

3.4.2. Messung des radikalischen HPRGs

Die Messungen des HPRG-Radikals in PBS bei verschiedenen pH-Werten ohne Zugabe einer Spinsonde ist für 20 °C in Abbildung 3.33 gezeigt. Auch hier sind die typischen Stickstoffaufspaltungsmuster bei Messung aller HPRG-Proben zu erkennen, wie es bereits in Kapitel 3.1.5 erklärt wurde. Jedoch sind in den Spektren keine unaufgelösten Hyperfeinkopplungen zu sehen, was durch das hohe Grundrauschen der Spektren bedingt ist. An der Spektrenform und der Hyperfeinaufspaltung sind keine Änderungen in Abhängigkeit des pH-Wertes zu erkennen. Die Polarität und die chemische Umgebung des Radikals sind damit ebenfalls unabhängig vom pH-Wert. Der pH-Wert scheint jedoch einen Effekt auf die Signalintensität zu haben. Die Konzentration des Proteins in allen Proben war identisch, sodass Intensitätsunterschiede durch den pH-Wert bedingt sein müssen. Bei pH 3 ist nur ein sehr schwaches EPR-Spektrum zu erkennen, welches jedoch von dem Grundrauschen unterschieden werden kann. Mit zunehmendem pH-Wert steigt das Signal an, bis ab pH 8,5 keine höhere Signalintensität mehr auftritt.

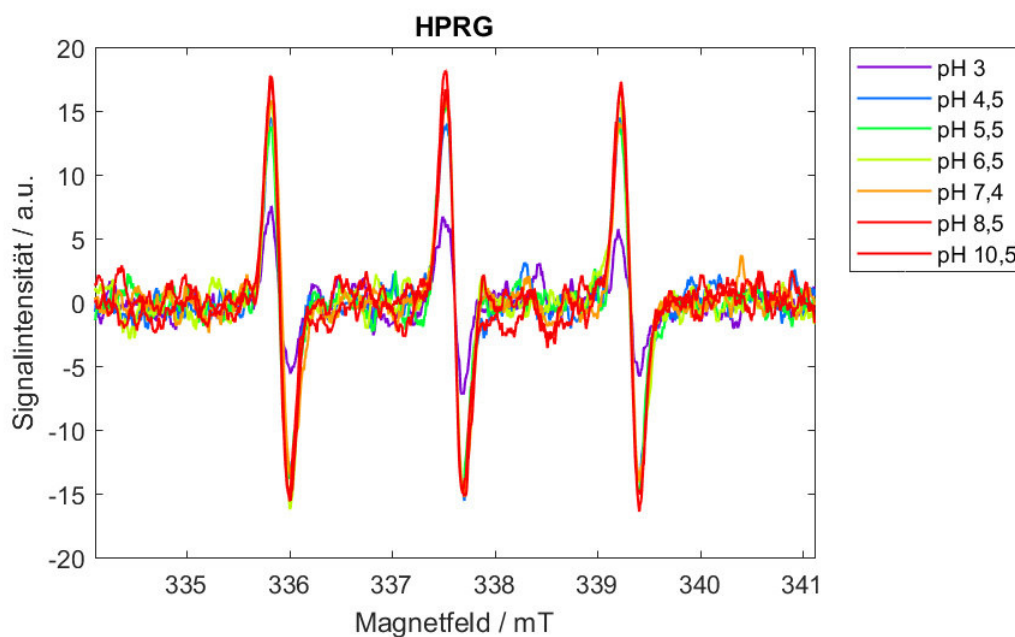


Abbildung 3.33: cw-X-Band-EPR-Spektren von 250 μM HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 20 $^{\circ}\text{C}$.

Auf die Auswertung der Rotationskorrelationszeit und die Anisotropie durch Simulation wurde aufgrund des Signal-Rausch-Verhältnisses verzichtet.

3.4.3. Fluoreszenzspektroskopie

Neben den EPR-spektroskopischen Messungen wurden auch Fluoreszenzmessungen durchgeführt, um den Effekt des pH-Einflusses auf den intrinsischen Fluoreszenzmarker Tryptophan beobachten zu können. Die Fluoreszenzemissionsspektren bei 20 $^{\circ}\text{C}$ und die Emissionsmaxima, mit samt ihrer zugehörigen Wellenlängen, sind in Abbildung 3.34 zusammengefasst. Da HPRG drei Tryptophane in seiner Aminosäuresequenz enthält, erhält man in der Fluoreszenz nur ein mittleres Fluoreszenzspektrum. Dadurch, dass es sich bei HPRG um ein Protein mit intrinsisch ungeordneten Regionen handelt, liegt die Emissionswellenlänge bei physiologischen Bedingungen bei 344 nm. Dies impliziert, dass die Tryptophane sich bereits in einer hydrophileren Umgebung befinden. Das Emissionsmaximum erreicht bei pH 8,5 ein Wellenlängenminimum, was auf eine hydrophobere Umgebung der Tryptophane hindeutet. Bei geringeren pH-Werten ist ein Plateau bei einer Wellenlänge von etwa 344 nm zu erkennen, welches sich von pH 3 bis pH 5,5 erstreckt. Anschließend nimmt die Emissionswellenlänge bis pH 8,5 ab. Bei höheren pH-Werten findet ein sprunghafter Anstieg zu höheren Emissionswellenlängen statt. Diese Rotverschiebung spricht für eine deutlich hydrophilere Umgebung der Tryptophane und somit auch für eine mögliche Konformationsänderung bzw. eine mögliche Proteinfaltung. Durch eine Öffnung der

ursprünglichen, geordneten Teilstrukturen des HPRGs ist es möglich, dass Wasser aus dem Puffer in die Nähe der Tryptophane gelangt.

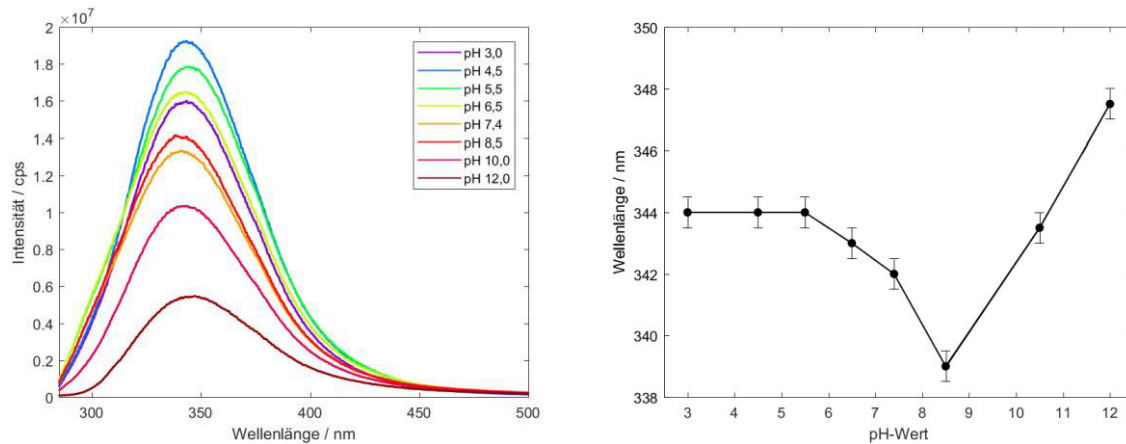


Abbildung 3.34: Fluoreszenz-Emissionsspektren von 12,5 µM HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten (links) und die ausgelesenen Emissionsintensitäten und entsprechenden Wellenlängen des Emissionsmaximums (rechts). Die Anregungswellenlänge ist 280 nm.

3.4.4. Dynamische Lichtstreuung

Neben den elektrophoretischen und fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden auch Messungen der dynamischen Lichtstreuung durchgeführt, um einen Eindruck über die hydrodynamische Proteingröße zu erhalten. Dabei wurde die Lichtstreuung in 175 ° und in 90 ° zwischen dem eingestrahlten Laser und dem Detektor gemessen, welche im Folgenden als Rückwärtsstreuung und Seitwärtsstreuung bezeichnet werden. Die erhaltenen Intensitätsautokorrelationen und die entsprechenden Größenverteilungen sind in Abbildung 3.35 zusammengestellt.

In allen Intensitätsautokorrelationen verhält sich der Abfall der über die Korrelationszeit für alle Proben ähnlich. Man erkennt bereits in den Verläufen, dass es sich bei den Proteinproben um jeweils polydisperse Systeme handelt, da die Kurven unterschiedliche Anstiege aufzeigen. Auffällig ist, dass bei der Rückwärtsstreuung bei der Probe mit einem pH-Wert von 12 die Autokorrelation bereits bei einer geringeren Intensität beginnt. Dies bedeutet, dass die Partikel das Licht schlechter streuen, aber die Größe der Partikel aufgrund des Abfalls bei ähnlichen Korrelationszeiten wie bei den anderen Proben, nicht kleiner sind. Dies könnte durch eine starke Konformationsänderung bzw. partielle Entfaltung des Proteins hervorgerufen werden. Aufgrund einer veränderten Struktur wäre es möglich, dass schlechter streuende Proteinstrukturen entstehen, welche sich jedoch nicht maßgeblich auf die berechnete Proteingröße auswirken.

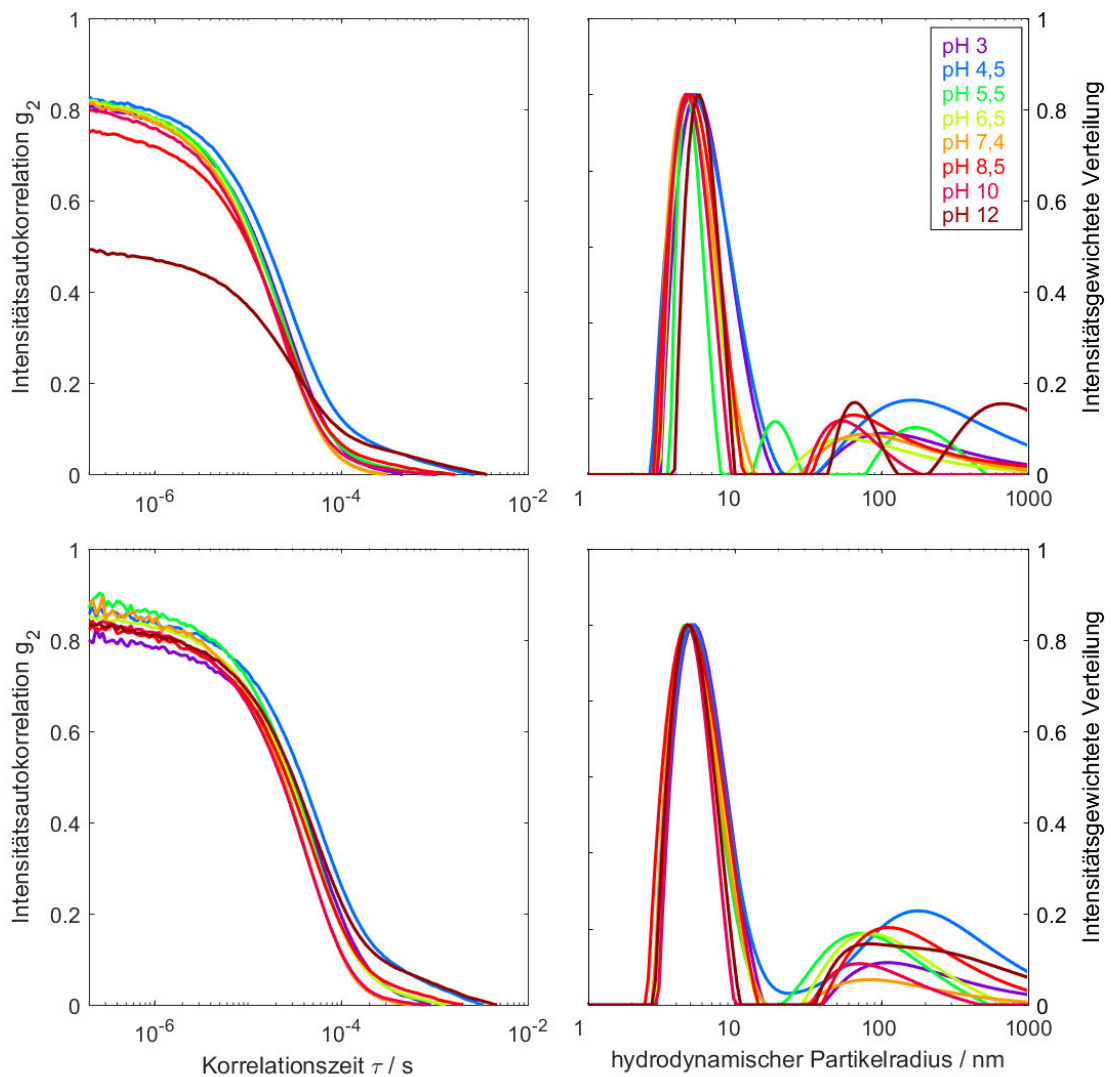


Abbildung 3.35: Intensitätsautokorrelationen (links) und intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen (rechts) bei Rückwärts- (oben) und Seitwärtsstreuung (unten) von 12,5 μM HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 20 °C.

Generell unterscheiden sich die hydrodynamischen Partikelradien je nach Messwinkel bei einem bestimmten pH-Wert kaum. In beiden Streuwinkeln wurde ein hydrodynamischer Proteinradius von etwa 5 nm für HPRG, unabhängig des pH-Wertes, gemessen. Das Maximum der Größenverteilung liegt bei der Seitwärtsstreuung bei 4,7 nm, wobei bei pH 3 und pH 4,5 ein Maximum etwa 5,3 nm erhalten wurde. Das Maximum der Größenverteilung bei der Rückwärtsstreuung schwank deutlich stärker als bei der Seitwärtsstreuung. Auch hier zeigen die Messungen bei pH 3 und pH 4,8 einen leicht größeren hydrodynamischen Proteinradius von 5,4 nm bzw. 5,2 nm. Auch die basischen Proteinproben bei pH 10 und pH 12 zeigen, im Vergleich zu einem Radius von 4,7 nm, mit einem hydrodynamischen Radius von 5,1 nm bzw.

5,7 nm ein größeres Protein. Als Vergleich kann die Größe von humanem Albumin herangezogen werden. Das Protein weist bei physiologischen Bedingungen in seiner globulären Form einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 5,9 bis 6,2 nm bzw. einen hydrodynamischen Radius von 2,95 bis 3,1 nm auf.^[185] Für leichte pH-Wert-Änderungen ändert sich auch die Proteingröße drastisch, sodass beispielsweise bei pH 8 bereits ein hydrodynamischer Durchmesser von 7,2 bis 8,2 nm ermittelt wurde.^[185]

HPRG hat etwa die gleiche Molekülmasse wie Albumin, ist jedoch aufgrund seiner strukturell ungeordneten Regionen mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 10 nm deutlich größer. Aufgrund einer geringeren Anzahl an Sekundärstrukturen, wie die strukturgebenden α -Helices und β -Faltblättern, liegt HPRG größtenteils nicht in einer geordneten Struktur vor. Die Änderung der chemischen Umgebung, beispielsweise in Form von Ligandenanwesenheit oder einer pH-Wert-Änderungen, kann die Proteinstruktur verändern, was hier vor allem bei pH 3, pH 4,8, pH 10 und pH 12 beobachtet werden kann. Bei hohen pH-Werten findet, wie auch schon in der Fluoreszenzspektroskopie zu beobachten war, eine Umlagerung in der Proteinstruktur statt, weshalb der hydrodynamische Radius deutlich zunimmt. Bei geringen pH-Werten nimmt ebenfalls der hydrodynamische Proteinradius zu. Daraus lässt sich schließen, dass HPRG bei physiologischen Bedingungen in seiner kompaktesten Form nativ vorliegt. Auch bei geringen Abweichungen von pH 7,4 scheint HPRG in seiner Struktur größtenteils nicht verändert zu werden.

Weiterhin sind auch einzelne, größere Proteinaggregate in jeweils allen Proben zu beobachten, welche sich in den Größenverteilungen zwischen 20 bis 1000 nm befinden. Da jedoch die intensitätsgewichteten Größenverteilungen dargestellt sind, werden aufgrund der besseren Streuung von großen Partikeln diese Aggregatstrukturen deutlich stärker gewichtet als die Proteinmonomere.^[186,187] Man erkennt bei den Oligomeren des HPRGs, wie auch schon auf den Gelen, dass diese bei einer Abweichung vom physiologischen pH-Wert intensitätsmäßig bzw. konzentrationsmäßig zunehmen. Durch eine Veränderung der physiologischen, nativen Struktur des Proteins besteht nun, neben einer Änderung der intramolekularen Struktur durch den pH-Wert, auch eine Änderung der intermolekularen Wechselwirkungen verschiedener Proteinmoleküle zueinander in Lösung.

3.4.5. Zusammenfassung

Die SDS-PAGE Gele zeigen, dass etwa ein Tag nach Start der Inkubation bei den entsprechenden pH-Werten das Protein noch intakt ist. Je länger die Inkubation andauert, desto stärker beginnt HPRG zu fragmentieren. Dabei kann von einer Spaltung durch saure oder basische Hydrolyse ausgegangen werden, da in den aufgereinigten Proteinproben keine Proteasen, wie im Serum, mehr vorhanden sind. Die Fragmentierung im hoch basischen erfolgt deutlich schneller als im sauren Bereich. Nach dreiwöchiger Inkubation fällt auf, dass HPRG im leicht sauren deutlich stabiler zu sein scheint als im neutralen bis basischen.

Anhand der Fluoreszenzspektren wird deutlich, dass sich die Umgebung der Tryptophane je nach pH-Wert deutlich ändert. Bei basischen pH-Werten ist die Umgebung am hydrophilsten, was auch mit den Daten aus den DLS-Messungen korreliert, die für basische pH-Werte einen leicht größeren hydrodynamischen Proteinradius liefern. Dies kann für eine partielle Entfaltung stehen und führt damit zu einer Partikelvergrößerung oder einer Wassereinlagerung in das Protein. Bei neutralen pH-Werten zeigen die Fluoreszenzmessungen in Vergleich zu den geringen pH-Werten eine hydrophobere Umgebung, was jedoch nicht mit einer höheren Kompaktheit durch einen geringeren Radius einhergeht.

Aus allem Messungen ergibt sich zusammenfassend, dass es möglich ist, HPRG als intaktes Protein bei verschiedenen pH-Werten sofort nach der Probenpräparation zu messen, ohne dass großartige strukturelle Änderungen, wie beispielsweise Fragmentierungen, an dem Protein stattfinden. Mit dieser Erkenntnis soll nun die pH-abhängige Kupferbindung betrachtet werden.

3.5. EPR-spektroskopische Untersuchung der Kupferbindung

Zur Betrachtung der pH-Abhängigkeit der HPRG-Kupfer-Interaktion wurden EPR-Spektren mit verschiedenen Protein:Kupfer-Verhältnissen gemessen. Diese Messungen dienen ebenfalls dazu, die Metallbindungskapazität EPR-spektroskopisch abschätzen zu können. Dabei ist zu beachten, dass die mittels EPR-bestimmte Stöchiometrie von der mittels ITC bestimmten Stöchiometrie abweichen kann, da bei der EPR die chemische Umgebung untersucht wird, welcher nicht zwingend einer Bindung entsprechen muss, wie sie bei der ITC durch Auswertung thermodynamischer Parameter erfolgt. Demnach kann nicht eindeutig auf die Bindungsstöchiometrie rückgeschlossen werden.

Ausgehend von der Spektrenform kann generell von einer Typ 2 Geometrie des Kupfers bei der Anwesenheit von HPRG ausgegangen werden. Der entstehende Komplex weist eine quadratisch-planare oder oktaedrische Geometrie auf, welche durch axiale EPR-Parameter identifiziert werden kann. In der planaren Ebene sind dabei die g_{xx} und g_{yy} -Werte und die A_{xx} und A_{yy} -Werte identisch. Durch die Jahn-Teller-Verzerrung des Kupfers sind die äquatorialen Liganden stärker gebunden als die axialen Liganden, da letztere einen größeren Abstand zum Kern aufweisen.^[84]

Im Folgenden wird auf die Auftragung des Doppelintegrals der Spektren Bezug genommen. Da vor allem bei stark verrauschten Spektren das Doppelintegral häufig größere Werte annimmt als eigentlich vorliegen, wird gleichzeitig auf die Amplitudenintensität in äquatorialer Orientierung eingegangen. Dieses alleine würde jedoch nicht eventuelle Spektrenverbreiterungen berücksichtigen.

3.5.1. pH-abhängige Bindung verschiedener Protein:Kupfer-Verhältnisse

3.5.1.1. HPRG : Kupfer-Verhältnis 1:2

Zunächst soll auf das HPRG:Kupfer-Verhältnis von 1:2 eingegangen werden. Die entsprechenden EPR-Spektren bei verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 3.36 gezeigt, wobei die Spektren normiert und für eine bessere Vergleichbarkeit magnetfeldzentriert wurden. Folglich kann von dieser Abbildung aus nicht auf den g-Wert geschlossen werden. Die g-Wert aufgetragenen Spektren sind in Abbildung A.28 im Anhang dargestellt.

Das Spektrum bei pH 3 unterscheidet sich deutlich von den darauffolgenden. In der axialen Orientierung sind 4 Signale zu sehen, gefolgt von einem großen Signal in der äquatorialen Orientierung. Es liegen jedoch mindestens zwei unterschiedliche Kupferspezies vor. Dies ist an

der weiteren Aufspaltung, in Form von einer Schulter im axialen Bereich zu erkennen. Einmal handelt es sich vermutlich um freies Kupfer, umgeben von einer Hydrathülle, bei der anderen Spezies wird es sich um einen schwach koordinierten Kupfer-Proteinkomplex handeln, wobei keine Superhyperfeinwechselwirkungen mit Stickstoffkernen zu erkennen sind.

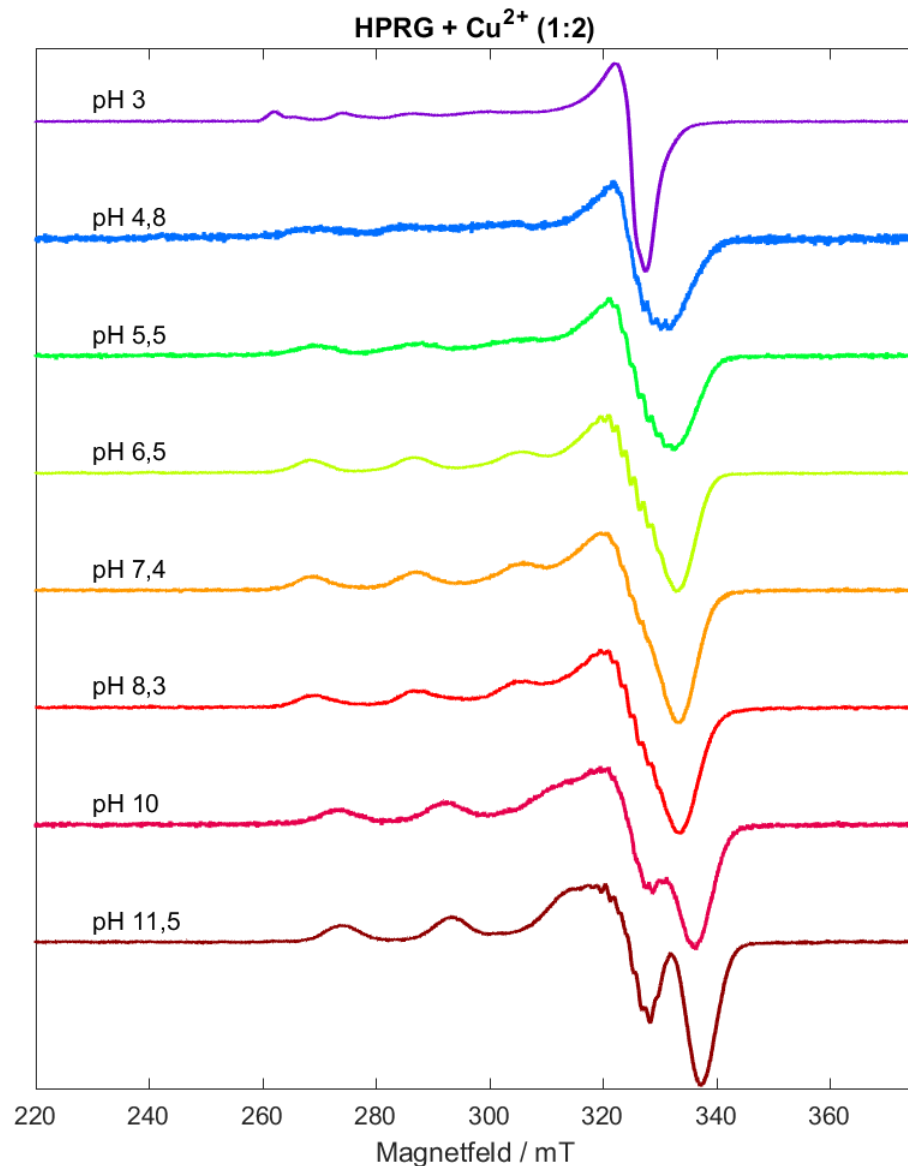


Abbildung 3.36: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:2 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.

Ab pH 4,8 sind in der äquatorialen Ebene erste Superhyperfeinwechselwirkungen mit Stickstoffkernen zu sehen. Da in dem Puffer selbst keine stickstoffhaltigen Substanzen sind, müssen diese Wechselwirkungen von dem Protein herrühren. Bis pH 8,3 verstärkt sich die Superhyperfeinwechselwirkung, was auf eine höhere Stickstoffkoordination am Kupfer

hindeutet. Die Anzahl der Linien durch die Superhyperfeinwechselwirkungen beträgt 8. Diese Anzahl ändert sich mit steigendem pH-Wert nicht und auch die Aufspaltungsbreite bleibt mit etwa 1,6 mT identisch.

Ab pH 10 zeigt das Kupferspektrum eine weitere Aufspaltung in der senkrechten Orientierung, welche bei pH 11,5 noch stärker ausgeprägt ist. Diese ist vermutlich auf einen geringeren g-Wert des Kupfers in axialer Orientierung zurückzuführen, wodurch sich die Signale in der senkrechten Orientierung verschieben. Die Stickstoffkopplungen bleiben erhalten, werden jedoch deutlich schwächer. Vermutlich ändern sich die an das Kupfer bindenden Aminosäuren, wodurch nun auch andere Stickstoffe mit weiteren Hyperfeinaufspaltungen interagieren, wodurch sich dementsprechend die Superhyperfeinstruktur aus einer Vielzahl an Hyperfeinaufspaltungen zusammensetzt.

Betrachtet man die g-Wert-Auftragung in Abbildung A.28 und Abbildung A.37, so erkennt man, dass mit steigendem pH-Wert eine Verschiebung des gesamten Spektrums zu geringeren g-Werten stattfindet. Vor allem von pH 3 zu pH 6,5 findet eine starke Verschiebung statt, welcher auf eine andere Kupferumgebung hindeutet und auch mit der Änderung der Spektrenform einhergeht. Bei einer weiteren pH-Wert Zunahme findet kaum noch eine Verschiebung zu geringeren g-Werten statt, sodass von einer Koordination ausgegangen werden kann, welche durch pH-Wert Erhöhung nicht mehr verändert wird. Zu beachten ist auch, dass im vorliegenden Fall nur ein HPRG:Kupfer-Verhältnis von 1:2 betrachtet wird und bereits bekannt ist, dass HPRG mit einer Stöchiometrie von 1:8^[62] bis 1:10,5^[63] Kupferionen bindet. Demnach ist davon auszugehen, dass eine Konkurrenz zwischen den Bindungspositionen herrscht, sodass keine Änderungen der chemischen Umgebung mehr zu beobachten sind. Unterstützt wird diese Aussage durch die Auftragung der Signalamplitude in äquatorialer Orientierung in Abbildung A.35 und gleichermaßen durch die Auftragung des Doppelintegrals in Abbildung A.36 als Maß für die effektive Sondenkonzentration.^[188] Dieses ist für alle Messungen ab pH 5,5 nahezu konstant, was auch für eine vollständige Aufnahme/Bindung des Kupfers durch das Protein spricht.

3.5.1.2. HPRG : Kupfer-Verhältnis 1:4

Die EPR-Spektren für ein Protein:Kupfer-Verhältnis von 1:4 sind für verschiedene pH-Werten in Abbildung 3.37 gezeigt. Die Spektren wurden normiert und für eine bessere Vergleichbarkeit magnetfeldzentriert.

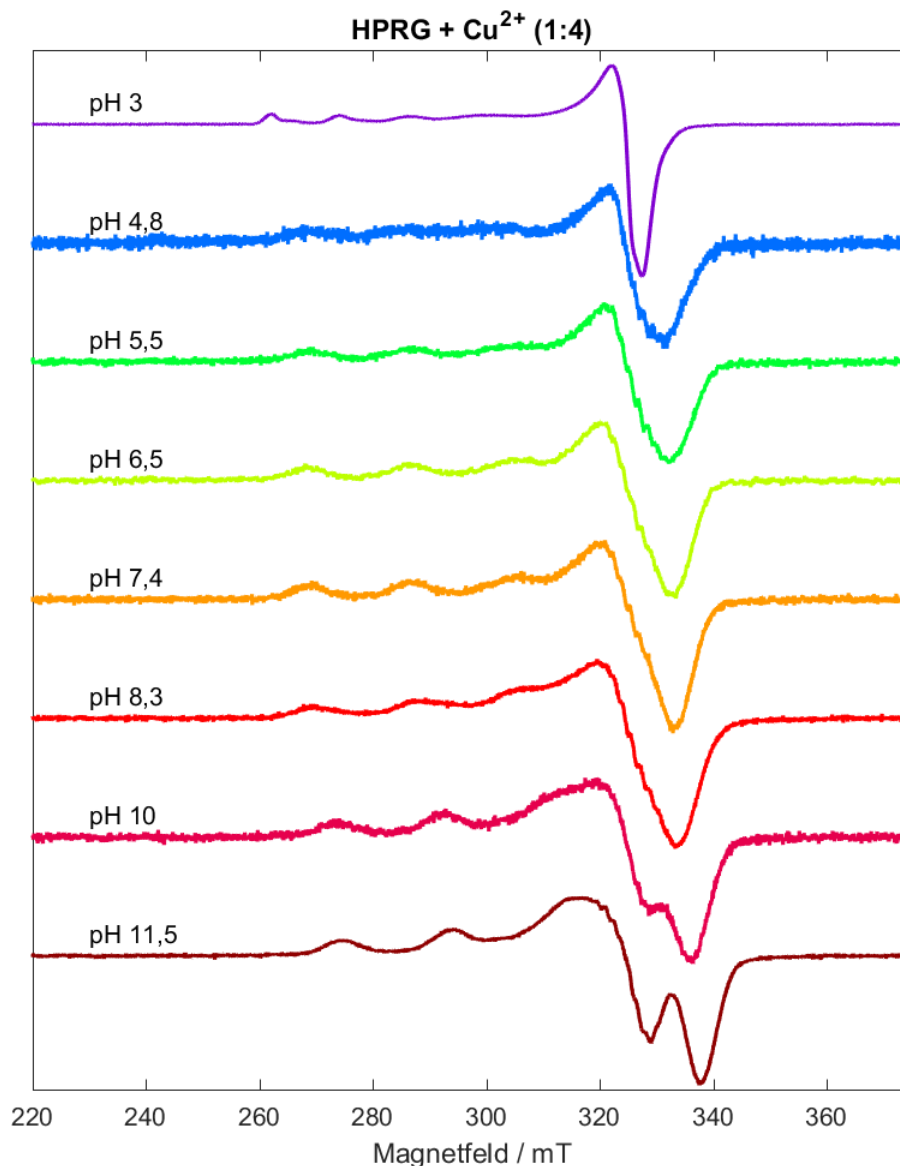


Abbildung 3.37: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:4 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.

Generell fällt im Vergleich zu den Spektren bei einem Protein:Kupfer-Verhältnis von 1:2, gezeigt in Abbildung 3.36, dass diese Spektren nun ein leicht schlechteres SNR besitzen, was für ein Auftreten von weiteren Kupferspezies durch unterschiedlich gebundenes Kupfer oder eventuell für eine höhere Konzentration an freiem Kupfer spricht. Demnach werden nun mehrere, unterschiedliche Positionen im Protein durch Kupfer besetzt, wodurch eine Vielzahl von unterschiedlich gebundenen Kupferspezies entstehen. Auch bei diesem Protein:Kupfer-Verhältnis unterscheidet sich die Messung bei pH 3 deutlich von den anderen Spektren. Die Spektrenform und auch die Auflösung des Spektrums ist deutlich besser und entspricht

nahezu einem Spektrum von Kupfer in Wasser. Daraus resultiert, dass nur eine schwache Interaktion zwischen HPRG und Kupfer vorhanden ist, da neben den 4 Signalen in axialer Ausrichtung noch weitere, schwach ausgebildete Signale bzw. Schultern zu sehen sind, welche durch das Protein bedingt werden.

Bei den anderen pH-Werten sind deutliche Interaktionen mit Stickstoffkernen in der äquatorialen Orientierung zu erkennen, welche mit zunehmenden pH-Wert stärker werden, sodass erneut von einer pH-abhängigen Änderung des Bindungsverhaltens zwischen HPRG und Kupfer ausgegangen werden kann. Die Superhyperfine Wechselwirkungen nehmen bis pH 8,3 zu. Ab pH 10 sind sie deutlich schwächer ausgeprägt, was für eine Zunahme unterschiedlich gebundener Stickstoffkerne an das Kupfer spricht.

Auch bei diesem Verhältnis wird eine zusätzliche Aufspaltung in der äquatorialen Orientierung bei den pH-Werten 10 und 11,5 beobachtet, welche jedoch vermutlich durch die g-Wert-Änderung von g_z resultiert. Indem g in axialer Orientierung kleiner wird, überlagern sich die axialen und äquatorialen Bereiche im Spektrum, sodass es wie eine weitere Aufspaltung erscheint. Ein kleinerer g-Wert bedeutet, dass die Koordination von Kernen in der axialen Raumrichtung des Kupfers zunehmen und die Liganden (ausgehend von einem Hydratkomplex) entsprechend ausgetauscht werden.

Weiterhin verringert sich der g-Wert in äquatorialer Ausrichtung, in Abbildung A.37 gezeigt, was für eine Änderung der chemischen Umgebung um das Kupfer spricht.

Bereits ab einem pH-Wert von 5,5 findet keine Änderung mehr in dem $g_{x/y}$ -Wert statt. Dies spricht dafür, dass bereits ab diesem pH-Wert das Kupfer vollständig durch das Protein koordiniert wurde. Die chemische Umgebung ändert sich nicht mehr signifikant.

Das Doppelintegral in Abbildung A.36 zeigt ein ähnliches Verhalten wie bei dem HPRG:Kupfer-Verhältnis 1:2, nur dass das Integral generell etwas geringer ist als bei dem vorherigen Verhältnis. Bei pH 4,8 ist ein Minimum an aktiver Spinkonzentration erreicht. Das Kupfer kann bei pH 3, teilweise auch noch bei pH 4,8, vollständig als Hydratkomplex vorliegen. Ab höheren pH-Werten fällt Kupfer als jeweiliges Phosphatsalz aus und es ist entsprechend nicht mehr EPR-aktiv, wie es auch aus den Referenzmessungen von Kupfer in Puffer in Abbildung A.32 hervorgeht. Alternativ kann Kupfer auch durch Bindung an das Protein als Komplex in Lösung gehalten. Dementsprechend kann die Konzentration von, an Protein gebundenes, Kupfer anhand des Doppelintegrals abgeschätzt werden. Der Trend der Auftragung der Intensitäten

gegen den pH-Wert in Abbildung A.36 zeigt, dass mit steigendem pH-Wert die Intensität ansteigt, was eine vermehrte Kupferkoordination am Protein bedeutet.

3.5.1.3. HPRG : Kupfer-Verhältnis 1:7

Die EPR-Spektren für ein Protein:Kupfer-Verhältnis von 1:7 sind für verschiedene pH-Werten in Abbildung 3.38 gezeigt. Die Spektren wurden normiert und für eine bessere Vergleichbarkeit magnetfeldzentriert.

Auch bei dieser Messreihe fällt auf, dass das SNR mit abnehmender Proteinkonzentration abnimmt, was für ein Auftreten mehrerer unterschiedlicher Kupferspezies spricht. Superhyperfeinwechselwirkungen sind dadurch auch deutlich schlechter zu erkennen, als bei den beiden vorherigen Verhältnissen.

Das Spektrum bei pH 3 unterscheidet sich ebenfalls wieder deutlich von den anderen. Diesmal sind in der axialen Orientierung jedoch keine weiteren Signale in Form von Schultern wie bei den vorherigen Verhältnissen zu erkennen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass das freie Kupfer in einem deutlich größeren Anteil vorliegt. Dadurch, dass die Proteinkonzentration nun geringer gewählt wurde, überlagert das freie Kupfer die mit Protein-koordinierte Kupferspezies.

In den Spektren bei den pH-Werten 5,5 bis 8,3 sind Superhyperfeinwechselwirkungen mit Stickstoffkernen zu erkennen, welche jedoch nur sehr schwach erscheinen. Dies liegt daran, dass durch die geringe Proteinkonzentration unterschiedliche Bindungspositionen durch das Kupfer belegt werden und nicht mehr, wie beispielsweise bei einem Verhältnis von 1:2, die bevorzugten Bindungsstellen an das Kupfer koordinieren. Durch diese hohe Variabilität verschiedener Liganden, aufgrund unterschiedlicher Bindungspositionen, mit unterschiedlichen Umgebungen erhält man eine deutlich höhere Variation an Kupferspezies, welche im cw-X-Band nicht mehr aufgelöst werden können. Mit pH-Werten größer 8,3 zeigen die Spektren erneut ein besseres SNR, da mehr Kupfer an das Protein binden kann, was wahrscheinlich aufgrund der Elektrostatik begünstigt wird. Auch die Auswertung des Doppelintegrals in Abbildung A.36 zeigt, dass mit steigendem pH-Wert die Anzahl an EPR-aktiven Molekülen zunimmt, wobei erst ab etwa pH 8,3 ein deutlicher Anstieg verzeichnet werden kann. Zwischen pH 4,8 und pH 8,3 ist das Doppelintegral für die Spektren nahezu konstant, weshalb von einer ähnlichen Anzahl an gebundenem Kupfer ausgegangen werden kann.

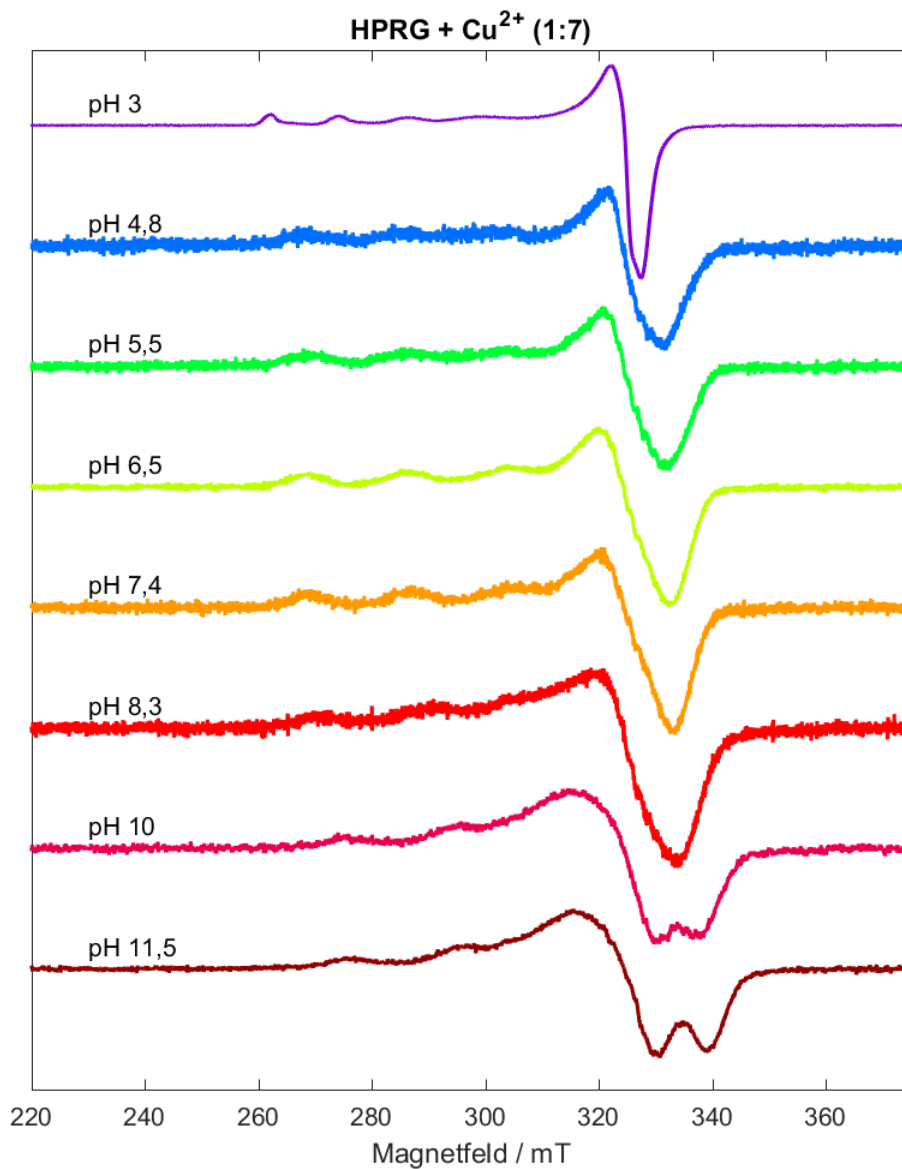


Abbildung 3.38: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:7 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.

Auch die Verschiebung der Spektren durch Änderungen des g-Wertes bei einer pH-Änderung kann in Abbildung A.37 betrachtet werden. Dabei verhält sich es sich ähnlich wie bei den vorherigen Messreihen – bis pH 6,5 findet eine Verschiebung zu geringeren g-Werten in der äquatorialen Ebene statt. Die Ursache liegt in der sich ändernden chemischen Umgebung des Kupfers. Im Bereich zwischen pH 6,5 und pH 8,3 findet keine Änderung im g-Wert statt. Bei basischeren pH-Werten jedoch nimmt der g-Wert wieder zu – die chemische Umgebung des Kupfers ändert sich erneut. Dies bedeutet, dass eine weitere, anders gebundene

Kupferspezies mit steigendem pH-Wert ausgebildet wird und entsprechend erst bei hohen pH-Werten an das Protein koordiniert.

3.5.1.4. HPRG : Kupfer-Verhältnis 1:10

Im Folgenden soll auf das HPRG:Kupfer-Verhältnis von 1:10 eingegangen werden. Die entsprechenden EPR-Spektren bei verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 3.39 gezeigt, wobei die Spektren normiert und für eine bessere Vergleichbarkeit magnetfeldzentriert wurden.

Man erkennt, dass sich die Messung bei pH 3 kaum von anderen Verhältnissen unterscheidet. Bei pH 3 zeigt das EPR-Spektrum ein charakteristisches Spektrum, wie es typisch für Kupfer in Wasser ohne Proteinanwesenheit ist, Wechselwirkungen mit Stickstoffen durch das Protein sind nicht zu erkennen, was aber, wie auch schon bei einem Verhältnis von 1:7, durch sehr viel freies Kupfer überlagert werden kann.

Superhyperfeinwechselwirkungen durch beispielsweise Stickstoffe sind aufgrund des schlechten SNRs nur schwer in den Spektren bei pH-Werten größer 3 zu erkennen, treten aber weiterhin bei den pH-Werten ab pH 5,5 in der äquatorialen Koordination auf. Die Superhyperfeinwechselwirkungen scheinen aber bei den Proben mit deinem pH-Wert von 10 und 11,5 zu verschwinden. Dies kann erneut auf eine Vielzahl unterschiedlicher Kupferspezies, ausgelöst durch ein pH-abhängiges Ligandenumfeld, hinweisen. Die Stickstoffe weisen dabei jeweils unterschiedliche Hyperfeinaufspaltungen auf, weshalb die Superhyperfeinwechselwirkungen des Kupfers mit den umgebenden Liganden nicht mehr eindeutig identifiziert werden kann.

Neben anderen Kupferspezies, also Kupfer mit unterschiedlicher chemischer Umgebung und Koordination, bewirkt auch nicht gebundenes Kupfer, beziehungsweise ausgefallenes Kupfer, ein schlechteres SNR bewirken. Die Spektren ab pH 7,4 scheinen besser aufgelöst zu sein, als die vorherigen Spektren. Bei einem höheren pH-Wert nimmt der Deprotonierungsgrad der Aminosäuren zu, wie bereits implizit beschrieben, weshalb sich neue Koordinationsmöglichkeiten für das Kupfer am Protein ergeben.

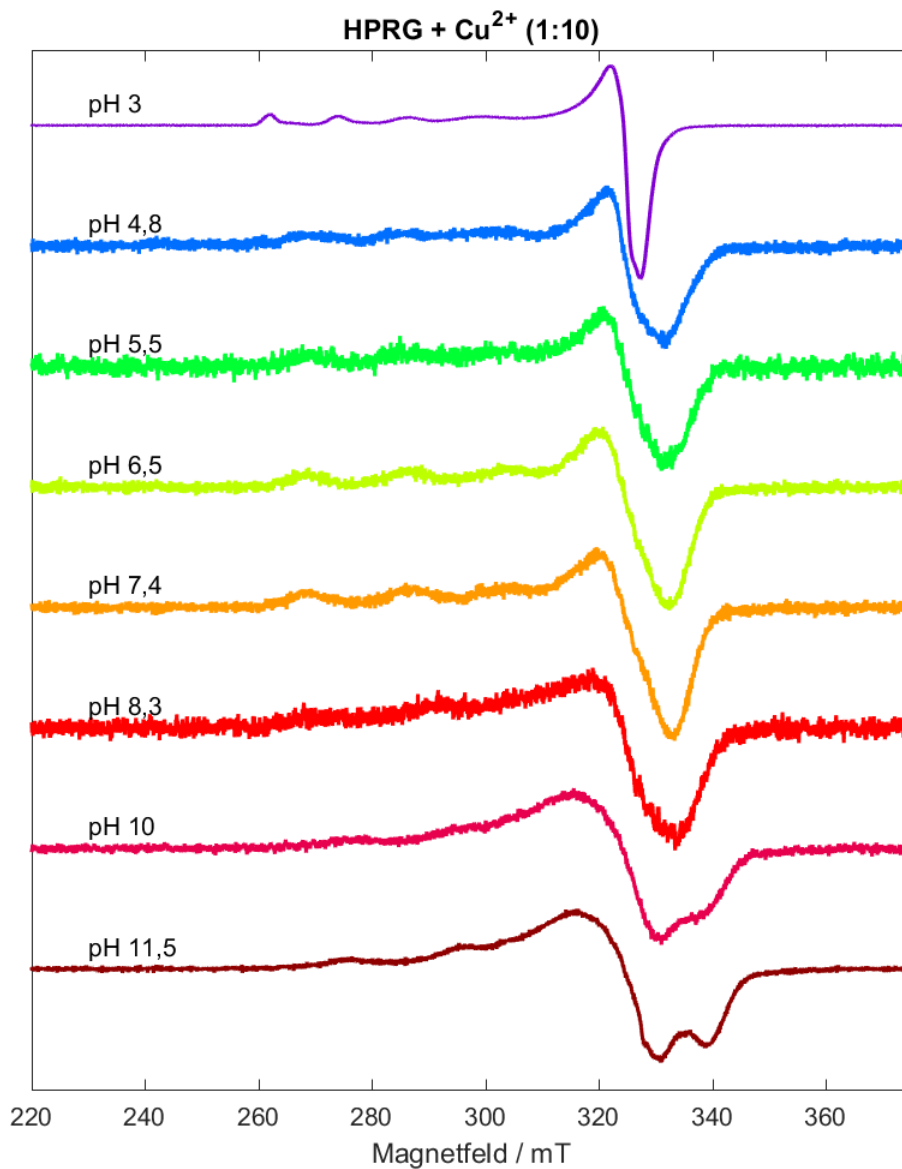


Abbildung 3.39: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:10 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.

Schaut man auf die Darstellung des Doppelintegrals in Abbildung A.36, so wird klar, dass zwischen pH 4,8 und pH 7,4 ein Plateau ausgebildet wird, danach steigt das Doppelintegral kontinuierlich an, was ebenfalls für weitere Koordinationsmöglichkeiten durch ein andere Kupferspezies spricht.

Die Verschiebung im g-Wert in der äquatorialen Ebene, siehe Abbildung A.37, verhält sich ähnlich wie bei den Proben mit einem Protein-Kupfer-Verhältnis 1:7. Bis pH 6,5 findet eine Abnahme des g-Wertes statt, was auf eine unterschiedliche Koordination des Kupfers hindeutet. Das Ligandenumfeld ändert sich. Zwischen pH 6,5 und pH 8,3 gibt es keine

Änderung, jedoch mit weiter zunehmenden pH-Werten steigt der g-Wert wieder an. Die Koordination des Kupfers ist bei höheren pH-Werten wieder deutlich verschieden, bezogen auf die chemischen Umgebung, was auch mit dem Anstieg in dem Doppelintegral einhergeht.

3.5.1.5. Zusammenfassung der pH-Abhängigkeit von HPRG

Zusammenfassend sind die einzelnen Messungen des HPRGs noch nach *Peisach* et al.^[101] aufgetragen werden, um Rückschlüsse von der parallelen Hyperfeinaufspaltung und dem g-Wert auf mögliche Ligandenkoordinationen des Kupfers zu schließen.

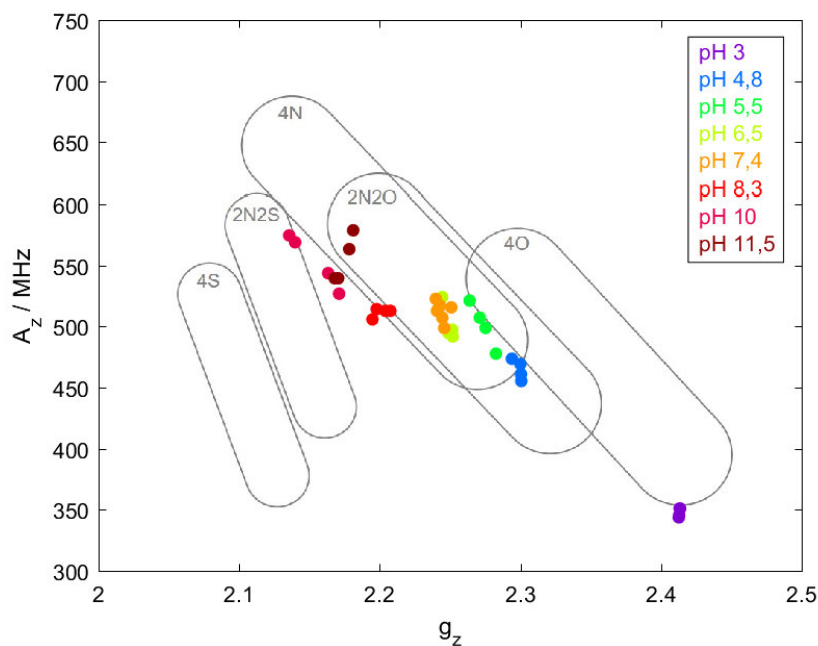


Abbildung 3.40: *Peisach*-Auftragung für rbHPRG mit Kupfer für verschiedene pH-Werte und verschiedene HPRG:Kupfer-Verhältnisse (Vorlage des *Peisach*-Diagramms adaptiert von^[101,102]).

Man erkennt in der Auftragung in Abbildung 3.40, dass der pH-Wert einen starken Einfluss auf die Umgebung des Kupfers hat. Bei einem geringen pH-Wert kann von einer vollständigen Sauerstoff-Koordination ausgegangen werden, währenddessen mit steigendem pH-Wert der Anteil an Stickstoff-Koordination zunimmt. Die Hyperfeinaufspaltung in äquatorialer Ebene nimmt zu, wohingegen der zugehörige g-Wert abnimmt. Aus der Abbildung geht jedoch nicht hervor, ob die Koordination bei pH 3 durch Carbonylsauerstoffe des Proteins oder durch Wasser erfolgt.

Man kann jedoch die Ladung der einzelnen Aminosäureseitenketten bei den jeweiligen pH-Werten betrachten und so mögliche bindende Aminosäuren abschätzen. Je nach pH-Wert liegen die Seitenketten der Aminosäuren, basierend auf ihrem pK_s -Wert, in ihrer neutralen

oder geladenen Form vor. Die pK_s -Werte der Seitenketten der, für die Arbeit wichtigsten Aminosäuren, sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst. Das C- bzw. N-terminale Ende des Proteins weist ebenfalls einen pK_s -Wert auf. Dieser Einfluss wird vermutlich sehr gering sein, jedoch sind die pK_s -Werte der Aminogruppe von Leucin, als N-terminales Ende von HPRG, und für die Carboxylgruppe von Lysin, als C-terminales Ende von HPRG, in der Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.10: pK_s -Werte der Aminosäureseitenketten (nach^[189]).

Aminosäure	pK_s	Aminosäure	pK_s
Arginin	12,48	Histidin	6,00
Asparaginsäure	3,65	Lysin	10,53
Cystein	8,18	Tyrosin	10,07
Glutaminsäure	4,25		
Leucin (-NH ₂)	9,60	Lysin (-COOH)	2,18

Es wird anhand der pK_s -Werte auch ersichtlich, dass es wahrscheinlicher ist, dass bei pH 3 hauptsächlich Wasser koordiniert ist. Alle pK_s -Werte der Aminosäureseitenketten liegen oberhalb des pH-Wertes, weshalb von einer Protonierung der Seitenketten ausgegangen werden kann. Es liegen somit keine negativen Ladungen an dem Protein, mit Ausnahme des C-terminalen Endes, vor, sodass keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen Kupfer und Protein auftreten. Ab pH 4,8 liegen die Carboxylgruppen bei Asparaginsäure und Glutaminsäure deprotoniert vor, sodass eine Interaktion mit dem Kupfer erleichtert wird. Zugleich können in den Spektren nun auch Stickstoffinteraktionen beobachtet werden. Diese treten als Superhyperfeinwechselwirkung bevorzugt im senkrechten Bereich des Kupferspektrums auf und bleiben bis pH 11,5 bestehen. Das Auftreten der orientierungselektiven Wechselwirkung ist durch den Jahn-Teller-Effekt bedingt. In der axialen Richtung, parallel zum Magnetfeld, findet eine Verzerrung der Ligandenbindung statt, sodass diese Liganden weiter vom Kupfer entfernt sind und dementsprechend die Wechselwirkung in der äquatorialen Ebene, senkrecht zum Magnetfeld, stärker sichtbar ist. Bei den weiter ansteigenden pH-Werten nimmt die Deprotonierung der Aminosäureseitenketten zu. Bei pH 6,5 liegt Histidin auch in seiner deprotonierten Form vor, wodurch eine stärkere Stickstoffinteraktion beobachtet werden kann. Bezogen auf die *Peisach*-Auftragung ist kein Unterschied in der Koordination zwischen pH 6,5 und pH 7,4 zu sehen, welches auch wieder über die Ladung der Seitenketten erklärt werden kann – bei

diesem pH-Schritt kommen keine weiteren Ladungen dazu, jedoch werden mehr Imidazolreste des Histidins deprotoniert vorliegen. Von pH 7,4 auf pH 8,3 und auch auf pH 10 findet jeweils wieder ein Sprung in der Auftragung statt. Bei diesen sprunghaften Änderungen zeigt die Tendenz in der Auftragung auch an, dass es möglich ist, dass Schwefel, von der Thiolgruppe der freien Cysteine stammend, an der Koordination des Kupfers beteiligt ist. Bei pH 11,5 ist auch die endständige Aminogruppe des Lysins endständige Aminogruppe deprotoniert, wodurch Stickstoff wieder vermehrt als Kupferligand auftritt.

Diese Interaktion mit Stickstoff tritt deutlich ab pH 4,8 auf, wie es auch aus der *Peisach*-Auftragung hervorgeht. Bei den nachfolgenden pH-Schritten ist die Änderung der chemischen Umgebung des Kupfers nicht mehr so stark, weshalb ebenfalls davon ausgegangen werden kann, dass ab pH 4,8 eine Interaktion zwischen Kupfer und HPRG stattfindet, welche sich dann nur noch durch eventuell andere Kernumgebungen ändert, aber die Orientierung des Proteins um das Kupfer erhalten bleibt. Auffällig ist weiterhin, dass die Messungen bei pH 4,8 immer ein sehr schlechtes SNR zeigen, und auch das Doppelintegral ist bei diesen Proben bei allen Verhältnissen am geringsten. Womöglich deutet dies auf eine schlechte oder unvollständige Koordination des Kupfers am HPRG hin, jedoch muss auch berücksichtigt werden, dass aufgrund des pH-Wertes Kupfer beginnt als Phosphatsalz im Puffer auszufallen. Viele mögliche Bindungspositionen sind durch die Protonierung der Aminoseitenketten noch nicht zugänglich, sodass eine schwache Bindung resultiert. Mit steigenden pH-Werten findet eine fortschreitende Deprotonierung der Aminosäureseitenketten statt, weshalb auch eine elektrostatische Präferenz bei der Bindung eine Rolle spielt.

Schaut man sich das Doppelintegral für die verschiedenen Verhältnisse bei verschiedenen pH-Werten in Abbildung A.35 an, so erkennt man, dass sie die Kurvenverläufe für alle Protein:Kupfer-Verhältnisse ähnlich verhalten. Bei pH 3 ist das Doppelintegral im größten, nimmt dann deutlich bei pH 4,8 ab und steigt dann, je nach Verhältnis, stärker oder schwächer über die höheren pH-Werte an. Dies lässt die Vermutung zu, dass mit steigendem pH-Wert die Bindung von Kupfer erleichtert wird, was durch die Ladung des Proteins bedingt wird.

Für einen genaueren Einblick in die Koordination des Kupfers sind noch ESE- und ESEEM-Spektren ausstehend. Diese waren bisher aufgrund der Nichtverfügbarkeit des Puls-X-Band-Spektrometers bis zum Zeitpunkt der Abgabe noch nicht messbar.

3.5.2. pH-abhängige Bindung der Peptide bei einem Peptid:Kupfer-Verhältnis 1:1

Neben dem vollständigen HPRG-Protein wurden auch die Peptide aus den intrinsisch ungeordneten Bereichen des Proteins EPR-spektroskopisch bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Dazu wurde ein Peptid:Kupfer-Verhältnis von 1:1 gewählt. Neben cw-X-Band-Spektren wurden auch Puls-EPR Spektren der Proben aufgenommen. Diese erlauben einen tieferen Einblick in die Ligandenkoordination des Kupfers. Dazu wurden orientierungsselektive ESEEM-Messungen, zur Charakterisierung der axialen Orientierung und der äquatorialen Orientierung, angefertigt.

3.5.2.1. pH-Abhängigkeit bei der PRR1

Die Spektren für die Messungen der PRR1 mit Kupfer im Verhältnis 1:1 sind in Abbildung 3.41 gezeigt. Auch hier wurden die Spektren normiert und für eine bessere Vergleichbarkeit magnetfeldzentriert.

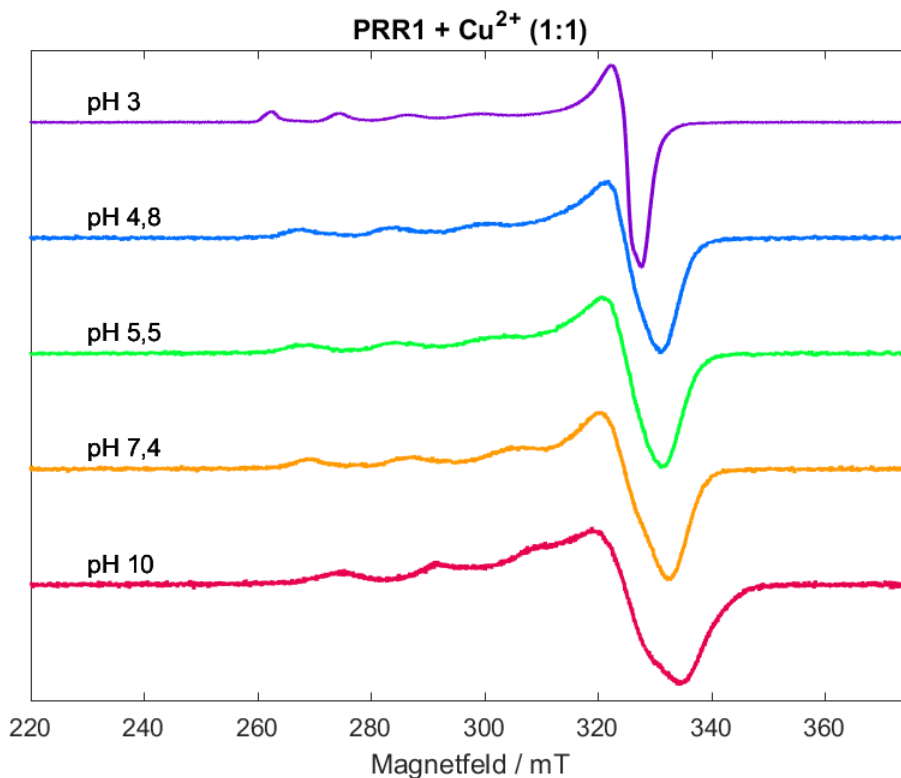


Abbildung 3.41: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von dem Peptid PRR1:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.

Auch bei der Messung der einzelnen Region zeigen sich Abhängigkeiten des pH-Wertes in der Spektrenform. Bei pH 3 gleicht das Spektrum, wie auch schon bei HPRG, einer Messung von reinem Kupfer in Wasser. Diesmal sind jedoch keine weiteren Signale in Form von Schultern

neben denen Signalen in axialer Orientierung zu erkennen, was dafürspricht, dass bei diesem pH-Wert keine Interaktion zwischen Peptid und Kupfer stattfindet. Bereits bei pH 4,8 ändert sich die Spektrenform dahingehend, sodass von einer Koordination zwischen Kupfer und Peptid ausgegangen werden kann. Es sind allerdings keine Superhyperfeinwechselwirkungen durch Stickstoffkopplungen erkennbar, wie zuvor bei HPRG. Diese treten auch bei höheren pH-Werten nicht deutlich hervor. Daraus resultiert, dass keine starken, spezifischen Stickstoffinteraktionen zu Kupfer vorhanden sind. Jedoch nimmt der g-Wert der äquatorialen Ebene mit steigendem pH-Wert ab, was auf eine Interaktion zu anderen Kernen beziehungsweise einer höheren stickstoffbasierten Ligandenanzahl am Kupfer hindeutet.

Für die Peptide wurden neben cw-X-Band-Spektren auch Puls-EPR-Spektren aufgenommen. Die ESE-Spektren der PRR1 sind in Abbildung 3.42 und die orientierungsselektiven ESEEM-Spektren sind in Abbildung 3.43 und Abbildung 3.44 gezeigt.

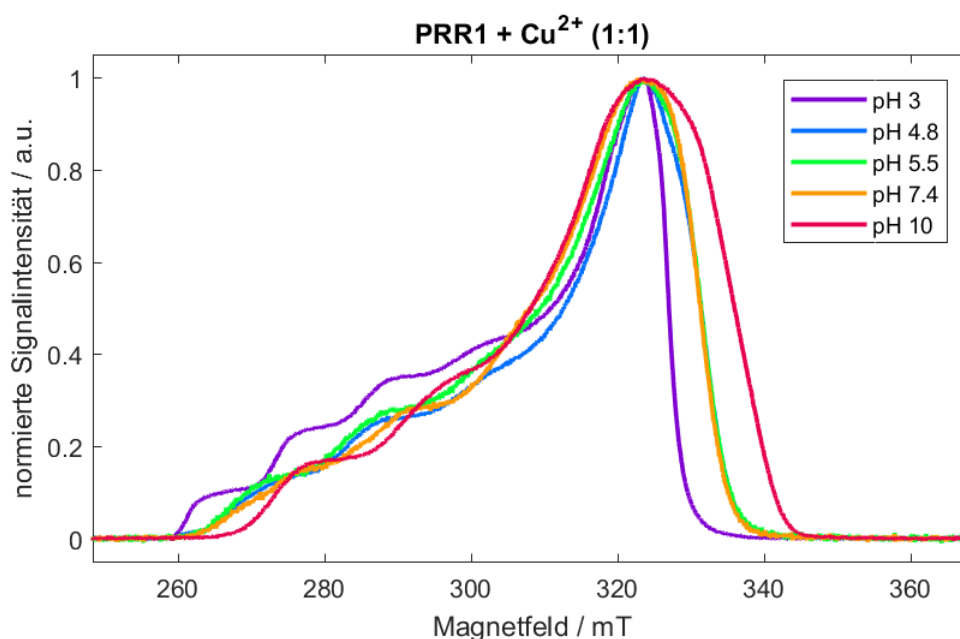


Abbildung 3.42: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid PRR1:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K.

Die ESE-Spektren spiegeln die Relaxationsraten der Kupferkerne und Kernmodulationen durch weitere beteiligte Kerne wider. Diese beeinflussen so die Intensität des Echos und die Spektrenform, sodass die Anzahl koordinierter Stickstoffe und ihre Wechselwirkungen mit Kupfer den Verlauf des Maximums der ESE-Spektren bestimmt. Somit sind ergänzende Aussagen zu den Erkenntnissen aus den cw-Messungen in Abbildung 3.41 möglich, welche nur eine geringe Auflösung der Kupferumgebung durch schwach gebundene Kerne liefern.^[190,191]

Man erkennt bei den pH-Wert-abhängigen Spektren des Peptides PRR1, dass der pH-Wert einen deutlichen Einfluss auf die Umgebung des Kupfers hat. Wohingegen bei pH 3 noch ein sehr schmales Spektrum zu beobachten ist, welches in der axialen Ebene 4 Schultern liefert, nimmt diese Anzahl mit steigendem pH-Wert ab. Das Spektrum bei pH 3 gleicht dem von Kupfer in Wasser, sodass von keiner Interaktion ausgegangen werden kann. Bei den Proben mit pH 4,8, pH 5,5 und pH 7,4 sind nur noch 3 Schultern zu erkennen und bei pH 10 nur noch 2 Schultern. Gleichzeitig findet eine Verbreiterung des Signals der äquatorialen Ebene statt. Bei pH 3 ist das Maximum nur sehr schmal, verbreitert sich aber bei pH 4,8. Zwischen pH 5,5 und pH 7,4 ändert sich nicht die Form des Maximums, jedoch die Schultern im axialen Bereich des Spektrums, weshalb auch hier von einer veränderten Koordination des Kupfers ausgegangen werden kann. Bei pH 10 ist das Spektrum wieder deutlich breiter in der äquatorialen Ebene, weshalb von einer höheren Interaktion zwischen Kupfer und Stickstoff ausgegangen werden kann. Weiterhin nimmt die Aufspaltung in der axialen Ebene ab, was weiterhin ein Hinweis auf eine andere Stickstoffumgebung hindeutet.

Neben stark koordinierten Stickstoffen scheinen auch schwach an das Kupfer gebundene Stickstoffe zu existieren, was sich in der Schulter rechts des Maximums des äquatorialen Bereichs äußert. Da die Intensität dieser Aufspaltung mit steigendem pH-Wert zunimmt, kann eine vermehrte Interaktion mit schwach gebundenen Stickstoffen vermutet werden.

In Abbildung 3.43 sind die 3-Puls-ESEEM-Spektren der äquatorialer Orientierung gezeigt. Auch hier wird deutlich, dass sich die Ligandensphäre um das Kupfer mit steigendem pH-Wert deutlich ändert. Bei pH 3 ist nur eine Kernfrequenz bei etwa 14 MHz zu sehen. Diese entspricht der Larmorfrequenz von ^1H -Kernen bei diesem Magnetfeld. Die Protonen stammen vermutlich aus dem Lösungsmittel. Im Bereich der Stickstoffkerne, welche eine Aufspaltung zwischen 0 bis 2 MHz verursachen, sind erst ab pH 4,8 Signale zu erkennen. Hier sind neben den Einzelquantenübergängen auch die Doppelquantenübergänge bei etwa 4 MHz zu erkennen. Die Art der Aufspaltung im Bereich von 0-2 MHz scheint sich über die pH-Reihe nicht zu ändern, jedoch unterscheiden sich die Positionen der einzelnen Frequenzübergänge leicht, weshalb sich leicht andere Quadrupolparameter ergeben, zusammengefasst in Tabelle 3.11. Der Asymmetrieparameter liegt bei pH 10 mit 0,59 etwas höher als bei den anderen Proben. Jedoch ist bei allen Messungen von einer Imidazol- bzw. Histidinkoordination^[116,192] in äquatorialer Orientierung auszugehen.

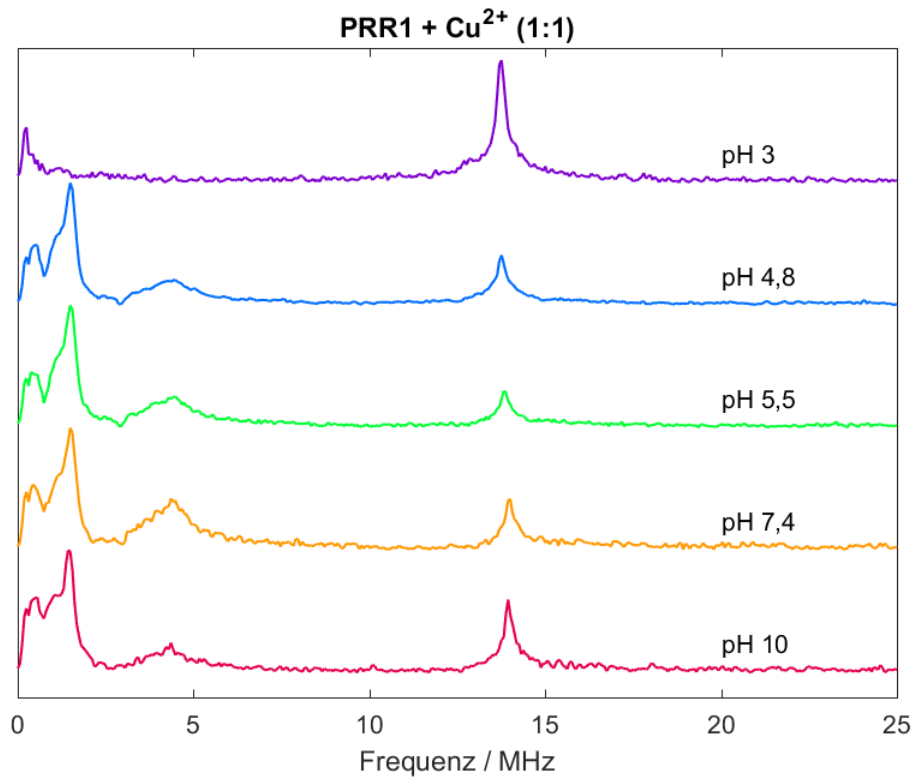


Abbildung 3.43: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid PRR1:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der äquatorialen Orientierung.

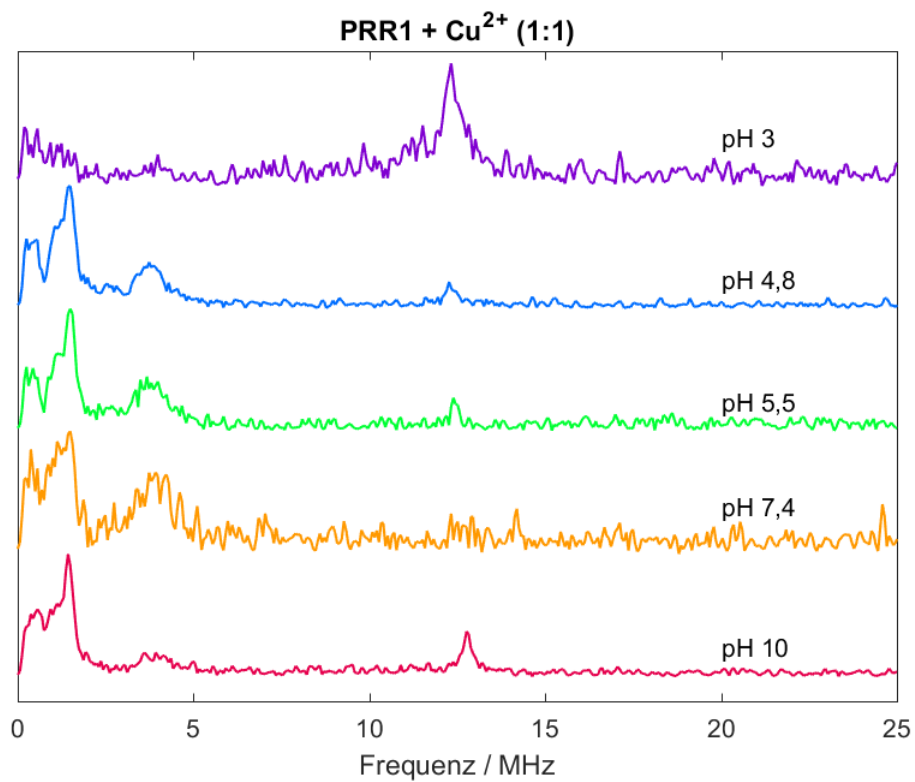


Abbildung 3.44: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid PRR1:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der axialen Orientierung.

Neben der äquatorialen Orientierung wurde auch die axiale Orientierung mittels 3-Puls-ESEEM-Spektroskopie untersucht. Die Spektren sind in Abbildung 3.44 zu sehen. Auch hier zeigt sich ein ähnliches Bild, dass bei pH 3 allein ein Signal durch ^1H -Kerne im Bereich von etwa 13 MHz beobachtet werden, wohingegen bei höheren pH-Werten die Umgebung des Kupfers durch ^{14}N -Kerne im Bereich von 0 bis 2 MHz dominiert wird. Auch hier sind die drei Frequenzlinien von Stickstoffkernen im Bereich von 0-2 MHz zu erkennen, wobei der v-Übergang eher eine Schulter darstellt. Weiterhin ist der Doppelquantenübergang bei allen Proben mit Stickstoffinteraktion im Bereich von 4 MHz zu sehen. Bezüglich der Quadrupolkopplungskonstante unterscheiden sich die Proben bei unterschiedlichen pH-Werten nicht signifikant voneinander, wohingegen der Asymmetrieparamter mit steigendem pH-Wert tendenziell zunimmt. Beide Parameter lassen auch hier auf eine Imidazol- bzw. Histidinkoordination schließen. [116,192]

Tabelle 3.11: Werte für den Asymmetrieparameter und die Quadrupolkopplungskonstante für die 3-Puls-ESEEM-Spektren der PRR1 bei verschiedenen pH-Werten für die Stickstoffsignale.

pH-Wert	Äquatoriale Orientierung		Axiale Orientierung	
	κ / MHz	η_{as}	κ / MHz	η_{as}
pH 4,8	0,44	0,54	0,43	0,50
pH 5,5	0,43	0,54	0,44	0,47
pH 7,4	0,44	0,52	0,44	0,57
pH 10	0,42	0,59	0,43	0,58

3.5.2.2. pH-Abhängigkeit bei der PRR2

In Abbildung 3.45 sind die EPR-Spektren für das Peptid PRR2 mit Kupfer bei einem Verhältnis von 1:1 bei verschiedenen pH-Werten gezeigt.

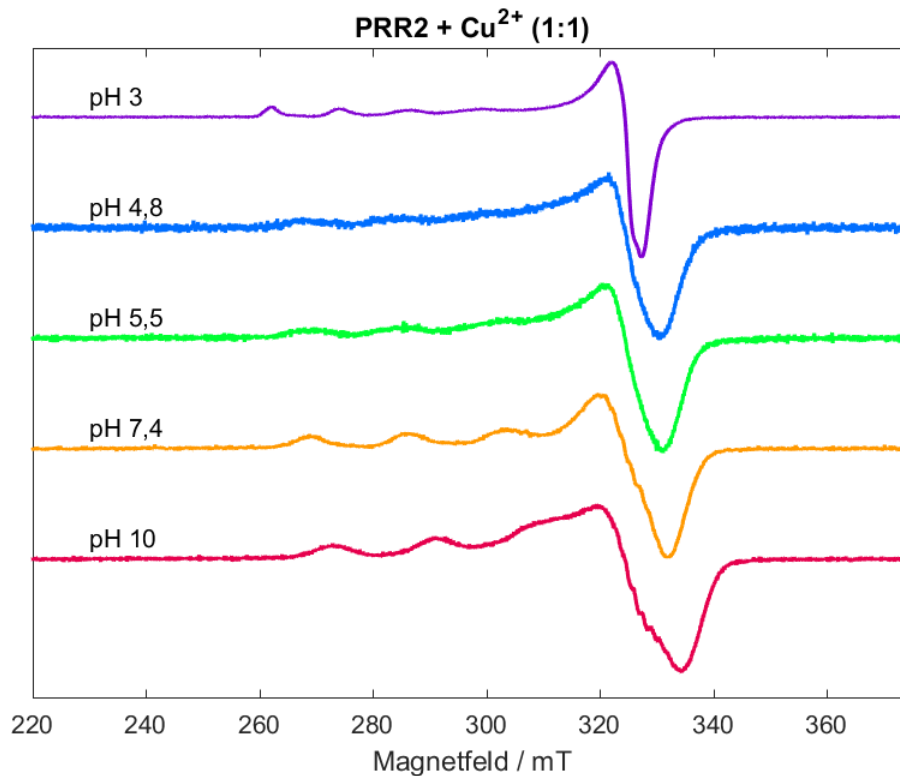


Abbildung 3.45: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von dem Peptid PRR2:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.

Wie schon bei den vorherigen Messungen unterscheidet sich die Messung bei pH 3 deutlich von den anderen Spektren der pH-Reihe. Auch hier scheint es kaum eine Interaktion zwischen Peptid und Kupfer zu geben. Ab pH 4,8 ändert sich die Spektrenform und der g-Wert in axialer Orientierung, wie in Abbildung 3.54 zu sehen ist, wird kleiner, was für eine höhere Koordination durch Liganden um das Kupfer spricht. Dieses Verhalten wird bis pH 10 noch stärker. Superhyperfeinwechselwirkungen durch Stickstoffkopplungen sind erst eindeutig ab pH 7,4 zu beobachten. Diese sind jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als bei dem vollständigen Protein. Auch hier findet eine Abnahme des g-Wertes in der äquatorialen Ebene statt, was mit einer vermehrten Stickstoffinteraktion einhergeht.

Die ESE-Spektren sind in Abbildung 3.46 für PRR2 mit Kupfer für die verschiedenen pH-Werte gezeigt. Die Spektren unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Spektrenform, aber auch von der Veränderung zwischen einzelnen pH-Werten von denen der PRR1-Reihe. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass in der PRR2 die Bindung von Kupfer stärker pH-abhängig erfolgt.

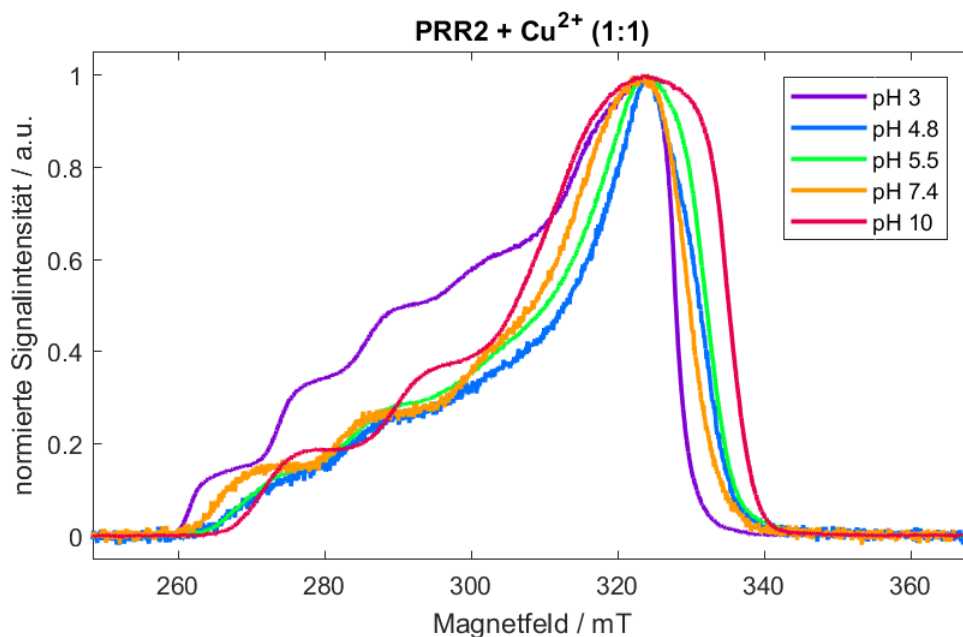


Abbildung 3.46: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid PRR2:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K.

Bei pH 3 ist ein sehr schmales Maximum im Bereich der äquatorialen Ebene und 4 Schultern im axialen Bereich zu sehen. Das Spektrum ähnelt dem von Kupfer in Wasser, was in Einklang mit dem cw-X-Band-Spektrum steht. Jedoch unterscheidet es sich leicht von der Messung der PRR1 bei pH 3. Vermutlich sind schwache Interaktionen im axialen Bereich zwischen Peptid und Kupfer vorhanden, welche jedoch nicht gut aufgelöst werden können. Dies kann auch durch nicht EPR-aktive Kerne, wie beispielsweise durch Sauerstoffe der Carboxylgruppe herrühren.

Während in den cw-Spektren zwischen pH 4,8 und pH 7,4 keine großen Änderungen bezüglich der Form zu erkennen sind, unterscheiden sich die ESE-Spektren deutlich voneinander. Die Anzahl der Schultern im axialen Bereich nimmt von pH 3 auf pH 4,8 ab, sodass nur noch 2 Plateaus und 1 Schulter zu erkennen ist. Bei pH 10 geht die Schulter in die Flanke des äquatorialen Bereichs über. Weiterhin verbreitert sich das Maximum im äquatorialen Bereich kontinuierlich mit den steigenden pH-Werten. Es kann davon ausgegangen werden, dass nun neben stark gebundenen Stickstoffen auch schwach an das Kupfer gebundene Stickstoffe vorhanden sind, was sich in der Flanke, rechts des Maximums, äußert.

Es wurden auch orientierungsselektive 3-Puls-ESEEM-Messungen durchgeführt, welche für die äquatoriale Orientierung von Kupfer in Abbildung 3.47 und für die axiale Orientierung in Abbildung 3.48 gezeigt sind.

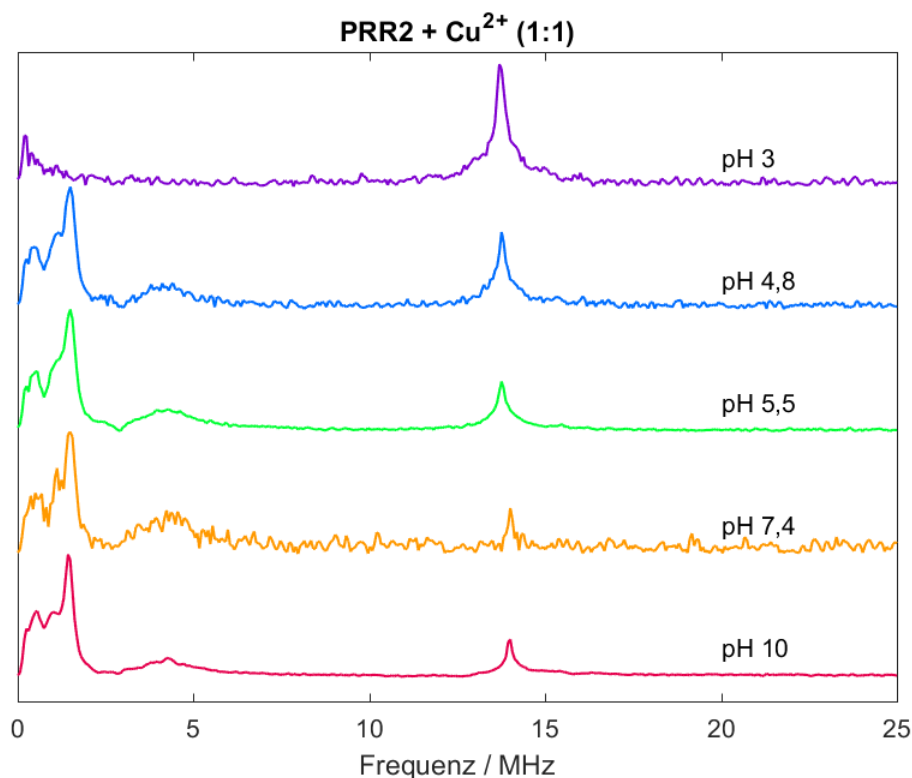


Abbildung 3.47: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid PRR2:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der äquatorialen Orientierung.

Auch hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der PRR1. Bei pH 3 sind keine Frequenzen von Stickstoffkernen in dem Spektrum zu sehen. Bei etwa 14 MHz ist jedoch nur das Signal von ¹H-Kernen erkennbar, welches durch das Lösungsmittel resultiert. Ab pH 4,8 sind im weiteren auch die Signale von ¹⁴N-Kernen zu erkennen, welche sich über die 3 Einzelfrequenzen im Bereich von 0-2 MHz und den Doppelquantenübergang im Bereich von etwa 4 MHz äußern. Aus den Übergängen können die Quadrupolparameter berechnet werden, welche in Tabelle 3.12 zusammengefasst sind. Die Quadrupolkopplungskonstante ändert sich über die pH-Reihe nahezu nicht, wohingegen der Asymmetrieparameter deutlich zunimmt. Folglich ändert sich die Symmetrie des elektrischen Feldgradienten und die Art der Bindung. Jedoch implizieren diese Parameter weiterhin, dass es sich um schwach gekoppelte ¹⁴N-Kerne von Histidin bzw. Imidazol handelt.^[116,192]

Die 3-Puls-ESEEM-Messungen für die axiale Ebene sind in Abbildung 3.48 gezeigt. Auch hier zeigt sich, dass bei pH 3 nur ¹H-Kerne im Bereich von etwa 13 MHz bei diesem Magnetfeld zu sehen sind, welche vermutlich aus dem Lösungsmittel stammen. Ab pH 4,8 sind ¹⁴N-Kerne in Form von 3 Linien im Bereich zwischen 0-2 MHz und als breites Signal im Bereich von 4 MHz zu erkennen. Wohingegen die einzelnen Übergänge bei pH 4,8, pH 5,5 und pH 10 deutlich zu

erkennen sind, zeigt die Probe bei pH 7,4 nahezu kein Stickstoffsignal. Auch zeigt die Probe ein deutlich schlechteres SNR, weshalb hier auch keine Quadrupolparameter aus den Frequenzlinien bestimmt werden konnten.

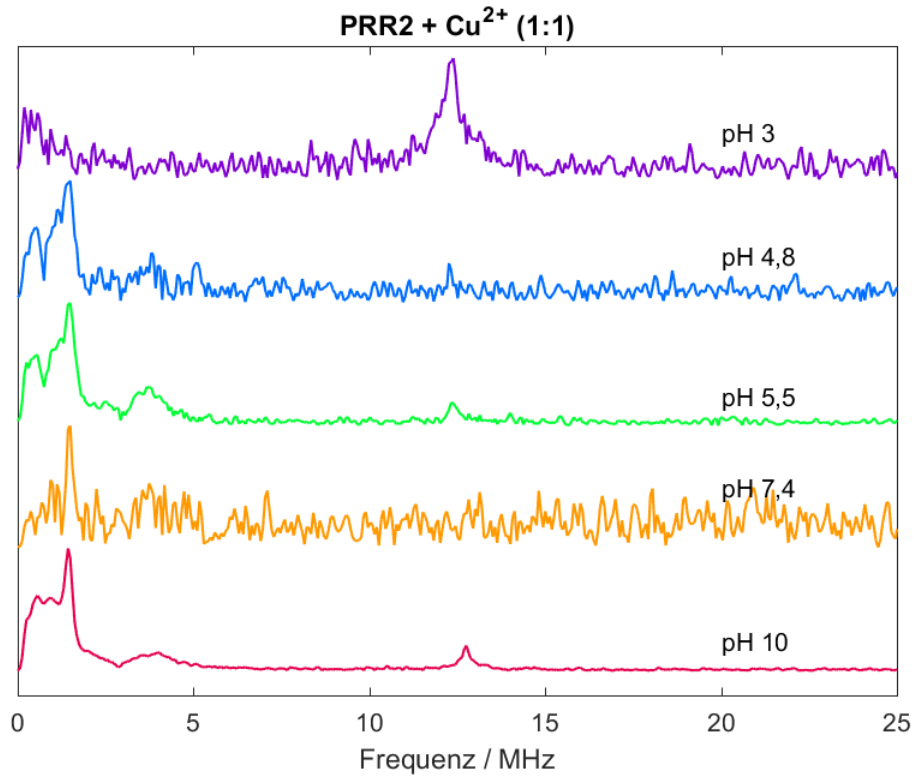


Abbildung 3.48: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid PRR2:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der axialen Orientierung.

Für die anderen Proben sind die Parameter in Tabelle 3.12 zusammengestellt. Auch hier zeigt sich kein Unterschied in der Quadrupolkopplungskonstante. Der Asymmetrieparameter liegt bei pH 10 deutlich höher als bei den vorherigen pH-Werten, weshalb von einer veränderten Koordination am Kupfer ausgegangen werden kann. Dennoch liegen die Werte im Bereich einer Koordination von Kupfer mit den Stickstoffen des Histidins bzw. Imidazolrestes.^[116,192]

Tabelle 3.12: Werte für den Asymmetrieparameter und die Quadrupolkopplungskonstante für die 3-Puls-ESEEM-Spektren der PRR2 bei verschiedenen pH-Werten für die Stickstoffsignale.

pH-Wert	Äquatoriale Orientierung		Axiale Orientierung	
	κ / MHz	η_{as}	κ / MHz	η_{as}
pH 4,8	0,43	0,54	0,43	0,61
pH 5,5	0,43	0,59	0,44	0,56
pH 7,4	0,44	0,66	-	-
pH 10	0,41	0,66	0,40	0,70

3.5.2.3. pH-Abhängigkeit bei der HRR

In Abbildung 3.49 sind die EPR-Spektren für die HRR mit Kupfer bei einem Verhältnis von 1:1 bei verschiedenen pH-Werten gezeigt.

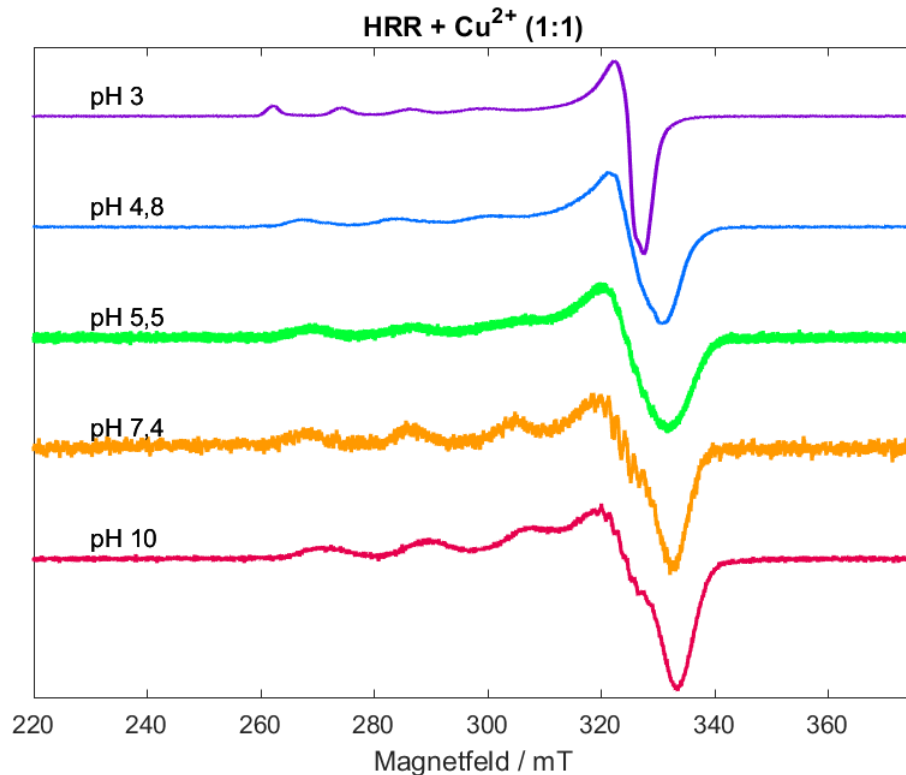


Abbildung 3.49: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von dem Peptid HRR:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.

Erneut zeigt auch hier die Probe bei pH 3 ein deutlich anderes Verhalten als bei den anderen pH-Werten. Das EPR-Spektrum der Probe gleicht einem Spektrum von Kupfer in Wasser, weshalb von keiner, oder nur einer sehr schwachen Peptidinteraktion, ausgegangen werden kann. Ab pH 4,8 ändert sich auch hier die Spektrenform, was für eine Interaktion zwischen Kupfer und Peptid spricht. Ab pH 5,5 sind erste Superhyperfeinwechselwirkungen in den Spektren zu erkennen, welche bei pH 7,4 am stärksten ausgebildet sind. Es ist davon auszugehen, dass Kupfer vermutlich von dem Peptid eingeschlossen wird, sodass nicht nur in der äquatorialen Orientierung, sondern auch in der axialen Orientierung diese Wechselwirkungen zu erkennen sind.

Bei pH 10 sind diese Superhyperfeinwechselwirkungen wieder verringert ausgebildet, dafür zeigt sich aber eine zusätzliche Aufspaltung im äquatorialen Bereich, welcher auf verschiedenen koordinierte Kupferspezies hindeutet.

Die ESE-Spektren sind in Abbildung 3.50 für das Peptid HRR mit Kupfer für die verschiedenen pH-Werte gezeigt.

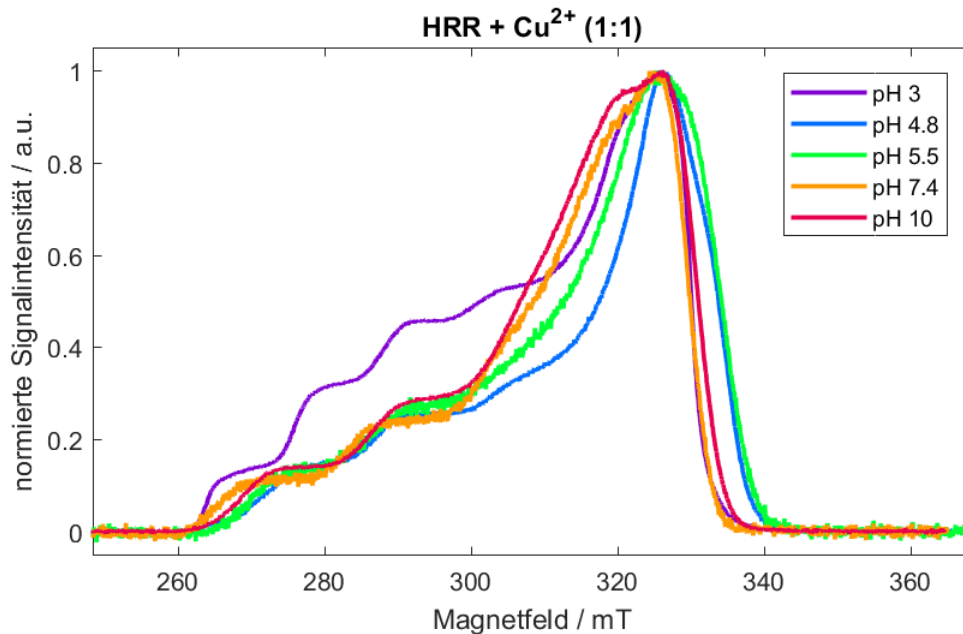


Abbildung 3.50: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid HRR:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K.

Bei pH 3 ist ein sehr schmales Spektrum zu sehen, welches in der äquatorialen Ebene nur ein Maximum zeigt und im axialen Bereich 4 Schultern ausbildet. Auch dieses Spektrum kann von daher mit der Referenzmessung von Kupfer in Wasser gleich gesetzt werden, wobei der axiale Bereich sich von den Intensitäten der Schultern deutlich von reinem Kupfer unterscheidet. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine schwache, unspezifische Interaktion zwischen Peptid und Kupfer vorhanden ist, welche jedoch nicht auf der Koordination von Stickstoffen beruht. Da das Peptid nur aus Histidin, Prolin, und Glycin besteht, könnte eine Interaktion zwischen den Carbonylsauerstoffen oder der Carboxylgruppe existieren. Alternativ kann ein solches Verhalten durch eine, durch Peptidanwesenheit ausgelöste, änderte Solvatisierung des Kupfers entstehen.

Ab pH 4,8 ändert sich die Form des ESE-Spektrums. Aus den 4 Schultern im axialen Bereich werden 2 Schultern und ein weiteres, drittes Signal überlagert mit der Flanke des äquatorialen Bereichs. Weiterhin bildet sich ein weiteres Signal rechts vom Maximum heraus, was auf eine schwache Interaktion mit den umgebenden Kernen schließen lässt. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Intensität dieses Signals zu, sodass ab pH 7,4 dieses Signal die anderen überwiegt. Die Stärke der Interaktion mit den Stickstoffkernen nimmt mit steigendem pH-Wert deutlich zu.

In Abbildung 3.51 sind die 3-Puls-ESEEM-Spektren der äquatorialer Orientierung der Proben mit der HRR gezeigt. Auch hier wird deutlich, dass sich die Ligandensphäre um das Kupfer mit steigendem pH-Wert deutlich ändert.

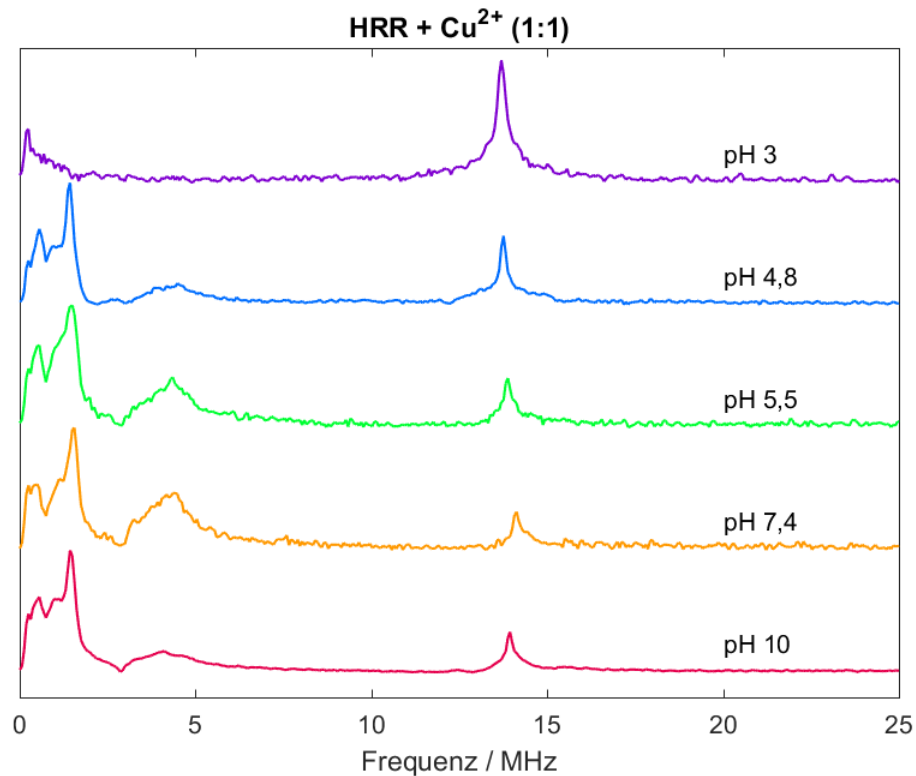


Abbildung 3.51: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid HRR:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der äquatorialen Orientierung.

Während bei pH 3 nur ein Protonensignal bei etwa 14 MHz zu sehen ist, was typisch für die Protonen-Larmorfrequenz bei diesem Magnetfeld ist, ist bei den höheren pH-Werten der ^{14}N -Kern deutlich an den Linien im Bereich von 0-2 MHz und dem breiten Signal bei etwa 4 MHz zu erkennen, wobei letzterer den Doppelquantenübergang darstellt. Im Vergleich zu den vorherigen Peptiden sind die 3 schmalen Signale deutlich stärker ausgeprägt und auch besser aufgelöst. Die Berechnung der Quadrupolparameter offenbart, dass starke Unterschiede je nach pH-Wert vorliegen, welche jedoch nicht die Art des gebundenen Stickstoffes beeinflussen. Auch hier sind die Werte charakteristisch für Imidazol-Stickstoffe bzw. Histidin. Der Asymmetrieparameter schwankt zwischen 0,71 und 0,5, wodurch eine Abweichung von einer axialen Ladungsverteilung deutlich wird.

Die 3-Puls-ESEEM-Messungen für die axiale Ebene der HRR sind in Abbildung 3.52 gezeigt.

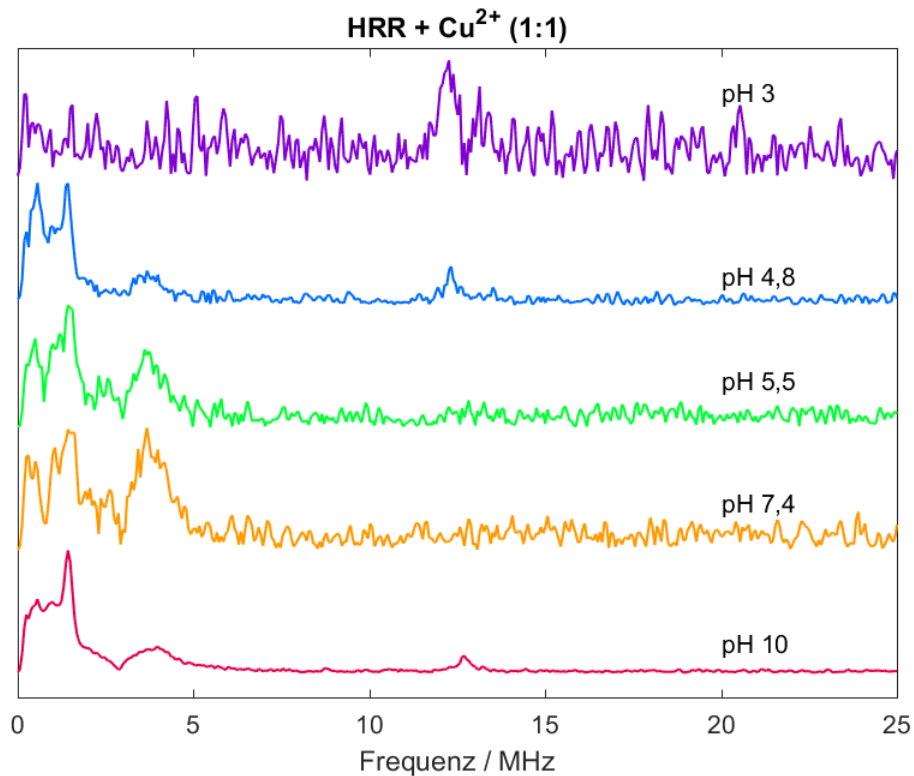


Abbildung 3.52: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid HRR:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der axialen Orientierung.

In diesen Spektren ist nur bei pH 3 ein schwaches Signal von ¹H-Kernen bei etwa 13 MHz zu erkennen, was der magnetfeldabhängigen Larmorfrequenz von Protonen entspricht. Ab pH 4,8 treten auch hier Signale von ¹⁴N-Kernen auf. Diese sind durch die mehreren Linien im Bereich zwischen 0-2 MHz und einen breiten Übergang im Bereich von 4 MHz charakterisiert. Bezüglich der Quadrupolkopplungskonstante unterscheiden sich die Proben bei unterschiedlichen pH-Werten nicht signifikant voneinander, wohingegen sich der Asymmetrieparamter je nach pH-Wert unterscheidet. Dieser nimmt von pH 4,8 bis pH 7,4 von 0,69 auf 0,46 ab, steigt dann aber wieder bei pH 10 auf 0,59 an. Demnach unterscheidet sich die Art der Ladungsverteilung an der Bindung, wobei allerdings kein Unterschied in der Beteiligung der Aminosäuren auftritt. Auch hier sind diese Werte charakteristisch für Imidazolstickstoffe bzw. Histidinseitenketten.^[116,192]

Tabelle 3.13: Werte für den Asymmetrieparameter und die Quadrupolkopplungskonstante für die 3-Puls-ESEEM-Spektren der HRR bei verschiedenen pH-Werten für die Stickstoffsignale.

pH-Wert	Äquatoriale Orientierung		Axiale Orientierung	
	κ / MHz	η_{as}	κ / MHz	η_{as}
pH 4,8	0,40	0,71	0,41	0,69
pH 5,5	0,42	0,63	0,43	0,58
pH 7,4	0,44	0,50	0,43	0,46
pH 10	0,41	0,63	0,40	0,59

3.5.2.4. Zusammenfassung der pH-Abhängigkeit von den Peptiden des HPRGs

Auch die Messungen der Peptide mit Kupfer wurden nach *Peisach* et al. für die einzelnen pH-Werte in Abbildung 3.53 aufgetragen. Es zeigt sich erneut, dass bei pH 3 nur eine Sauerstoffkoordination mit einer Protonenumgebung am Kupfer vorliegt, wohingegen mit steigendem pH-Wert die Koordination von Stickstoff vermehrt auftritt.

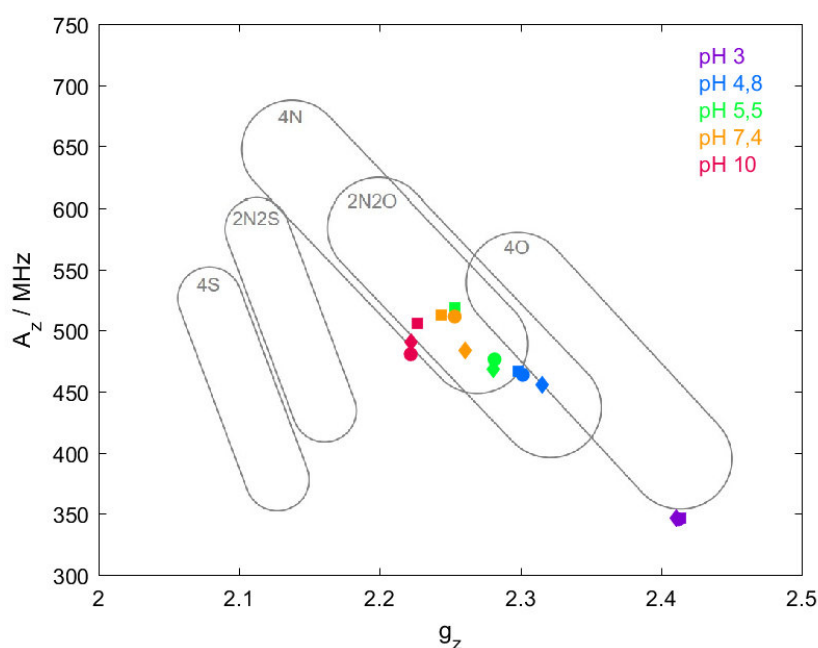


Abbildung 3.53: *Peisach*-Auftragung für die Peptide des rbHPRGs (PRR1 – Kreis; PRR2 – Raute; HRR – Quadrat) mit Kupfer für verschiedene pH-Werte (Vorlage des *Peisach*-Diagramms adaptiert von^[101,102]).

Bei pH 3 ist kein wesentlicher Unterschied zwischen der Auswirkung der einzelnen Peptide auf die Kupferumgebung zu erkennen. Alle Peptide scheinen in den cw-Spektren die gleiche Umgebung des Kupfers zu bewirken. In den ESE-Spektren wird deutlich, dass das Kupfer, trotz gleicher pH-Werte, eine unterschiedliche Umgebung besitzt, je nach Peptid, da sich der axiale Bereich in den Spektren deutlich unterscheidet. Aus den 3-Puls-ESEEM-Spektren bei pH 3 geht

zusätzlich hervor, dass sich nur Protonen als EPR-aktive Kerne in der Kupferumgebung befinden, unabhängig von der Orientierung. Daher kann davon ausgegangen werden, dass hauptsächlich Wasser koordiniert ist. Sauerstoff ist aufgrund des Kernspins von $I = 0$ für das ^{16}O -Isotop nicht mittels EPR-Spektroskopie erreichbar.

Bei pH 4,8 nimmt die Stickstoffinteraktion zu, was in der *Peisach*-Auftragung durch einen geringeren g_z -Wert und eine höhere Hyperfeinaufspaltung hervorgeht. Dabei verhalten sich die Peptide nahezu identisch. Auch in den 3-Puls-ESEEM-Spektren sind nun Stickstoffinteraktionen neben den Protonen zu sehen.

Ab pH 5,5 fangen die Peptide an, sich von ihrer Kupferbindung her, zu unterscheiden. Die Peptide PRR1 und PRR2 sind von der Position in der Auftragung her recht ähnlich, während HRR durch ihren geringeren g -Wert und die höhere Hyperfeinaufspaltung ein anderes Verhalten aufweist. Durch die Vielzahl an Histidinen, welche einen pK_S -Wert von etwa 6 für die Seitenkette haben, ist bereits hier die Auswirkung der beginnenden Deprotonierung erkennbar. Die Koordination der Imidazolreste an das Kupfer beginnt. Durch die hohe Anzahl der Histidine bei diesem Peptid hat dies den größten Effekt. Im weiteren pH-Verlauf zeigt dieses Peptid jedoch kaum noch eine Änderung in der Ligandensphäre des Kupfers. Die Ursache besteht darin, dass hier allein ein Peptid:Kupfer-Verhältnis von 1:1 betrachtet wurde und das Kupfer bereits bei diesem pH-Wert durch das Peptid vollständig von Stickstoffen umgeben ist. In den cw-Spektren wird deutlich, dass die Superhyperfeinwechselwirkungen durch Stickstoff bei pH 7,4 deutlich stärker ausgeprägt sind, was auf eine stärkere Bindung schließen lässt.

Bei PRR1 und PRR2 sind nun zwischen pH 5,5 und pH 7,4 ebenfalls deutliche Sprünge in der *Peisach*-Auftragung zu sehen, welche eine höhere Stickstoffkoordination am Kupfer bedeuten. Durch den geringeren Histidinanteil bei beiden Peptiden im Vergleich zur HRR ist ein deutlich höherer pH-Wert nötig, um EPR-spektroskopisch die Interaktion zwischen Kupfer und den Stickstoffkernen beobachten zu können. Durch den höheren pH-Wert ist diese Interaktion elektrostatisch erleichtert.

Zwischen pH 7,4 und pH 10 ist in der Auftragung nur noch ein geringer Unterschied zu beobachten, welcher sich in einer g_z -Wert-Verringerung äußert. Betrachtet man die Auftragung des g_{xy} -Wertes in der äquatorialen Ebene in Abbildung 3.54 fällt weiterhin auf, dass der g_{xy} -Wert von pH 3 bis pH 7,4 abnimmt und dann zwischen pH 7,4 und pH 10 konstant bleibt. Dies lässt die Interpretation zu, dass in der chemischen Umgebung des Kupfers ab pH

7,4 keine Änderung mehr stattfindet, sodass von einer finalen Koordination des Kupfers auszugehen ist. Tendenziell fällt aber auf, dass ab pH 5,5 das Peptid HRR sich signifikant von den anderen beiden Peptiden unterscheidet. Kupfer zeigt hier einen deutlich geringeren g -Wert in der Auftragung, was auf eine andere Kernumgebung um das Kupfer hindeutet.

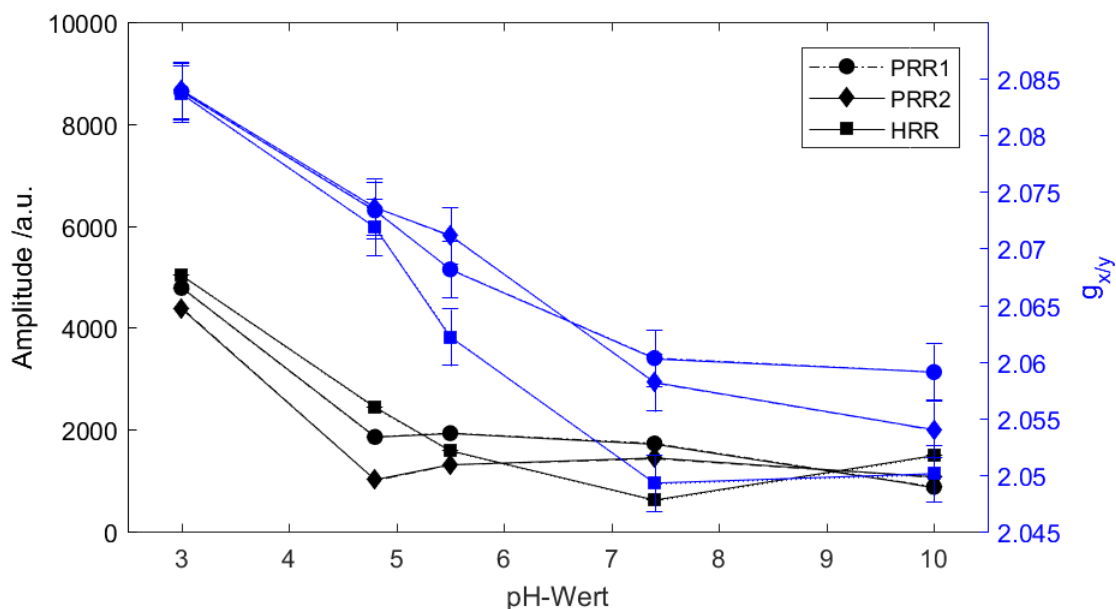


Abbildung 3.54: Zusammenstellung des Amplitudensignals und des ausgelesenen g -Wertes in äquatorialer Orientierung von Kupfer:Peptid 1:1 bei verschiedenen pH-Werten für die cw-X-Band-Spektren.

Anhand der 3-Puls-ESEEM-Spektren kann davon ausgegangen werden, dass das bei allen Peptiden und allen pH-Werten der Imidazolstickstoff des Histidins an das Kupfer koordiniert ist. Durch die Jahn-Teller-Verzerrung sind die Spektren in axialer Orientierung deutlich schlechter ausgelöst, da die Liganden eine größere Entfernung zum Zentralion Kupfer aufweisen, jedoch ergeben sich für beide Orientierungen die gleichen koordinierten Aminosäuren.

3.5.3. Metallionenbindungskapazität bei physiologischen Bedingungen

Es ist bereits bekannt, dass die Proteolyseprodukte des HPRGs Kupfer binden können.^[193] Da diese Fragmente jedoch nicht spezifisch einer Region angehören, soll nun der Einfluss der Regionen auf die gesamte Kupferbindungskapazität untersucht werden. Weiterhin gibt es bereits Erkenntnisse zu der Abfolge von kurzen Peptiden aus der HRR, welche jedoch nur die einzelnen repetitiven Einheiten^[194] oder den Effekt der Wiederholung einzelner repetitiver Einheiten ohne Berücksichtigung der eigentlichen Aminosäuresequenz umfassen.^[78,79]

Erste EPR-spektroskopische Charakterisierungen von HPRG wurden von *Muhoberac et al.*^[193] in den 1980er Jahren veröffentlicht und basieren auf der Titration von HPRG mit Kupfer bei physiologischem pH-Wert. Sie erkannten HPRG als ein Typ II Kupferkomplex mit den Parametern: $g_z = 2,25$; $g_{x/y} = 2,05$ und $A_z = 180$ G und dass HPRG bis zu 20 äquivalente Kupfer binden kann. Weiterhin wird bei diesen Untersuchungen von einer 4-Stickstoffkoordination oder einer 2-Stickstoff-2-Sauerstoffkoordination ausgegangen. Da die Isolation von rbHPRG von *Muhoberac et al.* allein auf Ionenaustauschchromatographie beruhte, und bereits durch *Leung et al.*^[41] gezeigt wurde, dass so häufig andere Proteine co-aufgereinigt werden, wurden hier ebenfalls Messungen mit HPRG mit Kupfer angefertigt.^[71]

Die HPRG:Kupfer-Verhältnisse wurden von 1:1 bis zu 1:20 variiert. Anschließend wurden Peptid:Kupfer-Verhältnisse gemessen, welche von 1:1 bis 1:5 reichten und in den nachfolgenden Unterkapiteln diskutiert werden

3.5.3.1. Metallionenbindungskapazität von HPRG

Die EPR-Spektren für die verschiedenen Protein:Kupfer-Verhältnisse bei pH 7,4 sind in Abbildung 3.55 gezeigt. Die Spektren wurden normiert und für eine bessere Vergleichbarkeit magnetfeldzentriert.

Man erkennt in den Spektren, dass diese sich deutlich von der Referenz von Kupfer in Wasser und auch von Kupfer in Puffer unterscheiden. Bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 sind die Superhyperfeinwechselwirkungen von Stickstoff in der äquatorialen Orientierung am deutlichsten ausgeprägt. Mit steigendem Kupferanteil nimmt die Stärke dieser ab, wobei sie bis zu einem Protein:Kupfer-Verhältnis von 1:20 erhalten bleiben. Weiterhin nimmt das SNR mit abnehmender Proteinkonzentration ab. Beides lässt darauf schließen, dass mit zunehmendem Kupferanteil eine Vielzahl verschiedener Kupferspezies entstehen, welche durch unterschiedliche Umgebungen und somit auch durch unterschiedliche Superhyperfeinwechselwirkungen der umgebenden Kerne gekennzeichnet sind. Weiterhin ist es möglich, dass Kupfer bereits beginnt als schwer lösliches Salz auszufallen, weshalb die EPR-aktive Kupfer-Konzentration abnimmt. Dies ist in Abbildung 3.56 zu sehen.

Das Amplitudensignal im Bereich der äquatorialen Orientierung nimmt ab. Es wurde nicht das Doppelintegral aufgetragen, da dieses stärker auf Spektren mit einem kleinen SNR, vor allem im Bereich der Basislinie, reagiert. Man erkennt in der Auftragung, dass mit abnehmenden Proteingehalt auch die Signalamplitude abnimmt. Dabei findet ein starker Abfall bis etwa

einem Protein:Kupfer-Verhältnis von 1:10 statt. Zwischen 1:10 und 1:20 ist der Abfall deutlich geringer, was für die Ausbildung einer Sättigung des Proteins durch Kupfer bei physiologischem pH-Wert spricht.

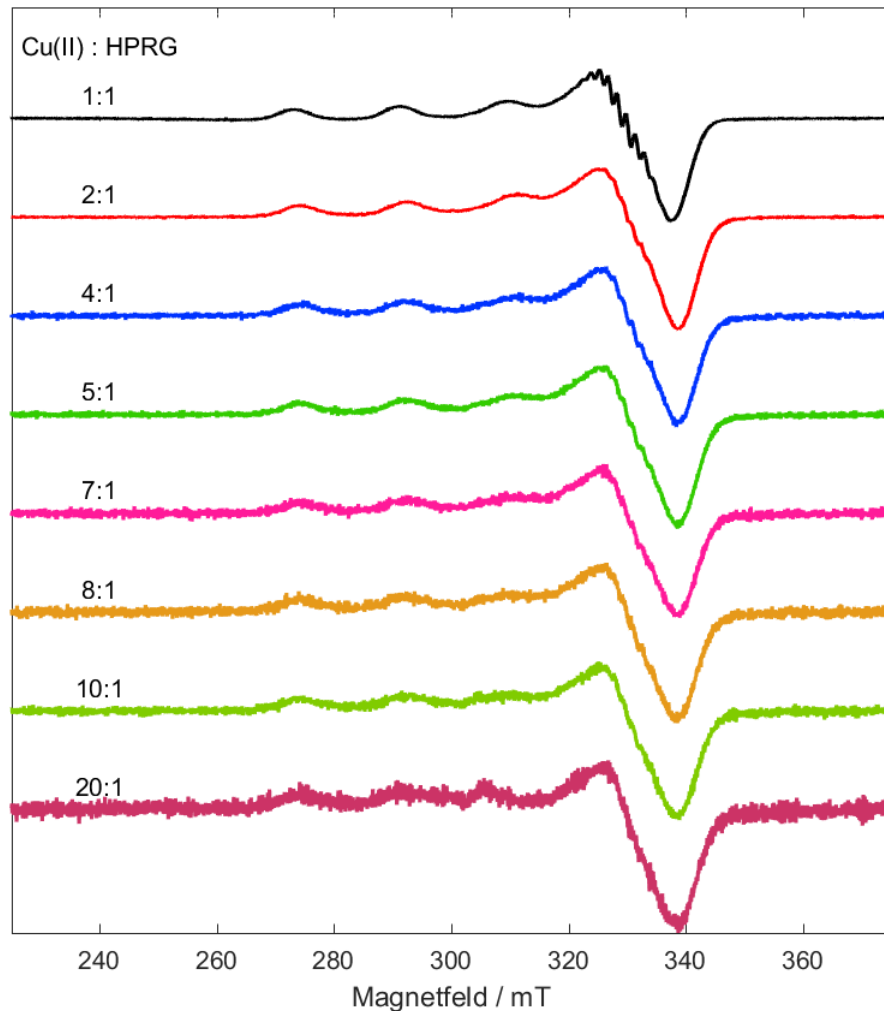


Abbildung 3.55: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer in PBS pH 7,4 in verschiedenen Kupfer:Protein-Verhältnissen bei 77 K. Die Konzentration des Kupfers beträgt 2 mM, die Konzentration des Proteins wurde entsprechend der Verhältnisse gewählt, um die gleiche effektive EPR-aktive Sondenkonzentration in allen Proben zu gewährleisten.

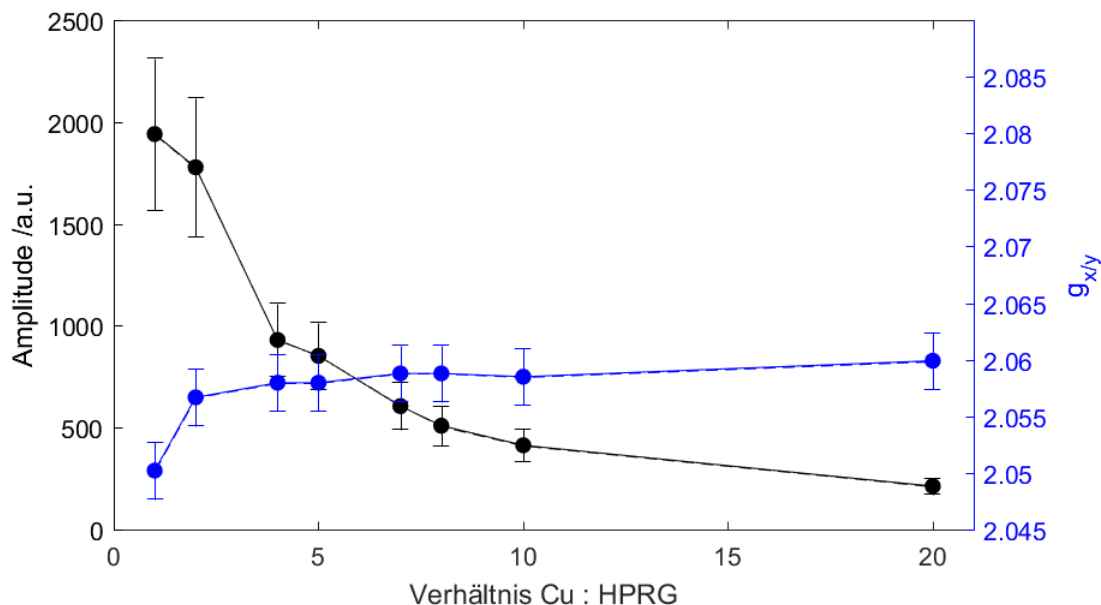


Abbildung 3.56: Zusammenstellung des Amplitudensignals und des ausgelesenen g -Wertes in äquatorialer Orientierung von Kupfer:HPRG in PBS pH 7,4. Die Konzentration des Kupfers beträgt 2 mM, die Konzentration des Proteins wurde entsprechend der Verhältnisse gewählt, um die gleiche effektive EPR-aktive Sondenkonzentration in allen Proben zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Daten wurde für die 1:1-Probe eine Superhyperfeinaufspaltung in 10 Linien mit einem Abstand von 1,52 mT bzw. 42,56 MHz gefunden, was jedoch weiterhin für eine Aufspaltung durch Imidazol spricht.^[195] Mit geringerer HPRG-Konzentration nimmt auch die Anzahl der Aufspaltungen durch Superhyperfeinwechselwirkungen ab, sodass bei einem Konzentrationsverhältnis ab 1:2 nur noch 7 Linien signifikant und ab 1:8 nur noch 5 Linien signifikant zu erkennen sind. Der Anteil an reinen Histidinkoordinationen am Kupfer nimmt zugunsten der Beteiligung weiterer Aminosäuren ab. Gleichzeitig findet keine Änderung in den Abständen der einzelnen Linien zueinander statt. Bei einem Protein:Kupfer-Verhältnis von 1:20 sind kaum noch Superhyperfeinwechselwirkungen zu erkennen, wodurch von diversen, unterschiedlichen Koordinationssphären am Kupfer auszugehen ist. Dadurch, dass nur noch eine geringe Abnahme in der Signalintensität zwischen den Konzentrationsverhältnissen 1:10 und 1:20 auftritt, scheint hier bereits eine Sättigung des HPRGs mit Kupfer erfolgt zu sein.

Ergänzend dazu kann der g -Wert der äquatorialen Ebene betrachtet werden. Dieser ist bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 bei etwa 2,050, steigt dann mit steigendem Kupferanteil auf etwa 2,057 an und bleibt über die restlichen Verhältnisse nahezu konstant. Es ergibt sich somit, dass sich die Ligandensphäre um das Kupfer zwischen 1:1 und 1:2 am

stärksten verändert wird, sodass bei höherem Kupferanteil unterschiedliche Kupferspezies entstehen, da die Konkurrenz um die Bindungspositionen am HPRG zunimmt.

Für einen genaueren Einblick in die Koordination des Kupfers sind noch ESE- und 3-Puls-ESEEM-Spektren ausstehend. Diese waren bisher aufgrund der Nichtverfügbarkeit des Puls-X-Band-Spektrometers bis zum Zeitpunkt der Abgabe noch nicht messbar.

3.5.3.2. Metallionenbindungskapazität von Peptiden des HPRGs

Neben dem vollständigen Protein wurden auch die Peptide in verschiedenen Konzentrationen EPR-spektroskopisch mit Kupfer vermessen. Die Spektren für verschiedene Peptid:Kupfer-Verhältnisse sind in Abbildung 3.57 gezeigt.

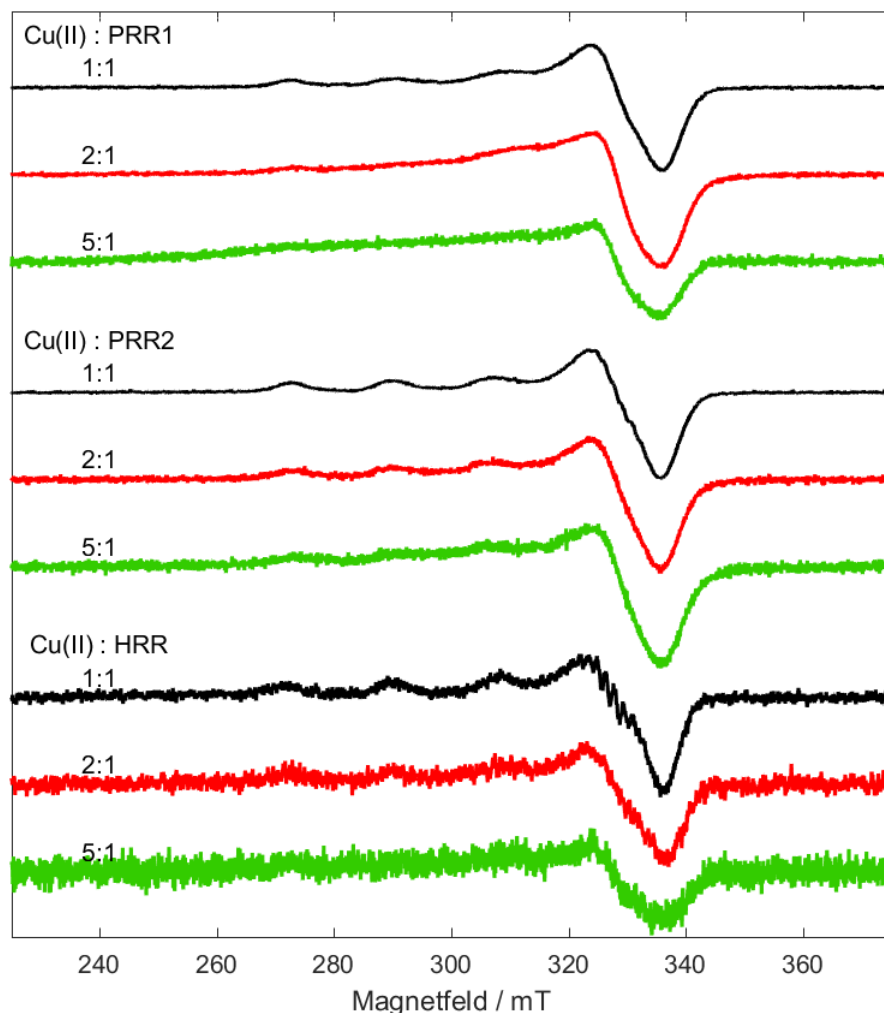


Abbildung 3.57: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von Peptid:Kupfer in PBS pH 7,4 in verschiedenen Kupfer:Peptid-Verhältnissen bei 77 K. Die Konzentration des Kupfers beträgt 2 mM, die Konzentration der Peptide wurde entsprechend der Verhältnisse gewählt, um die gleiche effektive EPR-aktive Sondenkonzentration in allen Proben zu gewährleisten.

Wie schon bei dem vollständigen Protein nimmt auch bei den Peptiden mit steigendem Kupferanteil das SNR ab, was zum einen auf mehrere Kupferspezies und zum anderen auf ausgefallenes Kupfer zurückzuführen ist.

Bei dem Peptid PRR1 ist im Gegensatz zu den anderen beiden Peptiden keine Superhyperfeinwechselwirkung mit Stickstoffkernen erkennbar. Auch die Spektrenform unterscheidet sich von den anderen Peptiden, weshalb von einer anderen Koordination um Kupfer ausgegangen werden kann. Vermutlich sind keine starken Stickstoffinteraktionen vorhanden. Mit zunehmendem Kupferanteil ändert sich die Spektrenform und der axiale Bereich im Spektrum wird nicht mehr aufgelöst. Kupfer ist demnach von verschiedenen Ligandensphären umgeben. Bei Betrachtung der Signalintensität und des g-Wertes der äquatorialen Ebene in Abbildung 3.61 wird deutlich, dass die größte Änderung zwischen dem Verhältnis 1:1 und 1:2 stattfindet. Das Kupfer koordiniert daher nicht mehr ausschließlich in seiner bevorzugten Bindungsposition an PRR1.

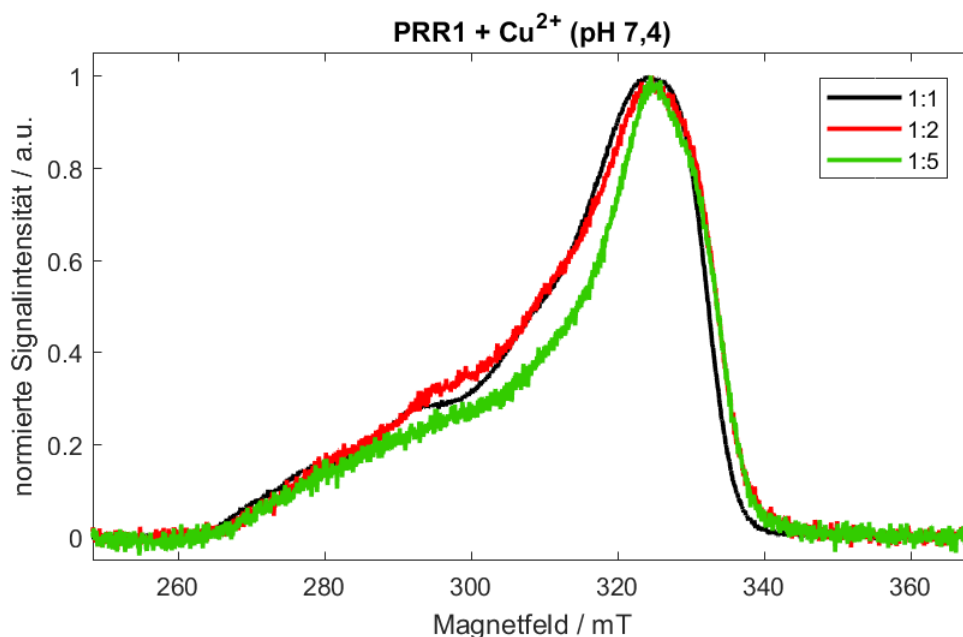


Abbildung 3.58: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid PRR1:Kupfer in PBS pH 7,4 in verschiedenen Kupfer:Peptid-Verhältnissen bei 20 K.

Werden die konzentrationsabhängigen ESE-Spektren des Peptides PRR1 mit Kupfer bei physiologischem pH-Wert in Abbildung 3.58 betrachtet, so wird erkennbar, dass sich die vorhandenen Kupferspezies mit zunehmendem Kupferanteil unterscheiden. Der axiale Bereich wird bereits ab einem Verhältnis von 1:2 nicht mehr aufgelöst. Vermutlich liegen mehr als zwei unterschiedliche, EPR-aktive Kupferspezies vor, wobei nur schwache Interaktionen mit Stickstoffkernen stattfinden, da keine Superhyperfeinwechselwirkungen zu sehen sind.

Betrachtet man die Bindung zwischen PRR2 und Kupfer, so fällt auf, dass in den cw-Spektren Superhyperfeinwechselwirkungen bei einem Verhältnis von 1:1 vorhanden sind, welche jedoch mit abnehmendem Peptidanteil verschwinden. Es resultiert daraus, dass die Anzahl von Kupferspezies mit unterschiedlichen Liganden zunimmt. Die Linien der Superhyperfeinwechselwirkungen haben einen mittleren Abstand von etwa 1,5 mT.

Der axiale Bereich im Spektrum bleibt bis zu einem Verhältnis von 1:5 aufgelöst, sodass die Kupferspezies ein ähnliches Ligandenumfeld haben. Auch bei der Betrachtung der Signalintensität und des g-Wertes in äquatorialer Ebene in Abbildung 3.61 zeigt sich, dass der größte Unterschied zwischen den Proben mit einem Verhältnis von 1:1 und 1:2 besteht. Zwischen einem Peptid:Kupfer-Verhältnis von 1:2 und 1:5 findet keine signifikante Änderung im g-Wert statt, was auf eine gleiche chemische Ligandenumgebung des Kupfers schließen lässt. Die Signalintensität nimmt zwischen den letzteren Proben leicht ab, was jedoch, ohne Änderung der chemischen Umgebung, auf ein Ausfallen von Kupfer hindeutet.

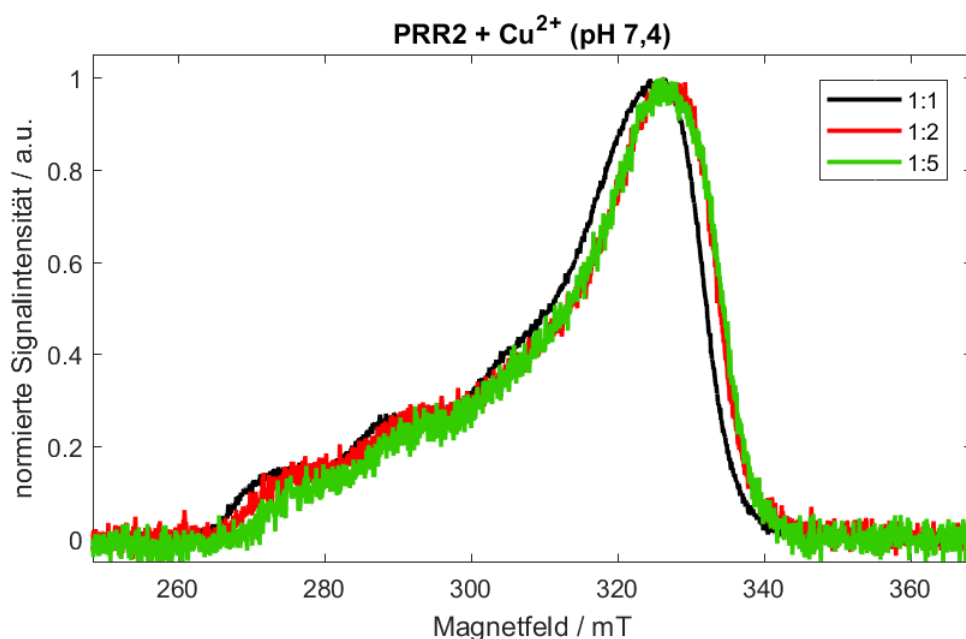


Abbildung 3.59: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid PRR2:Kupfer in PBS pH 7,4 in verschiedenen Kupfer:Peptid-Verhältnissen bei 20 K.

In Bezug auf die ESE-Spektren in Abbildung 3.59 erkennt man ebenfalls, dass sich die Probe mit einem Peptid:Kupfer-Verhältnis von 1:1 leicht von den anderen Messungen unterscheidet, wobei die Proben mit höheren Kupferanteilen nahezu identisch sind. Die Spektrenform bleibt auch hier gleich, was für die gleiche Koordinationsumgebung des EPR-aktiven Kupfers spricht. Vermutlich liegen hier zwei unterschiedliche EPR-aktive Kupferspezies vor.

Die Messungen von Kupfer mit dem Peptid HRR in Abbildung 3.60 zeigen mit Abstand das geringste SNR aller peptidhaltigen cw-X-Band Proben. Dafür sind hier aber auch die Superhyperfleinwechselwirkungen bei der Probe mit einem Kupfer:Peptid-Verhältnis von 1:1, mit einem mittleren Abstand von 1,4 mT bzw. 39,2 MHz zwischen den einzelnen Linien, am deutlichsten ausgeprägt. Die anderen Spektren weisen vermutlich ebenfalls eine solche Superhyperfleinwechselwirkung auf, jedoch kann dies aufgrund des schlechten SNRs nicht signifikant identifiziert werden. Bei den Messungen mit HRR wird als einziges Peptid ein deutlicher Anstieg im g-Wert zwischen den Proben mit einem Peptid:Kupfer-Verhältnis von 1:2 und 1:5 beobachtet.

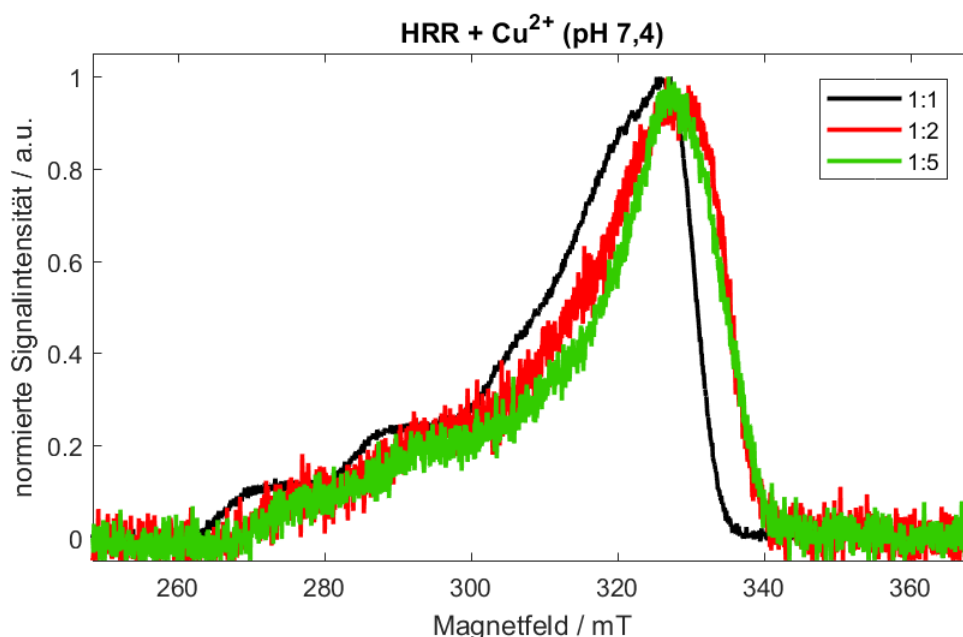


Abbildung 3.60: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid HRR:Kupfer in PBS pH 7,4 in verschiedenen Kupfer:Peptid-Verhältnissen bei 20 K.

In den ESE-Spektren von HRR-haltigen Kupferproben zeigt sich, dass sich der Verlauf des Maximums der äquatorialen Ebene mit steigendem Kupferanteil ändert. Während bei der Probe mit einem Verhältnis von 1:1 eine Schulter links des Maximums beobachtet wird, bildet sich bei der 1:2 Probe ein doppeltes Maximum aus. Bei der 1:5 Probe befindet sich eine Schulter auf der rechten Seite des Maximums. Dies resultiert daraus, dass sich die Koordination des Kupfers mit steigendem Gehalt ändert. Neben stark gebundenen Stickstoffen bei der 1:1 Probe nimmt der Anteil der schwach gebundenen Stickstoffe mit steigendem Kupferanteil zu. Dies weist auf Verknüpfungen verschiedener Peptide über Kupferkerne hin. Messungen der Transmission von HRR mit Kupfer, zu sehen in Abbildung A.38, zeigen einen starken Abfall, was diese Aussage bestätigt.

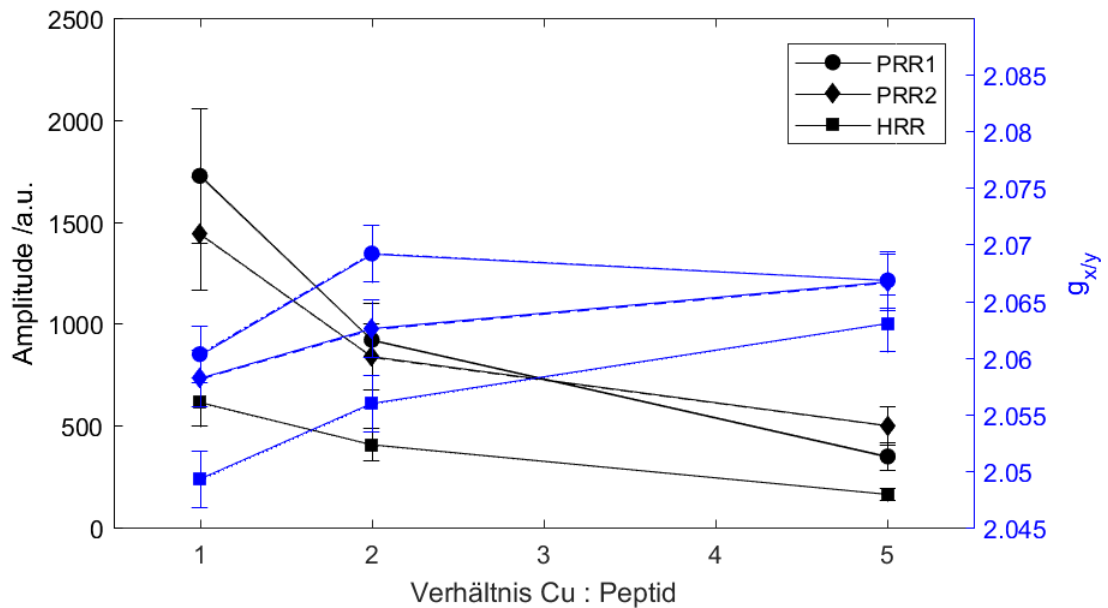


Abbildung 3.61: Zusammenstellung des Amplitudensignals und des ausgelesenen g -Wertes in äquatorialer Orientierung von Kupfer:Peptid in PBS pH 7,4 für die cw-X-Band-Spektren. Die Konzentration des Kupfers beträgt 2 mM, die Konzentration der Peptide wurde entsprechend der Verhältnisse gewählt, um die gleiche effektive EPR-aktive Sondenkonzentration in allen Proben zu gewährleisten. Es wurden auch orientierungsselektive 3-Puls-ESEEM-Messungen zu den Peptid:Kupfer-Verhältnissen 1:1 durchgeführt. Die Spektren sind in Abbildung 3.62 und Abbildung 3.63 gezeigt. Grundsätzlich erkennt man, dass alle Proben eine starke Stickstoffinteraktion, im Bereich zwischen 0-2 MHz zu erkennen, und eine Protoneninteraktion im Bereich von etwa 14 MHz in der äquatorialen Orientierung zeigen. Weiterhin ist der Doppelquantenübergang der Stickstoffkopplung bei etwa 4 MHz zu erkennen. Die Einzelquantenübergänge der Stickstoffkopplung zeigen für PRR1 und HRR eine Schulter bei dem ν -Übergang, wohingegen bei PRR2 ein deutliches Signal ausgebildet ist. Dementsprechend unterscheiden sich die Proben leicht in ihren Quadrupolkopplungsparametern. Während die Quadrupolkopplungskonstante für alle Proben bei 0,44 MHz liegt, beträgt er Asymmetrieparameter bei der PRR2 0,66 und bei den anderen beiden Peptiden 0,5 bzw. 0,52. Diese Werte liegen im Bereich der Koordination von Stickstoffen von Imidazol bzw. der Histidinseitenkette am Kupfer.^[116,192]

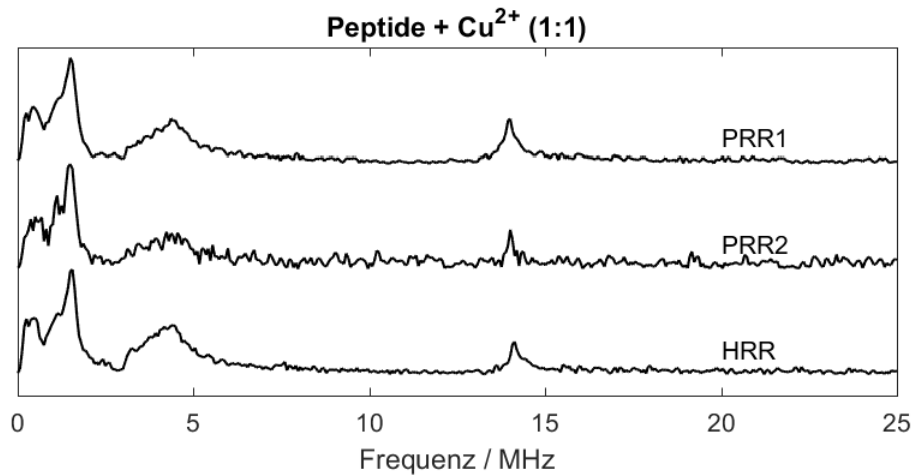


Abbildung 3.62: 3-Puls-ESEEM-Spektren von den Peptiden:Kupfer 1:1 bei 20 K, gemessen in der äquatorialen Orientierung.

Für die axiale Orientierung wurden ebenfalls 3-Puls-ESEEM-Messungen durchgeführt, welche ein jedoch deutlich schlechteres SNR liefern, sodass für die PRR2 keine Berechnung der Quadrupolparameter durchgeführt wurde. Für die anderen beiden Peptidproben erkennt man zwischen 0-2 MHz die Stickstoffkopplung, wobei bei 4 MHz auch der Doppelquantenübergang zu sehen ist. Das Protonensignal, welches bei der magnetfeldabhängigen Larmorfrequenz bei etwa 12,3 MHz liegen sollte, ist in den Spektren nicht zu erkennen. Die Quadrupolkopplungskonstante beträgt 0,44 MHz für PRR1 und 0,43 MHz für HRR, wobei die jeweiligen Asymmetrieparameter 0,57 bzw. 0,46 beträgt. Auch diese Werte lassen auf koordinierte Histidine schließen.

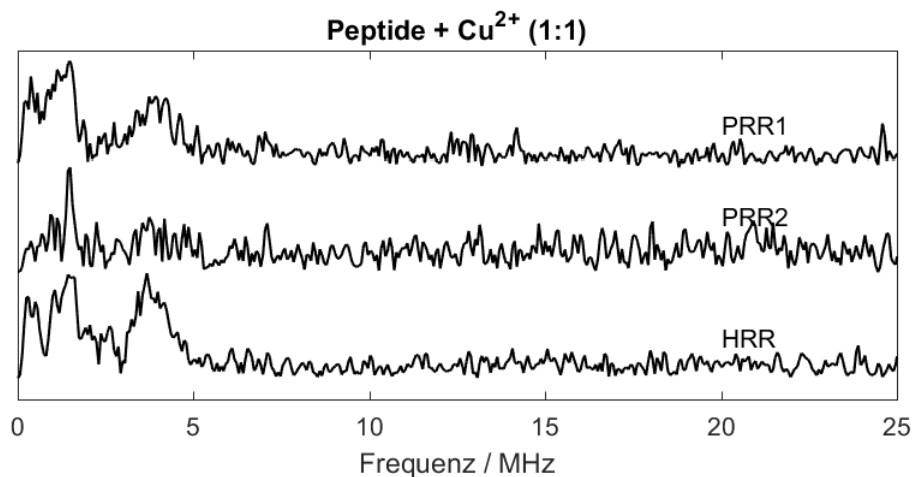


Abbildung 3.63: 3-Puls-ESEEM-Spektren von den Peptiden:Kupfer 1:1 bei 20 K, gemessen in der axialen Orientierung.

Tabelle 3.14: Werte für den Asymmetrieparameter und die Quadrupolkopplungskonstante für die 3-Puls-ESEEM-Spektren der Peptidproben für physiologische Bedingungen für die Stickstoffsignale.

Probe	Äquatoriale Orientierung		Axiale Orientierung	
	κ / MHz	η_{as}	κ / MHz	η_{as}
PRR1	0,44	0,52	0,44	0,57
PRR2	0,44	0,66	-	-
HRR	0,44	0,50	0,43	0,46

3.5.3.3. Zusammenfassung der Metallionenbindungskapazität

Die Metallionenbindung bei physiologischem pH-Wert konnte mittels EPR-Spektroskopie charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Messungen des HPRGs mit Kupfer mit den Untersuchungen von *Muhoberac et al.*^[193] größtenteils übereinstimmen. Daher scheint die Art der Aufreinigung keinen Einfluss auf das Kupferbindungsverhalten des HPRGs zu haben.

Es konnte festgestellt werden, dass die EPR-Spektren von HPRG mit Kupfer ab einem Protein:Kupfer-Verhältnis von etwa 1:10 keine Änderung mehr in ihrer Signalintensität aufweisen, weshalb von einer Sättigung des Proteins mit Kupfer ausgegangen werden kann. Aus den Spektren ist auch ersichtlich, dass Superhyperfeinwechselwirkungen mit Stickstoffen vorhanden sind. Daher kann angenommen werden, dass die Bindung des Kupfers vorrangig durch Stickstoffe erfolgt. Die Zugehörigkeit der Stickstoffe zu den Aminosäuren geht aus den cw-Spektren nicht eindeutig hervor, weshalb hier noch Puls-EPR-Spektren aufgenommen werden müssen.

Weiterhin wurde das Metallionenbindungsverhalten der Peptide untersucht. Auch hier zeigen alle Peptide eine Metallbindung, welche je nach Peptid unterschiedlich ausfällt. Während bei PRR1 keine Superhyperfeinwechselwirkungen zu sehen sind und somit nur von einer schwachen Interaktion zu Kupfer ausgegangen werden kann, zeigen die beiden anderen Peptide deutliche Stickstoffinteraktionen. Alle Peptide binden zwischen 2 bis 3 Kupfer(II)-Ionen, was aus der Auftragung der Signalintensität und des Doppelintegrals hervorgeht. Das Peptid PRR1 bindet vermutlich 2 Kupfer, da hier auch keine g-Wert-Änderung mehr erfolgt. Bei den anderen beiden Peptiden ist von vermutlich 3 Kupfer(II)-Ionen auszugehen, welche an das Protein koordiniert sind.

Anhand der 3-Puls-ESEEM-Messungen konnte bei dem Peptid:Kupfer-Verhältnis von 1:1 ein Einblick in die Koordinationssphäre des Kupfers gewonnen werden. Diese offenbaren, dass vorrangig Histidin über seine Seitenkette an Kupfer koordiniert ist.

4. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Aspekte der Bindung verschiedener Liganden an HPRG und den Peptiden des HPRGs spektroskopisch untersucht.

Dazu musste zunächst eine Aufreinigungsmethode gefunden werden, welche eine möglichst hohe Ausbeute, aber auch eine möglichst hohe Reinheit des HPRGs für die Bindungsstudien ermöglicht. Dazu wurden verschiedene bereits veröffentlichte Methoden getestet und schlussendlich eine eigene Methode etabliert. Diese beinhaltet eine Affinitätschromatographie und eine Kationenaustauschchromatographie, welche eine Ausbeute von etwa 44 % der maximal möglichen Menge aus Kaninchenserum und eine Reinheit von etwa 92 % erzielte. Weitere Proteine, welche mittels Massenspektrometrie in Anteilen von unter 1 % nachgewiesen wurden, sind auf den Gelen der SDS-PAGE nicht zu sehen, sodass auch hier von Miniorkontaminanten ausgegangen werden kann, welche in dieser Konzentration keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten von HPRG haben.

Bei den EPR-Messungen zur Charakterisierung des reinen Proteins zeigte sich, dass HPRG selbst eine radikalische Spezies ist. Das Protein zeigt alle Anzeichen eines Nitroxidradikals, welches jedoch unaufgelöste Hyperfeinwechselwirkungen durch $I = 1/2$ -Kerne zeigt. Weiterhin verfällt sich das HPRG-Radikal bei Anwesenheit von Licht, Metallionen und Oxidationsmitteln deutlich anders als TEMPO als typisches Nitroxidradikal.

Zur Beantwortung der Frage nach der Interaktion mit verschiedenen Liganden wurden verschiedene EPR-aktive Sonden mit HPRG und den Peptiden des HPRGs gemessen. Diese Messungen ergeben, dass bevorzugt Fettsäuren an das Protein und dessen Peptide binden. Weiterhin war es möglich MTSSL kovalent an die freien Cysteine des HPRGs zu binden.

Einhergehend mit dem Ligandenbindungsverhalten wurde auch EPR-Messungen mit Kupfer(II) durchgeführt. Die pH-abhängige Bindung stand neben der Metallionenbindungskapazität im Vordergrund. Dafür war es zunächst notwendig, Untersuchungen zur Stabilität des HPRGs bei den verschiedenen pH-Werten durchzuführen, welche zeigten, dass kurzzeitig HPRG von pH 3 bis pH 11,5 stabil ist, was durch Fluoreszenzmessungen, Messung der dynamischen Lichtstreuung und Gelelektrophorese bestätigt wurde. Dabei ändert HPRG je nach pH-Wert vermutlich seine Konformation, wobei ein Abbau erst nach einiger Zeit beobachtet werden konnte. Durch den zeitlich verzögerten Abbau wurden Bindungsstudien von Kupfer bei verschiedenen pH-Werten ermöglicht. Um auch hier ein Bild über die Beteiligung der

einzelnen Regionen des HPRGs zu erhalten, wurden diese Messungen ebenfalls mit den Peptiden durchgeführt.

Bei diesen Messungen zeigte sich, dass HPRG stark pH-abhängig Kupfer bindet. Dabei kann aus den cw-X-Band-Spektren vermutet werden, dass vor allem die Ladung der einzelnen Aminosäuren für die Bindung von Kupfer verantwortlich ist. Mit zunehmenden pH-Wert nimmt auch der Anteil an Stickstoffen, welche an das Kupfer koordiniert sind, zu, wobei anhand der Spektren von einer Bevorzugung des Histidins ausgegangen werden kann. Um dies bestätigen zu können, müssen noch die Puls-EPR-Messungen ergänzt werden, welche einen genaueren Einblick in die Koordinationssphäre des Proteins ermöglichen. Auch die Peptide zeigen eine starke pH-Abhängigkeit der Bindung, wobei zwischen den Peptiden deutliche Unterschiede bestehen.

Zur Abschätzung der Metallionenbindungskapazität von HPRG und seinen Peptiden bei physiologischen Bedingungen wurden verschiedene Protein:Kupfer-Verhältnisse gewählt. Dabei zeigten die einzelnen Peptide zueinander und auch gegenüber HPRG deutliche Unterschiede in der Koordination des Kupfers. Auch hier sind noch die Puls-EPR-Messungen für HPRG ausstehend, um die interagierenden Aminosäuren bei den unterschiedlichen Kupferanteilen näher charakterisieren zu können.

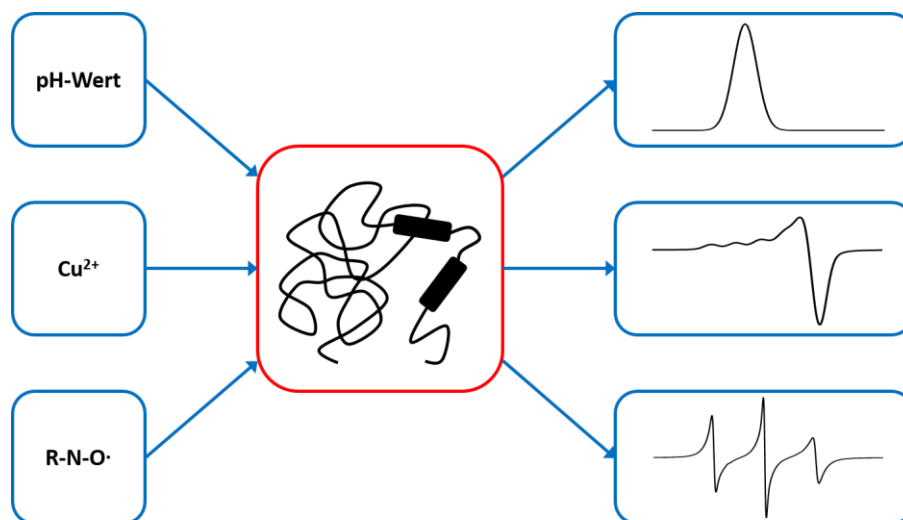


Abbildung 4.1: Schematische Zusammenfassung der Dissertation.

Im Folgenden soll noch ein Ausblick, aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen, zur weiteren Charakterisierung des HPRGs gegeben werden:

An erster Stelle sollten die Analyse der radikalischen Form des HPRGs stehen. Dazu ist es notwendig, die genaue Position des paramagnetischen Zentrums zu bestimmen. Dazu sind folgende Ansätze denkbar: Man kann versuchen, HPRG rekombinant, mit verschiedenen isotopenmarkierten Aminosäuren herstellen. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass dieses Protein, sofern es in E. coli-Zellen produziert wird, keine Glykosilierung aufweist. Eine Isotopenmarkierung kann in der Verwendung von ^{15}N -markierten Aminosäuren bestehen, welche aufgrund des Kernspins von $I = 1/2$ nur 2 Signale im EPR-Spektrum zeigen. Diese Markierung erleichtert zusätzlich die Bestimmung der mit Metallionen interagierenden Aminosäuren deutlich, da nun zwischen ^{14}N - und ^{15}N -Stickstoffen unterschieden werden kann. Eine andere Möglichkeit zur Identifikation des paramagnetischen Zentrums kann durch eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung des HPRG erfolgen. Durch beispielsweise saure Hydrolyse kann das Protein in seine einzelnen Aminosäuren zerlegt werden, welche dann chromatographisch nach der Art der Aminosäure und ihrem Anteil analysiert werden können.^[196] Dabei werden jedoch auch einzelne Aminosäuren verändert, sodass manche Aminosäuren nicht nachweisbar sind.^[197] Weiterhin besteht die Gefahr, dass bei der Hydrolyse das paramagnetische Zentrum destabilisiert wird und sich nicht mehr an der Aminosäure als solches befindet. Als weiterer Anhaltspunkt für die Position des ungepaarten Elektrons am Protein können weitere Messungen des Verhaltens bei der Anwesenheit verschiedener Oxidations- und Reduktionsmittel sein.

Auch die Anwendung von Fluoreszenzquenchingmethoden kann hierbei zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität genutzt werden. Möglich ist hier auch eine Kombination eines Fluoreszenzquenching-Tests mit der EPR-Spektroskopie. Als Beispiel soll hier der HORAC-Assay angeführt werden. Dieser basiert auf dem Nachweis von Hydroxylradikalen, welche Fluorescein oxidieren. Bei Anwesenheit einer antioxidativ wirksamen Substanz werden die Hydroxylradikale abgefangen und die Oxidation des Farbstoffes wird entsprechend verlangsamt.^[165] Nun kann dieser Test für HPRG auch EPR-spektroskopisch durchgeführt werden. Wenn HPRG die Hydroxylradikale abfängt, wird das paramagnetische Zentrum des HPRGs abgebaut werden und das EPR-Signal wird abnehmen. Somit erhält man über die Fluoreszenzmethode die Konzentration der Hydroxylradikale, welche EPR-spektroskopisch aufgrund des ^{16}O -Sauerstoffs nicht verfolgt werden können, und mittels EPR-Spektroskopie die Konzentration an paramagnetischen HPRGs.

Weiterhin kann untersucht werden, ob auch HPRG von anderen Organismen die radikalische Spezies ausbildet und, falls ja, ob sie sich wie die des rbHPRGs verhält. Dazu muss die Aufreinigung auf die Isolation von HPRG aus humanem Serum und bovinem Serum angepasst werden.

Als ein weiterer Aspekt kann natürlich auch die Ligandenbindung EPR-spektroskopisch weiterverfolgt werden. In dieser Arbeit wurde bisher mit einem Protein:Ligand-Verhältnis von 10:1 gearbeitet, um Effekte möglichst deutlich erkennen zu können. Da, vor allem die Doxylstearinsäuren eine starke Interaktion zeigten, kann hier die Auswirkung verschiedener Konzentrationen auf Anzahl der gebundenen Liganden betrachtet werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit weitere EPR-aktive Moleküle, auch pharmakologisch aktive, spin-markierte Molekülen, zu nutzen und diese auf eine Bindung mit HPRG zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung des Proteins ist die Wiederholung der Bindungsexperimente mit anderen EPR-aktiven Metallionen, wie Eisen oder Nickel, welche ebenfalls an HPRG binden sollen. Dazu sollten auch die ausstehenden Puls-EPR-Messungen der Kupferhaltigen Proteinproben ergänzt werden. Weiterhin kann die Möglichkeit der kovalenten Verknüpfung des Proteins mit einem Spinlabel dazu genutzt werden, einen tieferen Einblick in die Ligandenbindung zu erhalten. Durch Messung von Abständen zwischen den ungepaarten Elektronen zweier EPR-aktiver Moleküle, beispielsweise MTSSL mit der Doxylgruppe von gebundenem 16-DSA, kann die Bindung der Fettsäureanaloga näher bestimmt werden.

Erste Messungen zeigten weiterhin, dass HPRG eine schwache Oberflächenaktivität zeigt – das Protein adsorbiert an Lipidmembranen.

Schlussendlich kann der Effekt der Glykosilierung auf das Löslichkeitsverhalten, die Ligandenbindung und auf die Stabilisierung des HPRG-Radikals untersucht werden. Erste Messungen zeigten, dass es möglich ist, HPRG vollständig enzymatisch zu deglykosilieren. Nachfolgend muss eine Möglichkeit gefunden werden, das Enzym von dem deglykosilierten Protein abzutrennen, wobei das Protein seine native Form behalten sollte. Anschließend kann eine spektroskopische Charakterisierung des deglykosilierten HPRGs analog zu den Messungen in dieser Arbeit erfolgen.

5. Material und Methoden

5.1. Materialien

5.1.1. Chemikalien

5.1.1.1. Aufreinigung und Probenpräparation

Chemikalien	Hersteller	Reinheit
2-Methylbutan	Carl Roth	> 99 %
Calciumchlorid	Carl Roth	96 %
Ethanol	Carl Roth	HPLC Gradient Grade
Ethylendiamintetraessigsäure- dinatriumsalz Dihydrat	Sigma Aldrich	BioUltra, 98,5 - 101,5 %
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth	> 98 %
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth	> 99,5 %, p.a.
Eisen(II)-chlorid Tetrahydrat	Sigma Aldrich	98 %
Eisen(III)-chlorid (wasserfrei)	Carl Roth	reinst
Glycerol	Acros	86-89 %
Imidazol	Carl Roth	> 99 %
Inhibitorcocktail Gewebe	Carl Roth	-
Kaliumchlorid	Merck	p.a.
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth	> 99 %, p.a.
Kupfer(II)-chlorid Dihydrat	Merck	> 99 %
L-Ascorbinsäure	Carl Roth	> 99 %, p.a.
MES	Carl Roth	> 99 %
Manganchlorid Tetrahydrat	Alfa Aesar	99 %
Methyl- α -D-glucopyranosid	Sigma Aldrich	> 99 %
Natriumacetat Trihydrat	Carl Roth	> 99,5 %
Natriumchlorid	Carl Roth	> 99,5 %
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth	> 99 %, p.a.
Natriumhydroxid-Lösung (1 M)	Fisher Chemicals	-

Materialien

Chemikalien	Hersteller	Reinheit
Salzsäure-Lösung (1 M)	Fisher Chemicals	-
Tris	Merck	> 99,8 %
Wasser	Milli Q	TOC < 5 ppm
Wasserstoffperoxid	Carl Roth	30 %, p.a.
Zink(II)-chlorid	Fluka	-

5.1.1.2. SDS-PAGE

Chemikalien	Hersteller	Reinheit
Acrylamid (ROTIPHORESE® Gel 30 (37,5:1))	Carl Roth	-
Ammoniumperoxodisulfat	AppliChem	> 98 %
Bromphenolblau	Carl Roth	ASC
Coomassie-Färbelösung (ROTI® Blue)	Carl Roth	-
Essigsäure	Laborchem. Int.	100 %
Glycin	Laborchem. Int.	> 99 %
Isopropanol	Carl Roth	HPLC Grade
Methanol	Carl Roth	HPLC Ultra Gradient Grade
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth	99 %
Proteinmarker: Protein Marker III	AppliChem	-
Proteinmarker: Unstained Protein Molekular Weight Marker	Thermo Scientific	-
Temed	AppliChem	99 %
Tris Base	Merck	> 99,8 %

5.1.1.3. EPR-Sonden

Chemikalien	Hersteller	Reinheit
TEMPO	Sigma Aldrich	-
16-DSA	Sigma Aldrich	-
5-DSA (Ammoniumsalz)	Avanti	-
CAT-1	CDN	-

Material und Methoden

Chemikalien	Hersteller	Reinheit
Fremys Salz	Sigma Aldrich	-
¹⁵ N Fremys Salz	In der Arbeitsgruppe synthetisiert	-
TOAC	Alexis Biochemicals	-
MTSSL	Abcam	-

5.1.2. Standard- Puffer

PBS-Puffer	10 mM Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat 137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid pH 7.4
------------	--

5.1.3. Geräte-Übersicht

Gerät	Modell und Hersteller
UV-Vis-Spektrometer	Hewlett-Packard 8453 mit Temperiereinheit 89090A
Fluoreszenzspektrometer	FluoroMax2 von Horiba / Jobin Yvon / ISA mit einem Temperatur Controller von Julabo
DLS-Gerät	Anton Paar Litesizer 500
Miniscope	MS 5000 von Freiberg Instruments mit der zugehörigen Temperatureinheit von Freiberg Instruments
pH Elektrode	Thermo Scientific Orion VersaStar
Puls X-Band-Spektrometer	Siehe Abschnitt 5.5.2
Gele	Mini-Protean-Tetra-Cell mit PowerPac Basic
HPLC	Cytiva Äkta Pure 25
Gefriertrocknung	Heto PowerDry LL3000 von Thermo Fisher und einer Welch-Pumpe
Reinstwasseranlage	MILLI-Q® ADVANTAGE A10® SYSTEM von Millipore

5.2. Methoden der Proteinaufreinigung

Die Isolation von rbHPRG aus Serum erfolgte mittels dem Chromatographiesystem „Äkta Pure M“ von Cytiva, mit einem variablen Multiwellenlängendetektor mit einer Schichtdicke von 2 mm, einem Leitfähigkeitsmonitor und einem 1,4 ml Mixer. Die Probenaufgabe erfolgte mittels einem 50 ml Superloop von Cytiva.

Alle Pufferlösungen wurden vor der Verwendung durch Sartolon Polyamid-Filter 0,2 µM von Sartorius unter Vakuum filtriert und entgast.

5.2.1. Affinitätschromatographie

Für die Isolation von rbHPRG aus Serum wurde gefrorenes Kaninchenserum verwendet, welches in 25 ml Aliquots verwendet wurde. Um die Proeolyse während der Aufreinigung bei Raumtemperatur zu verhindern, wurde zu dem Plasma „Inhibitorcocktail Gewebe“ von Carl Roth gegeben. Die Affinitätschromatographie erfolgt mittels einer 5 ml „HiTrap TALON crude“ Säule von Cytiva. Um die 25 ml Serum direkt auf die Säule aufgeben zu können, wurde ein Superloop mit einem Volumen von 50 ml von Cytiva verwendet. Nach der Probenaufgabe auf die mit Bindungspuffer equilibrierte Säule, wurde die Säule mit 5 CV Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren. Im Anschluss erfolgte die Elution der spezifisch gebundenen Proteine mittels einer Stufenelution. Vormessungen (nicht gezeigt) zeigten, dass HPRG bereits bei einer Imidazolkonzentration von etwa 150 mM von der Säule zu eluieren beginnt. Deshalb wurde zunächst mit einer Imidazolkonzentration von 44 mM, gefolgt von 308 mM und, zur vollständigen Elution aller Proteine, mit 500 mM Imidazol eluiert.

Säule	Cytiva HiTrap TALON crude, 5 ml
Probenaufgabe	25 ml Serum
Detektion	280 nm und Leitfähigkeit
Flussrate	Probenaufgabe: 1 ml/min Elution: 5 ml/min
Fraktionsvolumen	5 ml
Ablauf	1 CV - Equilibrieren mit Bindungspuffer (Inlet A2) Probenaufgabe 5 CV - Waschpuffer (Inlet A1)

Stufenelution mit Fraktionierung zu je 5 ml (= 1 CV):
 7 CV - 5 % Elutionspuffer (B1) + 95 % Waschpuffer (A1)
 7 CV - 60 % Elutionspuffer (B1) + 40 % Waschpuffer (A1)
 7 CV - 100 % Elutionspuffer (B1)

Die Puffer sind wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 5.1: Zusammensetzung der Puffer für die Co-Affinitätschromatographie.

Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer	50 mM Phosphat 50 mM Natriumchlorid pH 7,4
Waschpuffer	50 mM Phosphat 50 mM Natriumchlorid 5 mM Imidazol pH 7,4
Elutionpuffer	50 mM Phosphat 150 mM Natriumchlorid 500 mM Imidazol pH 7,4
Regenerationspuffer	20 mM MES 100 mM Natriumchlorid pH 5

5.2.2. Kationenaustauscher

Um eventuell von der Affinitätssäule ausgeschleppte Metallionen aus der Lösung zu entfernen, wurde ein Umpufferungsschritt in den EDTA-haltigen Startpuffer für die Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Die Einzelheiten dazu sind in Kapitel 5.2.3 aufgeführt.

Für die Kationenaustauschchromatographie wird der Kationenaustauscher HiTrap SP FF von Cytiva mit einem Säulenvolumen von 5 ml verwendet. Auf diesen werden die (umgepufferten) Fraktionen 8 und 9 der Affinitätschromatographie mit einer Flussrate von 1 ml/min nach der Equilibrierung der Säule mit Startpuffer (ohne EDTA) aufgegeben.

Methoden der Proteinaufreinigung

Nach Waschen der Säule mit Bindungspuffer, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurden die Proteinen mit einem Gradienten von 0 bis 500 mM Natriumchlorid eluiert. Dabei eluiert HPRG als breiter Peak ab Fraktion 15 (bei einer NaCl-Konzentration von 350 mM). Zu Isolation eines isoelektrisch reinen Proteins wurden jedoch Fraktion 17-22 verwendet (ab einer Natriumchlorid-Konzentration von 400 mM).

Säule	Cytiva HiTrap SP Sepharose Fast Flow, 5 ml
Probenaufgabe	Fraktionen der Affinitätschromatographie (Fr. 8-9 = 10 ml)
Detektion	280 nm und Leitfähigkeit
Flussrate	Probenaufgabe: 1 ml/min Elution: 5 ml/min
Fraktionsvolumen	5 ml
Ablauf	5 CV Equilibrierung mit Startpuffer (A1) Probenaufgabe 8 CV Waschen mit Startpuffer (A1) Gradientenelution mit Fraktionierung zu je 10 ml (= 2 CV): Gradient über 20 CV von 0 % Elutionspuffer (B1) bis 50 % Elutionspuffer (B1) Gradient über 5 CV von 50 % Elutionspuffer (B1) bis 100 % Elutionspuffer (B1) 5 CV 100 % Elutionspuffer (B1)

Die Puffer und Lösungen für die Kationenaustausch-Chromatographie sind wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 5.2: Zusammensetzung der Puffer für die Kationenaustausch-Chromatographie

Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer	20 mM Phosphat pH 6
Elutionspuffer	20 mM Phosphat 1000 mM Natriumchlorid pH 6
Lagerungspuffer	0,2 M Natriumacetat (Trihydrat) in 20 % (v/v) Ethanol

5.2.3. Dialyse / Entsalzung

Das Umpuffern der Fraktionen der Co-Affinitätschromatographie und das Entsalzen der Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie für die Lyophilisation des reinen Proteins wurde mittels Dialyse bzw. mittels Entsalzung durch eine „Desalting“-Säule an der Äkta Pure durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Nutzung der Chromatographiemethode deutlich schneller und ebenso zuverlässig wie die Dialyse funktionierte. Daher wurde die chromatographische Methode für beide Umpufferungsschritte genutzt, wobei der Ablauf gleich war. Das Lösungsmittel für die Umpufferung nach der Affinitätschromatographie war Phosphatpuffer mit Zugabe von EDTA, für die Entsalzung der Proben für die Lyophilisation wurde Wasser (MilliQ) verwendet.

Als Säule wurde eine „HiPrep 26/10 Desalting“ von Cytiva mit einem Säulevolumen von etwa 53 ml verwendet. Als Probenmenge wurden 10 ml der entsprechenden, vereinigten Fraktionen mit einer Flussrate von 10 ml/min mittels einem Superloop mit einem Volumen von 50 ml von Cytiva aufgegeben. Die Fraktionen mit einem Absorptionssignal bei einer Wellenlänge von 280 nm wurden vereinigt.

Säule	Cytiva HiPrep 26/10 Desalting, 53 ml
Probenaufgabe	10 ml der Fraktionen der Co-Affinitätschromatographie
Detektion	280 nm und Leitfähigkeit
Flussrate	Probenaufgabe: 10 ml/min Elution: 10 ml/min
Fraktionsvolumen	10 ml
Ablauf	1 CV - Equilibrieren mit entsprechendem Puffer Probenaufgabe 1 CV Elution mit entsprechendem Puffer

Tabelle 5.3: Zusammensetzung der Puffer bzw. Lösungen für die Um-/Entsalzung..

Puffer	Zusammensetzung
EDTA-haltiger Startpuffer	20 mM Phosphat 5 mM EDTA pH 6
Für Lyophilisation	MilliQ Wasser

Die Proben wurden in 15 ml Falcon® Röhrchen gefriergetrocknet. Dafür wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Mit einem Vakuum von 0,3 mbar und einer Temperatur von -55 °C wurden die Proben für etwa 24 h getrocknet, bis kein Eis mehr in den Röhrchen zu sehen war. Dafür wurde die Gefrierdrying „Heto PowerDry LL3000“ in Kombination mit der Vakuumpumpe „CRV pro6“ von Welch genutzt. Die lyophilisierten Proben wurden bei -80 °C gelagert.

5.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode, bei der Moleküle oder Proteine in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Ladung separiert werden können. Häufig wird dafür eine diskontinuierliche Elektrophoresemethode, bestehend aus 2 verschiedenen Gelabschnitten, genutzt. Das Trenngel und das Sammelgel unterscheiden sich im pH-Wert und in der Polymerisationsdichte. Das weitporigere Sammelgel dient zur Fokussierung und Aufkonzentrierung der Proteine in einer Bande, welche dann als scharfe Bande auf das engporige Trenngel übergehen soll, in dem die eigentliche Trennung stattfindet.

Prinzipiell funktioniert diskontinuierliche Gelelektrophorese wie folgt: Das Proteingemisch wird auf das Sammelgel aufgegeben und eine Spannung wird an das Gel angelegt. Daraufhin wandern die Proteine in das Gel. Die Chloridionen aus dem Sammelgel wandern schneller als die Proteine und bilden somit die Leitonen. Glycin als Folgeion aus dem Laufpuffer bildet eine Grenze hinter der Proteinbande. Zwischen beiden Ionen entsteht ein elektrischer Feldgradient, durch welchen die Proteine zu einer scharfen Bande fokussiert werden. Beim Übergang von dem Sammelgel in das Trenngel ändert sich neben dem Polymerisationsgrad, was durch einen hohen Reibungswiderstand für eine zusätzliche Bandenverschärfung sorgt, auch der pH-Wert. Glycin wird als niedermolekulare Substanz nicht von dem Reibungswiderstand beeinflusst und wandert an den Proteinen vorbei. Durch die zusätzliche pH-Wert Änderung wird das Glycin negativ geladen, sodass die Chloridanionen und die Glycinanionen nun vor den Proteinen wandern. Die Trennung der Proteine erfolgt nun aufgrund der Ladung und der Molekülgröße.^[137,198,199]

Um die Trennung zu verbessern, wurde von U.K. Laemmli^[200] die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entwickelt. Durch Zugabe von SDS zu den Proteinen wird die Ladungsabhängigkeit der Trennung aufgehoben und die Trennung erfolgt ausschließlich über die Molekülgröße. SDS als anionisches Tensid überlagert die Eigenladung

des Proteins, sodass eine konstante negative Ladungsverteilung über das komplette Protein hinweg entsteht. SDS-Moleküle binden mit einer Stöchiometrie von etwa 1:1,5 an die Aminosäuren der Proteine^[137]. Weiterhin wirkt es teilweise denaturierend, sodass die Auftrennung der Proteine in dem Trenngel nicht mehr von übergeordneten Proteinstrukturen abhängig ist^[137]. Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen können nur mit reduzierenden Reagenzien aufgespalten werden^[201] und bleiben demnach bei der Zugabe von SDS erhalten. Die SDS-PAGE wurde mit dem „Mini-PROTEAN-System“ und dem „PowerPac Basic Power Supply“ der Marke Bio-Rad (Bio Rad, Hercules, USA) durchgeführt. Die verwendeten Pufferlösungen sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

Tabelle 5.4: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE.

Puffer	Zusammensetzung
Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
4-fach Probenpuffer	500 mM Tris 10% (w/v) SDS 30% Glycerol 0,04% Bromphenolblau pH 6,8
Trenngelpuffer	500 mM Tris in H ₂ O (MilliQ) pH 6,8
Sammelgelpuffer	1.500 mM Tris in H ₂ O (MilliQ) pH 8,8
Fixierlösung	40% Methanol 10% Essigsäure 50% H ₂ O (MilliQ)
Färbelösung	20 % RotiBlue 20% Methanol 60% H ₂ O (MilliQ)

Als Trenngele wurden ein 10% und ein 12% Gel und als Sammelgel ein 4,5% Gel verwendet. Die jeweilige Zusammensetzung ist in Tabelle 5.5 zusammengestellt.

Proteinquantifizierung

Tabelle 5.5: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele.

	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Sammelgel 4 %
H ₂ O (MilliQ)	4,1 ml	5,10 ml	6,1 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	3,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	2,5 ml
10% SDS-Lösung	0,1 ml	0,15 ml	0,1 ml
Acrylamid	3,3 ml	6 ml	1,3 ml
APS 10%	32 µl	75 µl	32 µl
TEMED	10 µl	30 µl	10 µl

Als Marker für die molekulare Masse der Banden wurde der „Protein Marker III“ der Firma AppliChem verwendet. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten wurde noch ein zweiter Marker, der „Pierce Unstained Protein Molekular Weight Marker“ von Thermo Scientific, verwendet.

Marker	Molekularmasse
Protein Marker III	212; 118; 66; 45; 29; 20; 14; 6,5 kDa
Unstained Protein Molekular Weight Marker	116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4; 14,4 kDa

Die Spannung während der Elektrophorese wurde auf 100-200 V gesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in der Fixierlösung für etwa 1 h und für etwa 20 h in der Färbelösung inkubiert. Nach dem Entfärben des Gelhintergrundes in MilliQ-Wasser wurde die Gele mithilfe des „HP Scanjet G3010“ Scanners und der zugehörigen Software digitalisiert.

5.4. Proteinquantifizierung

Es ist möglich, Proteine aufgrund ihrer Aminosäuresequenz mittels UV/Vis-Spektroskopie zu quantifizieren. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin und die Aminosäure Cystein absorbieren im Bereich von 280 nm^[123,202], wobei Tryptophan durch den größten Extinktionskoeffizienten ϵ bei 280 nm am bedeutsamsten hat.^[123] Jedoch spielen dabei auch die Sekundär- und Tertiärstruktur eine große Rolle, da gegebenenfalls angeregte Zustände stabilisiert oder destabilisiert werden können^[202]. Die Konzentrationsabhängigkeit der Absorption einer Probe wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben, wobei die Schichtdicke der Küvette darstellt:

$$A_{280\text{ nm}} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (5.1)$$

Für ein Protein kann der Extinktionskoeffizient berechnet werden, vorausgesetzt, die Aminosäuresequenz und die chemische Umgebung ist bekannt.^[203–205]

$$\varepsilon_{280\text{ nm}} = 5500 \cdot n_W + 1490 \cdot n_Y + 120 \cdot n_{C-C} \quad (5.2)$$

Die Anzahl der jeweiligen Aminosäure n_i (W – Tryptophan, Y – Tyrosin, C-C – Cystine) wird mit einem Faktor multipliziert und aufsummiert. Es tragen jedoch nur eingebundene Cysteine, z.B. in Form von Disulfidbrückenbindungen, zu der Absorption bei 280 nm bei.^[205] rbHPRG besitzt 3 Tryptophan, 10 Tyrosin und 5 Cystine. Demnach ergibt sich nach Gleichung (5.2) ein Extinktionskoeffizient von $32.000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für rbHPRG.

Eine weitere, häufig in der Biochemie genutzte Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration ist der Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test) von *Smith et al.*^[206] Dieser Test basiert auf der Reduktion von Kupfer(II) zu Kupfer(I) durch die in der Testlösung vorhandenen Proteine im Basischen. Verantwortlich für die Reduktion sind die Peptidbindungen der Proteine und die Aminosäureseitenketten von Cystein bzw. Cystin, Tyrosin und Tryptophan.^[207] Die Kupfer(I)-Ionen werden durch zwei Bicinchoninsäuremoleküle chelatisiert, wie in Abbildung 5.1 gezeigt ist. Der entstehende Komplex absorbiert bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Reaktion von Kupfer(II) zu Kupfer(I) ist abhängig von der Proteinkonzentration und der Art des Proteins, aber auch von Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur.^[208] Die Sensitivität liegt, je nach Durchführung, zwischen 5–250 $\mu\text{g/ml}$ bei einer Inkubation bei 60 °C und 20–2000 $\mu\text{g/ml}$ für Inkubation bei 37 °C.^[202,207] Für diesen Test ist es nötig, eine Kalibrierreihe mit einer Standardsubstanz (hier BSA) anzufertigen. Die Quantifizierung der Probenlösung erfolgt dann anhand dieser Kalibrierreihe. Da die Methode auf einem Standardprotein mit definierter Aminosäuresequenz beruht, ist eine absolute Aussage über die Proteinkonzentration nur bedingt möglich.^[208]

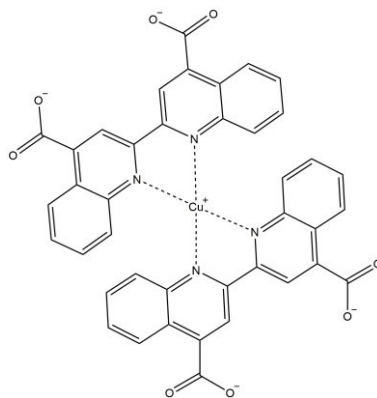


Abbildung 5.1: Darstellung des Bicinchoninsäure-Komplexes.

Proteinquantifizierung

Die Kalibriergerade wurde in Doppelbestimmung mit einem Albuminstandard (Konzentration: 2 mM), welcher dem BCA-Kit von Thermo Scientific mitgeliefert beiliegt, angefertigt. Die Albumin-Stammlösung wurde dazu auf eine Konzentration von 250 μ M (Verdünnungsfaktor 1:8) verdünnt. Im Folgenden wurden die Kalibrierlösungen nach Tabelle 5.6 hergestellt. Als BCA-Reagenz wurden die beiden Reagenzlösungen (A, bestehend aus alkalischer BCA-Lösung und B, bestehend aus Kupfersulfatlösung) im Verhältnis von 50:1, erst kurz vor der Zugabe zu den Lösungen, gemischt. Die Inkubation der Proben erfolgt für exakt 30 min im Eppendorf Thermomixer bei 60 °C. Danach wurden die Proben sofort in ein Eisbad gegeben, um durch Abkühlung die Farbreaktion zu stoppen.

Die Proben wurden in Einmalküvetten „PMMA, 1,5 ml“ der Firma Brand mit einer Schichtdicke von 1 cm gegeben und am UV/Vis-Spektrometer (Modell 8453 der Firma Hewlett-Packard) mit zugehöriger Temperiereinheit 89090A und der zugehörigen Software „UV-Visible ChemStation“ von Agilent Technology bei 562 nm bei 20 °C gemessen.

Tabelle 5.6: Pipettierschema für die Kalibrierreihe des BCA-Tests mit BSA als Standardsubstanz.

Nr.	BSA-Lösung / μ l	Wasser / μ l	BCA-Reagenz / μ l	BSA in Probe / μ g / ml
Blank (0)	0	100	900	0
1	5	95	900	1,25
2	10	90	900	2,5
3	20	80	900	5
4	30	70	900	7,5
5	40	60	900	10
6	50	50	900	12,5
7	60	40	900	15
8	70	30	900	17,5

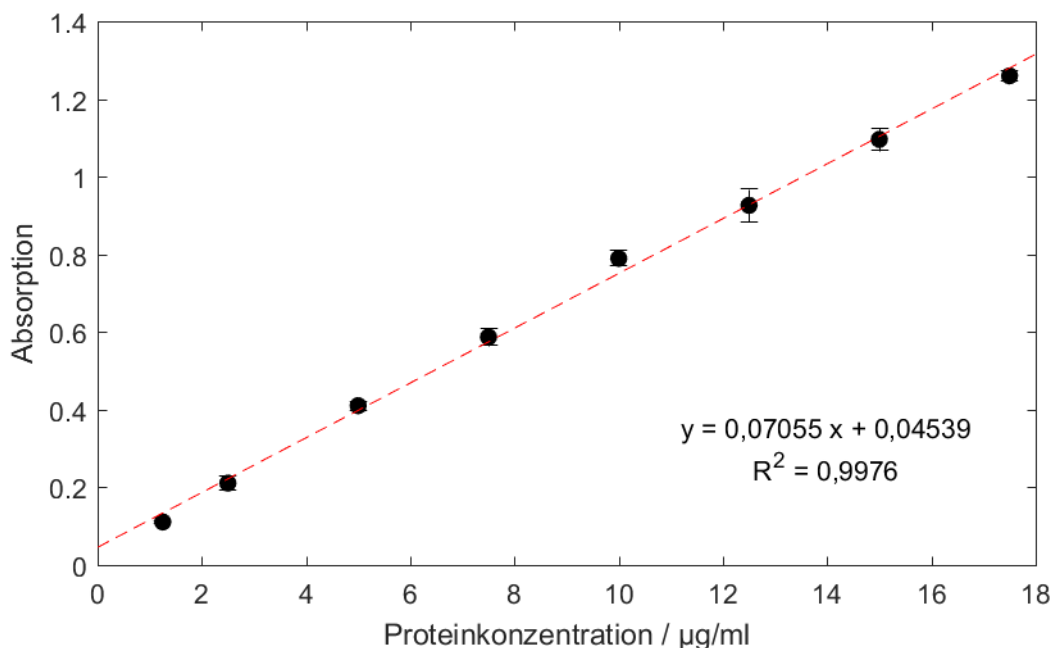


Abbildung 5.2: Kalibriergerade für den BCA-Test.

Für die Probenverdünnungen wurden je nach erwartetem Proteingehalt unterschiedliche Probenverdünnungen verwendet. Da die Verdünnungen die Pipettiergenauigkeit aufgrund sehr kleiner Volumina beeinträchtigen würden, wurden die Proben in Wasser zunächst verdünnt, welche dann weiter für den BCA-Test verwendet wurden.

Tabelle 5.7: Pipettierschema für die Verdünnungen der proteinhaltigen Proben.

Probe	Abk.	Probenlösung / µl	Wasser / µl	Verdünnungs- faktor
Ausgang: Serum	S1	2,5	997,5	400
	S2	5	995	200
Co(II)-Affinitäts- chromatographie	C1	50	950	20
	C2	100	900	10
Kationenaustauscher- chromatographie und Puffertausch	K1	500	500	2
	K2	250	750	4

Proteinquantifizierung

Tabelle 5.8: Pipettierschema für die Proteinproben für den BCA-Test.

Probe	Probenlösung / μl	Wasser / μl	BCA-Reagenz / μl	Verdünnungs- faktor (gesamt)
S1	30	70	900	13.333,33
	50	50	900	8.000,00
S2	20	80	900	10.000,00
	30	70	900	6.666,67
C1	30	70	900	666,67
	60	40	900	333,33
C2	20	80	900	500,00
	40	60	900	250,00
K1	10	90	900	200,00
	20	80	900	100,00
K2	50	50	900	80,00
	60	40	900	66,67

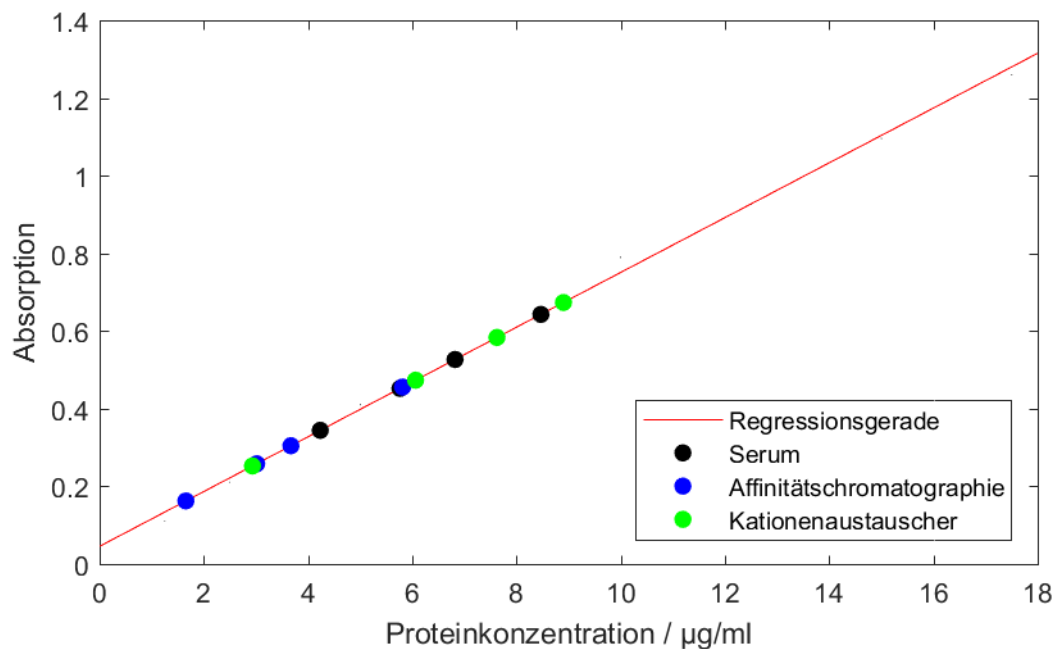


Abbildung 5.3: Darstellung der Absorptionswerte der einzelnen Probenverdünnungen mit den anhand der Regressionsgerade der Abbildung 5.2 ermittelten, zugehörigen Konzentrationen.

5.5. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

5.5.1. CW-X-Band-EPR Spektroskopie

Für die Messung der cw-X-Band Spektren wurde das Benchtop Spektrometer „MiniScope MS5000“ von Freiberg Instruments mit der zugehörigen Temperatureinheit von Freiberg Instruments verwendet. Die Steuerung erfolgte mittels der Software „EPR Studio“ von Freiberg Instruments. Für die Bestrahlung von Proben wurde die Bestrahlungseinheit „Prizmatix“ von Mountain Photonics GmbH verwendet, welche verschiedene Emissionswellenlängen aufweist. Es wurde für die Bestrahlung die Wellenlänge bei 419 nm verwendet. Die Proben wurden in Blaubrand® Mikropipetten mit einem Volumen von 50 µl überführt und mit Citroseal von Leica verschlossen.

Für die Experimente bei 77 K wurde nicht die Temperatureinheit, sondern der Finger Dewar, ebenfalls von Freiberg Instruments, genutzt. Dieser wurde mit flüssigem Stickstoff befüllt und direkt in das Benchtop Spektrometer eingesetzt. Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu denen für die Puls-EPR-Messungen in Kapitel 5.5.2.

Die allgemeinen Messparameter für die EPR-Messungen als Temperaturreihe und für die Messungen bei 77 K sind in Tabelle 5.9 zusammengefasst.

Tabelle 5.9: Allgemeine Messparameter für cw-X-Band EPR-Messungen mit Temperatureinheit und bei 77 K.

Messparameter	als Temperaturreihe	Messung bei 77 K
Magnetfeld	337,5 mT	300 mT
Messbereich	20 mT	160 mT
Messdauer pro Scan	60 s	240 s
Modulationsamplitude	500 mG	3000 mG
Mikrowellenabschwächung	15 dB	15 dB
Scans	5	10
Temperaturschritte	5 K von 0 bis 90 °C (± 0,2 K)	77 K

Für die Experimente bei 77 K wurde nicht die Temperatureinheit, sondern der Finger Dewar, ebenfalls von Freiberg Instruments, genutzt. Dieser wurde mit flüssigem Stickstoff befüllt und direkt in das Benchtop Spektrometer eingesetzt. Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu denen für die Puls-EPR-Messungen in Kapitel 5.5.2.

Zusätzlich zu den EPR-Spektren wurden die Proben mit dem Mangan-Standard von Magnetech gemessen. Der Standard wurde in einem Winkel von 90 ° bezüglich der Proben

gemessen. Die im Zertifikat des Mangan-Standards angegebenen g-Werte sind in Tabelle 5.10 zusammengestellt.

Tabelle 5.10: g-Werte und ihre Abweichungen der einzelnen Manganstandard-Linien

Signallinien	g-Werte
1. Linie	$2,110 \pm 0,001$
2. Linie	$2,068 \pm 0,001$
3. Linie	$2,0267 \pm 0,0002$
4. Linie	$1,9858 \pm 0,0002$
5. Linie	$1,946 \pm 0,001$
6. Linie	$1,907 \pm 0,001$

5.5.2. Puls-X-Band-EPR Spektroskopie

Die Puls-X-Band Messungen wurden mit dem Elexsys E580 Spektrometer von Bruker durchgeführt. Das Spektrometer besteht folgenden Bestandteilen: Magnet (ER073), Stromversorgung (ER081S), Mikrowellenbrücke (ESP 380-1010) und dem Resonator (MS3-ER4118K). Die Mikrowellenpulse wurden mit dem 1 kW TWT Amplifier (Model 117) der Firma Applied Systems Engineering Inc. verstärkt und die Pulse wurden mit Hilfe des Oszilloskopes WaveJet354 von Teledyne LeCroy visualisiert. Die exakten Frequenzen wurden mit dem Frequenzzähler 5350B von Hewlett Packard Inc. aufgenommen.

Die Temperaturregulierung erfolgte in einem geschlossenen Kryostat-Kreislauf, welcher aus einer Pfeiffer-Pumpe (Modell TMU-0710, Pfeiffer Vacuum Technology AG), dem Kompressor (Modell ARS-4HW, Advanced Research Systems Inc.) und der Temperatursteuerung (Modell 331, Lake Shore Cryotrics Inc.) besteht. Das System ist mit Helium (Alphagaz2, 99.9999 Vol.%, Air Liquid) befüllt. Die Pulssequenzen und Spektren wurden mit der Software „XEPR“ von Bruker eingestellt bzw. aufgenommen.

Alle Proben, welche 20 Vol% Glycerol enthielten, wurden zunächst in eine Glaskapillare mit einem Durchmesser von 3 mm mithilfe von 1 ml Braun® Inject Spritzen und Braun® Sterican Kanülen mit einer Länge von 12 cm überführt und in einem glasartigen Zustand eingefroren. Dazu wurde in flüssigen Stickstoff getauchtes 2-Methylbutan verwendet. Die Proben wurden in Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 3 mm mit Hilfe von 1 ml Injekt Spritzen und Sterican Kanülen von Braun® gegeben und 3-fach in die kalte Lösung des 2-Methylbutans getaucht, bevor sie direkt in flüssigen Stickstoff gegeben wurden.

5.5.2.1. ESE-Spektroskopie

Alle ESE-Spektren wurden bei 20 K gemessen. Für die Aufnahme der Spektren wurde die Hahn-Echo-Sequenz mit der Pulsfolge $\pi/2 - \tau - \pi - \tau$ genutzt. Die Zeit τ betrug 176 ns. Die Länge des $\pi/2$ -Pulse betrug 16 ns und die Länge des π -Pulses 32 ns. Das Magnetfeld wurde von 2300 G bis 3700 G variiert und Spektren aus 20 Messdurchläufen akkumuliert. Alle Proben wurden für eine Vergleichbarkeit mit einem konstanten VideoGain von 45 dB gemessen.

5.5.2.2. 3-Puls-ESEEM-Spektroskopie

Die 3-Puls-ESEEM-Spektren wurden ebenfalls bei einer Temperatur von 20 K gemessen. Es wurde die Pulsabfolge $\pi/2 - \tau - \pi/2 - t - \pi/2 - \tau$ genutzt. Dabei betrug τ 176 ns und t wurde von 300 ns um 16 ns variiert. Die Länge des $\pi/2$ -Pulse betrug, wie bereits bei den ESE-Messungen, 16 ns. Das Echo wurde in Abhängigkeit von T gemessen und das Magnetfeld wurde dabei konstant gehalten. Um eine Orientierungsselektivität zu erhalten, wurde an 2 verschiedenen Magnetfeldern ESEEM-Spektren aufgenommen – am Maximum des ESE-detektierten Spektrum, im Bereich von $g_{x/y}$ und etwa 30 mT links des Maximums im Bereich von g_z . Die Spektren stellen eine Akkumulation von 20 Messdurchläufen dar.

5.5.3. Simulation der Nitroxid-EPR-Spektren

Die Simulation der cw-X-Band-Spektren erfolgt durch spektrale Simulation mit Hilfe von EasySpin^[209], einem Programmpaket in Matlab R2017. Die Anpassung der Simulation an die EPR-Spektren erfolgt mit der implementierten Funktion „chilli“ für eine langsam-taumelnde Rotationsdynamik der Sonde unter Verwendung des Schneider-Freed-Modells zur Lösung der Schrödinger-Gleichung.^[210,211] Für alle Simulationen wurde zunächst ein axiales Verhalten der Sonde angenommen und ausgehend von diesem Anfangswertproblem wurden die Werte der Parameter angepasst, sodass die Simulation den Spektren angeglichen werden konnte.

Aus den Tensoren der Simulationsparameter konnten die isotropen Hyperfeinwechselwirkungskonstante a_{iso} und der isotrope g-Wert g_{iso} nach Gleichung (2.16) und (2.9) ermittelt werden. Ebenfalls war es möglich, aus dem Diffusionstensor die Rotationskorrelationszeit τ der Sonde nach Gleichung (2.25) zu bestimmen.

Die ermittelten Simulationsparameter der Proben weisen dabei folgende Ungenauigkeiten auf: Für den prozentualen Anteil wurde ein Fehler von 5 % angenommen. Für den g-Wert wird der Fehler des Manganstandards angenommen, welcher in dem g-Wert Bereich der Nitroxide

0,0002 beträgt. Für die einzelnen Hyperfeinaufspaltungswerte wurden die Simulationen solange variiert, sodass eine signifikante Abweichung zwischen Simulation und gemessenen Spektrum ermittelt werden konnte. Der Fehler lag dabei bei etwa 0,25 MHz für alle Simulationen. Für die Rotationskorrelationszeit wurden die einzelnen Werte für die Rotationsdiffusionsrate variiert. Dabei ergab sich, dass die Abweichung in der ersten Kommastelle der einzelnen Werte der Rotationsdiffusionsrate liegt. Der Fehler für die Rotationskorrelationszeit wurde dann nach Gleichung (2.25) und (2.26) berechnet. Für die Ermittlung des Fehlers der Anisotropie wurden ebenfalls die Fehler der Rotationsdiffusionsraten verwendet und entsprechend nach Gleichung (2.27) berechnet. Für den Fehler der Austauschfrequenz für die eine Spezies des gelabelten HPRGs ergab sich ein Wert von 1 MHz.

Tabelle 5.11: Übersicht über die Simulationenwerte und deren Abweichungen.

Probe	τ_c / ps	T_A
5-DSA	$176,64 \pm 24,56$	$0,41 \pm 0,09$
5-DSA + PRR1	$248,97 \pm 44,46$	$0,57 \pm 0,07$
5-DSA + PRR2	$257,87 \pm 44,21$	$0,75 \pm 0,03$
5-DSA + HRR	$231,12 \pm 36,94$	$0,64 \pm 0,05$
5-DSA + HPRG	$42,24 \pm 9,65$	$0,38 \pm 0,02$
16-DSA	$111,28 \pm 8,10$	$0,70 \pm 0,02$
16-DSA + PRR1	$113,70 \pm 8,66$	$0,64 \pm 0,03$
16-DSA + PRR2	$117,14 \pm 9,00$	$0,72 \pm 0,02$
16-DSA + HRR	$122,48 \pm 9,78$	$0,78 \pm 0,01$
16-DSA + HPRG	$111,28 \pm 8,10$ $6359,52 \pm 1961,66$	$0,70 \pm 0,02$ $0,63 \pm 0,005$
TOAC	$60,41 \pm 16,96$	$0,45 \pm 0,03$
TOAC + PRR1	$61,14 \pm 16,05$	$0,63 \pm 0,006$
TOAC + PRR2	$63,60 \pm 19,62$	$0,63 \pm 0,006$
TOAC + HRR	$63,60 \pm 19,61$	$0,63 \pm 0,006$
TOAC + HPRG	$63,60 \pm 19,61$	$0,63 \pm 0,006$
CAT-1	$60,41 \pm 14,11$	$0,50 \pm 0,02$
CAT-1 + PRR1	$60,41 \pm 14,11$	$0,50 \pm 0,02$

Material und Methoden

Probe	τ_c / ps	T_A
CAT-1 + PRR2	$60,41 \pm 14,11$	$0,50 \pm 0,02$
	$226,20 \pm 37,00$	$0,78 \pm 0,02$
CAT-1 + HRR	$60,41 \pm 14,11$	$0,50 \pm 0,02$
CAT-1 + HPRG	$60,41 \pm 14,11$	$0,50 \pm 0,02$
Fremys Salz (FS)	$20,47 \pm 2,91$	$0,86 \pm 0,005$
FS + PRR1	-	-
FS + PRR2	$19,44 \pm 2,68$	$0,88 \pm 0,003$
FS + HRR	$20,47 \pm 2,91$	$0,86 \pm 0,005$
FS + HPRG	$20,47 \pm 2,91$	$0,86 \pm 0,005$
	$140,20 \pm 40,63$	$0,66 \pm 0,12$
MTSSL	$40,06 \pm 5,93$	$0,40 \pm 0,03$
HPRG-MTSSL	$614,00 \pm 318,89$	$0,86 \pm 0,02$
	$614,00 \pm 318,89$	$0,86 \pm$

5.6. Probenpräparation für EPR-Spektroskopie

5.6.1. Antioxidatives Verhalten

Die Messung der Proben von HPRG und TEMPO bei verschiedenen Bedingungen erfolgt am cw-X-Band-Spektrometer mit den in Tabelle 5.9 aufgeführten Parametern. Hier wurden jedoch alle Proben bei einer konstanten Temperatur von 37 °C (physiologische Bedingungen) gemessen. Um kinetische Effekt zu minimieren, wurden alle Proben nach 2 min nach Probenpräparation und nach 24 h erneut gemessen. Keine der Proben zeigte ein verändertes Spektrum. Jedoch wurden in dieser Arbeit die Spektren nach 24 h dargestellt.

Tabelle 5.12: Pipettierschema für die Probenpräparation des antioxidativen Verhaltens von HPRG bei verschiedenen Bedingungen.

Nr.	HPRG	Asc.	CuCl ₂	FeCl ₂	FeCl ₃	H ₂ O ₂	Puffer
Stamm	1,029 mM	5,00 mM	13,37 mM	5,00 mM	24,91 mM	97,9 mM	
c _{Soll}	250 µM	0,75 mM	2 mM	2 mM	2 mM	5 mM	-
1	6,07 µl	-	-	-	-	-	18,93 µl
2	6,07 µl	3,75 µl	-	-	-	-	15,18 µl
3	6,07 µl	-	3,74 µl	-	-	-	15,19 µl
4	6,07 µl	-	-	10 µl	-	-	8,93 µl
5	6,07 µl	-	-	-	2,01 µl	-	16,92 µl
6	6,07 µl	-	-	-	-	1,27 µl	17,66 µl
7	6,07 µl	-	3,74 µl	-	-	1,27 µl	13,92 µl
8	6,07 µl	-	-	10 µl	-	1,27 µl	7,66 µl
9	6,07 µl	-	-	-	2,01 µl	1,27 µl	15,65 µ
Ansatz: 0,5 mM HPRG + 1,5 mM Asc.: 43,7 µl HPRG + 27 µl Asc. + 19,28 µl Puffer							
10	12,5 µl		3,74 µl	-	-	-	8,76 µl
11	12,5 µl		-	10 µl	-	-	2,50 µl
12	12,5 µl		-	-	2,01 µl	-	10,49 µl
13	12,5 µl		-	-	-	1,27 µl	11,23 µl
14	12,5 µl		3,74 µl	-	-	1,27 µl	7,49 µl
15	12,5 µl		-	10 µl	-	1,27 µl	1,23 µl
16	12,5 µl		-	-	2,01 µl	1,27 µl	9,22 µl

Material und Methoden

Tabelle 5.13: Pipettierschema für die Probenpräparation des antioxidativen Verhaltens von TEMPO bei verschiedenen Bedingungen.

	TEMPO	Asc.	CuCl ₂	FeCl ₂	FeCl ₃	H ₂ O ₂	Puffer
Stamm	2,5 mM	5,0 mM	13,4 mM	5,0 mM	24,9 mM	97,9 mM	-
C _{soll}	500 µM	1,5 mM	2 mM	2 mM	2 mM	5 mM	-
1	5 µl	-	-	-	-	-	20,00 µl
2	5 µl	7,5 µl	-	-	-	-	12,50 µl
3	5 µl	-	3,74 µl	-	-	-	16,26 µl
4	5 µl	-	-	10 µl	-	-	10,00 µl
5	5 µl	-	-	-	2,01 µl	-	17,99 µl
6	5 µl	-	-	-	-	1,27 µl	18,73 µl
7	5 µl	-	3,74 µl	-	-	1,27 µl	14,99 µl
8	5 µl	-	-	10 µl	-	1,27 µl	8,73 µl
9	5 µl	-	-	-	2,01 µl	1,27 µl	16,72 µl
Ansatz: 1 mM TEMPO + 3 mM Asc.: 40 µl TEMPO + 60 µl Ascorbinsäure							
10	12,5 µl	-	3,74 µl	-	-	-	8,76 µl
11	12,5 µl	-	-	10 µl	-	-	2,50 µl
12	12,5 µl	-	-	-	2,01 µl	-	10,49 µl
13	12,5 µl	-	-	-	-	1,27 µl	11,23 µl
14	12,5 µl	-	3,74 µl	-	-	1,27 µl	7,49 µl
15	12,5 µl	-	-	10 µl	-	1,27 µl	1,23 µl
16	12,5 µl	-	-	-	2,01 µl	1,27 µl	9,22 µl

Probenpräparation für EPR-Spektroskopie

Tabelle 5.14: Pipettierschema für die Probenpräparation der Referenzen für die Betrachtung des antioxidativen Verhaltens von HPRG und TEMPO.

Nr.	Asc.	CuCl ₂	FeCl ₂	FeCl ₃	H ₂ O ₂	Puffer
Stamm	5,0 mM	13,4 mM	5,0 mM	24,9 mM	97,9 mM	-
C _{soll}	1,5 mM	2 mM	2 mM	2 mM	5 mM	-
1	7,5 µl	-	-	-	-	17,50 µl
2	-	3,74 µl	-	-	-	21,26 µl
3	-	-	10 µl	-	-	15,00 µl
4	-	-	-	2,01 µl	-	22,99 µl
5	-	-	-	-	1,27 µl	23,73 µl
6	-	3,74 µl	-	-	1,27 µl	19,99 µl
7	-	-	10 µl	-	1,27 µl	13,73 µl
8	-	-	-	2,01 µl	1,27 µl	21,72 µl
9	7,5 µl	3,74 µl	-	-	-	13,76 µl
10	7,5 µl	-	10 µl	-	-	7,50 µl
11	7,5 µl	-	-	2,01 µl	-	15,49 µl
12	7,5 µl	-	-	-	1,27 µl	16,23 µl
13	7,5 µl	3,74 µl	-	-	1,27 µl	12,49 µl
14	7,5 µl	-	10 µl	-	1,27 µl	6,23 µl
15	7,5 µl	-	-	2,01 µl	1,27 µl	14,22 µl

5.6.2. HPRG-Liganden-Proben

Die Messung der Proben von HPRG mit verschiedenen Sonden als Liganden erfolgt am cw-X-Band-Spektrometer mit den in Tabelle 5.9 aufgeführten Parametern. Dazu wurde zunächst eine Messung aus 5 akkumulierten Scans bei 20 °C durchgeführt, bevor die Temperaturreihe gestartet wurde.

Tabelle 5.15: Pipettierschema für die Präparation von 500 µl einer 500 µM Sondenlösung in PBS pH 7,4 aus der entsprechenden Ligandenstammlösung.

	16-DSA	5-DSA	TOAC	CAT-1	Fremys Salz ^b
Stamm	1,989 mM	3,112 mM	2,508 mM	2,078 mM	-
Sonde	125,67 µl	80,33 µl	99,68 µl	120,31 µl	-
Puffer	374,33 µl	419,67 µl	400,32 µl	379,69 µl	-

^b Da Fremys Salz sehr schnell, sowohl gekühlt als Feststoff als auch in Lösung, abbaut, wurde für jede Probe eine neue Stammlösung angesetzt. Die Konzentration wurde über eine Kalibrierung des Doppelintegrals gegen die Konzentration ermittelt, welche mit einer neuen Fremys Salz-Lösung, direkt nach Öffnen des Vorratsgefäßes, erstellt wurde. Die Stammlösung wurde dann auf 500 µM, analog zu den anderen Sondenlösungen, verdünnt. Die Probe für die Temperaturreihe aus Sonde und Protein bzw. Peptid wurde dann nach Tabelle 5.16 hergestellt.

Tabelle 5.16: Pipettierschema für die Präparation von 30 µl Probenlösung mit 50 µM Sonde und 500 µM Protein bzw. Peptid in PBS pH 7,4 aus der entsprechenden der Protein-/Peptidstammlösung und der 500 µM Sondenlösung.

	Referenz	PRR1	PRR2	HRR	HPRG
Stamm	-	769,98 µM	772,79 µM	738,47 µM	755,21 µM
Protein	-	19,48 µl	19,41 µl	20,31 µl	19,86 µl
Puffer	27 µl	7,52 µl	7,59 µl	6,69 µl	7,14 µl
Sonde	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl

5.6.3. Labeling des HPRGs mit MTSSL

Für das Labeling des HPRGs mit MTSSL wurde eine Stammlösung von MTSSL in 20 % Ethanol mit einer Konzentration von 10 mM hergestellt. HPRG wurde in einer Konzentration von 50 µM in 520 µl PBS-Puffer pH 7,4 gelöst und mit einem 10-fachen Überschuss an MTSSL versetzt.

Der Labeling-Ansatz wurde für 24 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Abtrennung des freien Labels erfolgte an der HPLC. Als Säule wurde eine „HiTrap Desalting“ von Cytiva mit einem Säulevolumen von etwa 5 ml verwendet. Als Probenmenge wurden 500 µl des Labeling-

Probenpräparation für EPR-Spektroskopie

Ansatzes mit einer Flussrate von 3 ml/min über eine 500 µl Probenschleife von Cytiva aufgegeben. Als Lösungsmittel wurde PBS-Puffer pH 7,4 verwendet. Der Elutionsverlauf wurde über das Absorptionssignal bei 280 nm und 216 nm und über die Messung der Leitfähigkeit verfolgt.

Säule	Cytiva HiTrap Desalting, 5 ml
Probenaufgabe	500 µl Labeling-Ansatz
Detektion	280 nm, 216 nm und Leitfähigkeit
Flussrate	Probenaufgabe: 3 ml/min Elution: 3 ml/min
Fraktionsvolumen	0,5 ml
Ablauf	1 CV - Equilibrieren mit PBS-Puffer pH 7,4 Probenaufgabe 1 CV Elution mit PBS-Puffer pH 7,4

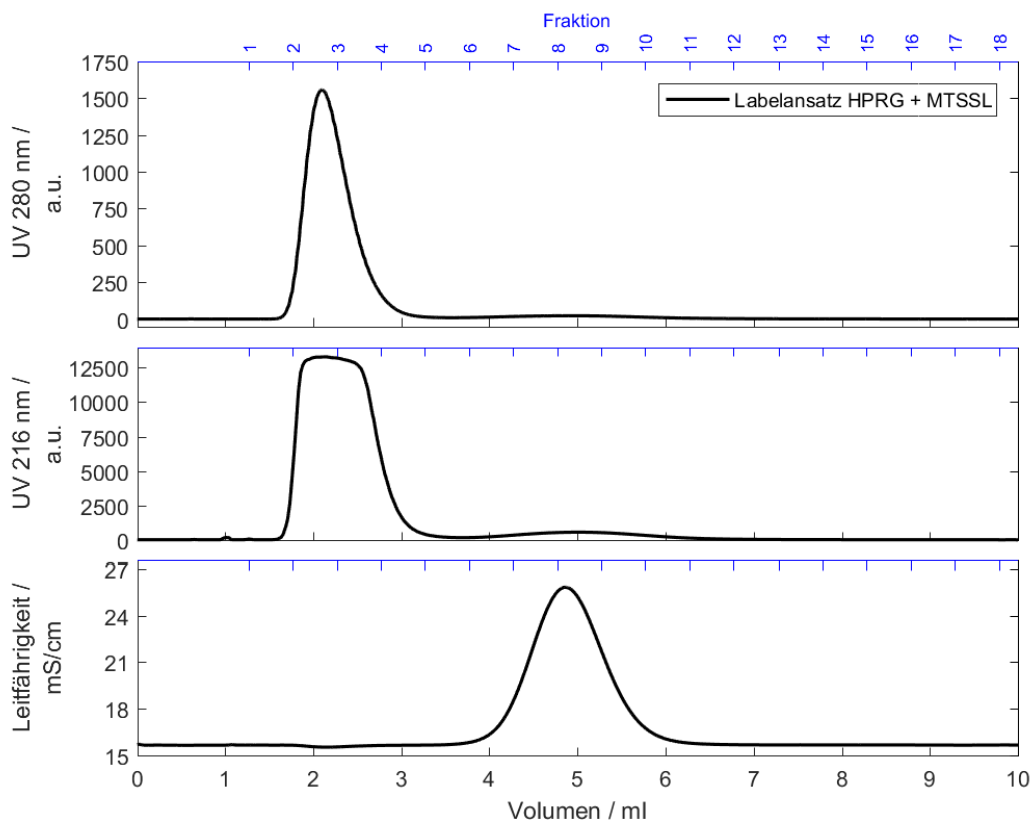


Abbildung 5.4: Elutionsprofil der Abtrennung von gelabeltem Protein von freiem Label über eine Größenausschlusschromatographie.

Anhand des Absorptionssignals zeigt sich, dass das Protein in den Fraktionen 2 und 3 eluiert. Die Kontrolle auf EPR-Aktivität erfolgte am Miniscope MS5000 von Freiberg Instruments. Die Spektren sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass in diesen beiden Fraktionen ebenfalls eine EPR-Aktivität zu finden war. Die Spektren unterscheiden sich jedoch deutlich von denen von freiem MTSSL, weshalb von einem erfolgreichen Labeling-Prozess ausgegangen werden konnte.

Die Fraktionen 2 und 3 wurden vereinigt und in Amicon Ultra Ultracel Zentrifugenfiltern mit einem Volumen von 0,5 ml und einer Molekülausschlussgröße von 30 kDa mit 10 x g an einer Minispin Zentrifuge von Eppendorf aufkonzentriert.

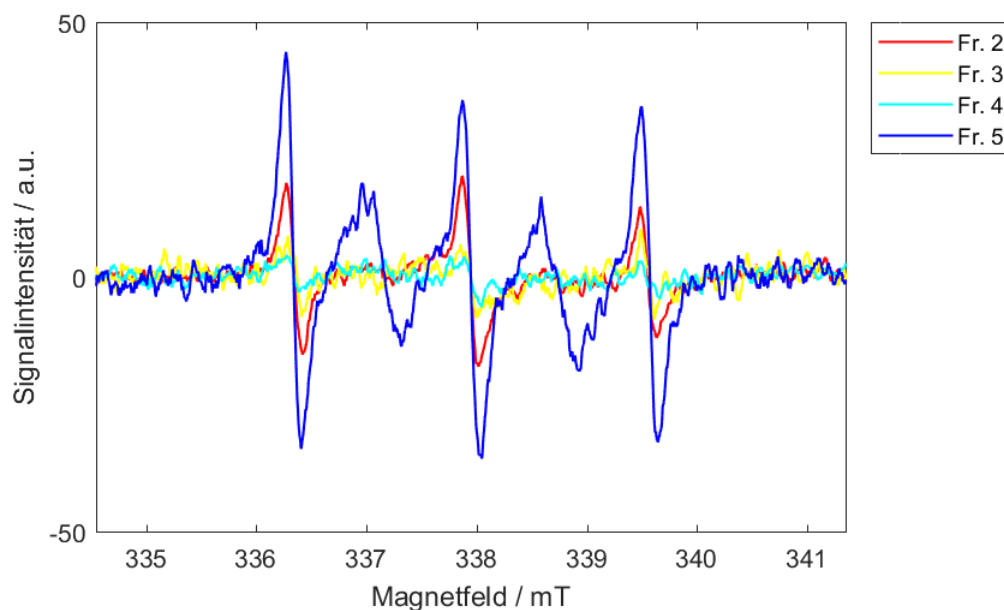


Abbildung 5.5: EPR-Spektren der Fraktionen 2 bis 5 von der Größenausschlusschromatographie.

5.6.4. HPRG-Kupfer-Proben für Tieftemperaturmessungen

Die Messung der Kupferhaltigen Proben erfolgt am cw-X-Band-Spektrometer mit den in Tabelle 5.9 aufgeführten Parametern für 77 K.

Tabelle 5.17: Pipettierschema für die Probenpräparation der HPRG:Cu(II)-Proben mit 17,5 % Glycerol bei pH 7,4. Die Cu(II)-Konzentration beträgt 2 mM, die Proteinkonzentration ist entsprechend an die Verhältnisse angepasst.

HPRG:Cu(II)	pH-Wert	HPRG	Cu(II)	Glycerol	Puffer
Stamm		3,855 mM	60,017 mM		
1:1	7,49	38,91 µl	2,50 µl	15 µl	18,59 µl
Stamm		1,731 mM	60,017 mM		
1:0	7,50	21,66 µl	-	15 µl	38,34 µl
1:2	7,50	43,33 µl	2,50 µl	15 µl	14,17 µl
1:4	7,45	21,66 µl	2,50 µl	15 µl	35,84 µl
1:5	7,47	17,32 µl	2,50 µl	15 µl	40,18 µl
1:7	7,39	12,34 µl	2,50 µl	15 µl	45,16 µl
1:8	7,46	10,82 µl	2,50 µl	15 µl	46,68 µl
1:10	7,50	8,66 µl	2,50 µl	15 µl	48,84 µl
1:20	7,44	4,33 µl	2,50 µl	15 µl	53,17 µl
Referenz	7,38	-	2,50 µl	15 µl	57,5 µl

Tabelle 5.18: Pipettierschema für die Probenpräparation der HPRG:Cu(II)-Proben mit 17,5 % Glycerol für die verschiedenen Verhältnisse für die Messung der pH-abhängigen Kupferbindung.

HPRG:Cu(II)	HPRG	Cu(II)	Glycerol	Puffer
Stamm	3,010 mM	60,017 mM		
1:2	24,91 µl	2,50 µl	15 µl	32,59 µl
1:20	2,49 µl	2,50 µl	15 µl	55,01 µl
	1,063 mM			
1:4	35,28 µl	2,50 µl	15 µl	22,22 µl
1:7	20,11 µl	2,50 µl	15 µl	37,39 µl
1:10	14,11 µl	2,50 µl	15 µl	43,39 µl
Referenz	-	2,50 µl	15 µl	57,5 µl

Material und Methoden

Tabelle 5.19: Übersicht über die pH-Werte der einzelnen HPRG:Cu(II)-Proben mit 17,5 % Glycerol.

HPRG:Cu(II)	pH 3	pH 4,8	pH 5,5	pH 6,5	pH 8,3	pH 10	pH 11,5
1:2	3,09	4,83	5,41	6,45	8,26	10,11	11,55
1:4	3,06	4,86	5,45	6,47	8,23	10,09	11,52
1:7	3,02	4,86	5,41	6,43	8,26	10,12	11,49
1:10	3,05	4,89	5,45	6,44	8,26	10,13	11,52
1:20	3,06	4,80	5,41	6,44	8,26	10,11	11,52
Referenz	3,08	4,79	5,53	6,41	8,17	10,12	11,50

Tabelle 5.20: Pipettierschema für die Probenpräparation der Peptid:Cu(II)-Proben mit 17,5 % Glycerol für verschiedene Peptid:Cu(II)-Verhältnisse. Die Cu(II)-Konzentration beträgt 2 mM, die Peptidkonzentration ist entsprechend an die Verhältnisse angepasst.

Peptid:Cu(II)	HPRG	Cu(II)	Glycerol	Puffer
Stamm PRR1	5,180 mM	59,761 mM		
1:1	28,96 µl	2,51 µl	15 µl	28,53 µl
1:2	14,48 µl	2,51 µl	15 µl	43,01 µl
1:5	5,79 µl	2,51 µl	15 µl	51,70 µl
Stamm PRR2	5,167 mM	59,761 mM		
1:1	29,03 µl	2,51 µl	15 µl	28,46 µl
1:2	14,52 µl	2,51 µl	15 µl	42,97 µl
1:5	5,81 µl	2,51 µl	15 µl	51,98 µl
Stamm HRR	5,159 mM	59,761 mM		
1:1	29,14 µl	2,51 µl	15 µl	28,47 µl
1:2	14,51 µl	2,51 µl	15 µl	42,98 µl
1:5	5,80 µl	2,51 µl	15 µl	51,69 µl

5.7. Dynamische Lichtstreuung und Fluoreszenzmessungen

Die Messung der Partikelgröße über Dynamische Lichtstreuung erfolgt mittels dem „Litesizer 500“ von Anton Paar mit einer Laserdiodenwellenlänge von 658 nm und einer Leistung von 40 mW. Die Probe wurde dazu in eine Ultra-Mikro-Küvette von Hellma mit einem Volumen von 45 µl und einer Schichtdicke von 3 x 3 mm überführt. Alle Puffer wurden vor der Probenpräparation durch Spritzenfilter aus Nylon, 0,45 µm von Rotilabo filtriert und auf Partikel hin untersucht.

Die Messung der Proben erfolgte in der zugehörigen Software „Kalliope“, ebenfalls von Anton Paar. Alle Proben wurden in 2 Messwinkeln, in Rückwärtsstreuung bei 175 ° und in Seitwärtsstreuung bei 90 ° bei 20 °C gemessen. Da die genaue Berechnung der Partikelgröße und die Lösung des Anfangswertproblems für die gerätespezifische Software unbekannt sind, wurde auf die „ALV Correlator Software Vers. 3.0“ von dem Gerät ALV-5000/E zurückgegriffen. Die bestimmten Autokorrelationen wurden dazu in die andere Software eingeladen und die Partikelgrößenverteilung nach der Regularisierung nach CONTIN-Analyse nach Provencher^[121,212] durchgeführt.

Für die Fluoreszenzmessungen wurde das Fluoreszenzspektrometer „FluoroMax2“ von Horiba/Jobin Yvon mit einem Julabo Temperatur-Controller und der Software Datamax von Galactic Industries verwendet. Die Proben wurden dafür in eine Ultra-Mikro-Küvette von Hellma mit einem Volumen von 100 µl und einer Schichtdicke von 10 x 2 mm gegeben.

Die Messung der Emissionsspektren der Proben erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm mit einer Inkrementierung von 0,5 nm und einer Geschwindigkeit von 0,5 s/nm. Die Spaltbreiten des Anregungs-, und Emissionsmonochromators wurden auf 2 nm festgelegt. Das Spektrum wurde von 280 bis 550 nm detektiert.

Material und Methoden

Tabelle 5.21: Pipettierschema für die Probenpräparation der pH-Abhängigkeit von HPRG für die DLS und Fluoreszenzmessungen. Die Proteinkonzentration beträgt 12,5 μM in einem Gesamtvolumen von 200 μl .

	HPRG	Puffer
Stamm	277,58 μM	
pH 3	9,01 μM	190,99 μl
pH 4,4	9,01 μM	190,99 μl
pH 5,4	9,01 μM	190,99 μl
pH 6,4	9,01 μM	190,99 μl
pH 7,4	9,01 μM	190,99 μl
pH 8,4	9,01 μM	190,99 μl
pH 10,0	9,01 μM	190,99 μl
pH 11,9	9,01 μM	190,99 μl

Für die Messung der Transmission bei den Peptid:Kupfer-Proben wurde ebenfalls das DLS-Gerät „Litesizer 500“ der Firma Anton Paar mit der gleichen Küvette wie oben verwendet. Der Puffer wurde vor der Verwendung ebenfalls filtriert. Die Probenlösungen setzten sich nach Tabelle 5.23ff. zusammen. Die Kupferstammlösung wurde in kurz vor der Zugabe zu der Peptidlösung in PBS hergestellt und auf pH 7,4 eingestellt.

Tabelle 5.22: Pipettierschema für die Probenpräparation der kupferabhängigen Transmissionsmessungen von PBS bei pH 7,4.

Verhältnis	Kupfer	Puffer
Cu(II):Peptid	1,25 mM	
0	0 μl	50 μl
0,5	3 μl	47 μl
1	6 μl	44 μl
1,5	12 μl	38 μl
2	18 μl	32 μl
	59,76 mM	
5	0,628 μl	49,37 μl
10	1,255 μl	48,75 μl

Dynamische Lichtstreuung und Fluoreszenzmessungen

Tabelle 5.23: Pipettierschema für die Probenpräparation der kupferabhängigen Transmissionsmessungen des Peptides PRR1 in PBS pH 7,4.

Verhältnis	Kupfer	PRR1	Puffer
Cu(II):Peptid	1,25 mM	2,333 mM	
0	0 µl	3,21 µl	46,79 µl
0,5	3 µl	3,21 µl	43,79 µl
1	6 µl	3,21 µl	40,79 µl
1,5	12 µl	3,21 µl	34,79 µl
2	18 µl	3,21 µl	28,79 µl
	59,76 mM		
5	0,628 µl	3,21 µl	46,162 µl
10	1,255 µl	3,21 µl	45,534 µl

Tabelle 5.24: Pipettierschema für die Probenpräparation der kupferabhängigen Transmissionsmessungen des Peptides PRR2 in PBS pH 7,4.

Verhältnis	Kupfer	PRR2	Puffer
Cu(II):Peptid	1,25 mM	3,002 mM	
0	0 µl	2,5 µl	47,5 µl
0,25	1,5 µl	2,5 µl	46 µl
0,5	3 µl	2,5 µl	44,5 µl
0,75	4,5 µl	2,5 µl	43 µl
1	6 µl	2,5 µl	41,5 µl
1,5	9 µl	2,5 µl	38,5 µl
2	12 µl	2,5 µl	35,5 µl
2,5	15 µl	2,5 µl	32,5 µl
3	18 µl	2,5 µl	29,5 µl
	59,76 mM		
5	0,628 µl	2,5 µl	46,872 µl
10	1,255 µl	2,5 µl	46,245 µl

Material und Methoden

Tabelle 5.25: Pipettierschema für die Probenpräparation der kupferabhängigen Transmissionsmessungen des Peptides HRR in PBS pH 7,4.

Verhältnis	Kupfer	HRR	Puffer
Cu(II):Peptid	1,25 mM	3,003 mM	
0	0 µl	2,5 µl	47,5 µl
0,5	3 µl	2,5 µl	44,5 µl
1	6 µl	2,5 µl	41,5 µl
1,5	9 µl	2,5 µl	38,5 µl
2	12 µl	2,5 µl	35,5 µl
3	18 µl	2,5 µl	29,5 µl
	59,76 mM		
5	0,628 µl	2,5 µl	46,87 µl
10	1,255 µl	2,5 µl	46,25 µl

Literaturverzeichnis

- [1] A. L. Jones, M. D. Hulett, C. R. Parish, *Immunology and cell biology* **2005**, 83, 106.
- [2] S. Wakabayashi, *International review of cell and molecular biology* **2013**, 304, 467.
- [3] P. S. Nair, W. E. Robinson, *Archives of biochemistry and biophysics* **1999**, 366, 8.
- [4] A. T. Abebe, S. J. Devoid, M. Sugumaran, R. Etter, W. E. Robinson, *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **2007**, 147, 74.
- [5] N. Heimburger, H. Haupt, T. Kranz, S. Baudner, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1972**, 353, 1133.
- [6] D.-B. Borza, F. M. Tatum, W. T. Morgan, *Biochemistry* **1996**, 35, 1925.
- [7] T. Koide, S. Odani, *FEBS Letters* **1987**, 216, 17.
- [8] C. Lee, E. Bongcam-Rudloff, C. Sollner, W. Jahnen-Dechent, L. Claesson-Welsh, *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **2009**, 14, 2911.
- [9] J. Ochieng, G. Chaudhuri, *Journal of health care for the poor and underserved* **2010**, 21, 51.
- [10] W. M. Brown, K. M. Dziegielewska, *Protein science : a publication of the Protein Society* **1997**, 6, 5.
- [11] T. Koide, D. Foster, S. Yoshitake, E. W. Davie, *Biochemistry* **1986**, 25, 2220.
- [12] Y. Pan, L. Deng, H. Wang, K. He, Q. Xia, *Genes & Diseases* **2020**, 353, 1125.
- [13] L. L.K. Leung, P. C. Harpel, R. L. Nachman, Rabellino Enrique M., *Blood* **1983**, 62, 1016.
- [14] F. Ronca, A. Raggi, *Biochimie* **2015**, 118, 207.
- [15] M. Ranieri-Raggi, A. J. G. Moir, A. Raggi, *Biomolecules* **2014**, 4, 474.
- [16] O. Kassar, S. A. McMahon, R. Thompson, C. H. Botting, J. H. Naismith, A. J. Stewart, *Blood* **2014**, 123, 1948.
- [17] S. Mangani, W. Meyer-Klaucke, A. J. G. Moir, M. Ranieri-Raggi, D. Martini, A. Raggi, *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278, 3176.
- [18] C. B. Sorensen, H. Krogh-Pedersen, T. E. Petersen, *FEBS* **1993**, 328, 285.
- [19] A. Smith, I. Nuiry, W. T. Morgan, *Thrombosis Research* **1985**, 40, 653.
- [20] M. Levitt.
- [21] K. Imai, S. Mitaku, *Biophysics (Nagoya-shi, Japan)* **2005**, 1, 55.
- [22] M. P. Williamson, *The Biochemical journal* **1994**, 297 (Pt 2), 249.
- [23] A. A. Adzhubei, M. J. E. Sternberg, A. A. Makarov, *Journal of molecular biology* **2013**, 425, 2100.

- [24] A. Jancsó, A. Kolozsi, B. Gyurcsik, N. V. Nagy, T. Gajda, *Journal of inorganic biochemistry* **2009**, *103*, 1634.
- [25] A. K. Weyrauch, M. Jakob, A. Schierhorn, R. B. Klösger, D. Hinderberger, *PLOS one*; **2017**, *12*, 1.
- [26] I. K. H. Poon, K. K. Patel, D. S. Davis, C. R. Parish, M. D. Hulett, *Blood* **2011**, *117*, 2093.
- [27] F. Clerc, K. R. Reiding, B. C. Jansen, G. S. M. Kammeijer, A. Bondt, M. Wuhler, *Glycoconjugate journal* **2016**, *33*, 309.
- [28] C. B. Peterson, W. T. Morgan, M. N. Blackburn, *Journal of biological chemistry* **1987**, *262*, 7567.
- [29] H. R. Lijnen, M. Hoylaerts, D. Collen, *The Journal of biological chemistry* **1983**, *258*, 3803.
- [30] H. R. Lijnen, M. Hoylaerts, D. Collen, *Thrombosis Research* **1983**, *29*, 443.
- [31] C.-L. Fu, M. K. Horn, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **2002**, *139*, 211.
- [32] A. L. Jones, M. D. Hulett, C. R. Parish, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 30114.
- [33] B. A. Kluszynski, C. Kim, W. P. Faulk, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 13541.
- [34] I. Capila, R. J. Linhardt, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 426.
- [35] C. Freeman, C. R. Parish, *The Biochemical journal* **1997**, *325 (Pt 1)*, 229.
- [36] I. K. H. Poon, D. Y. Yee, A. L. Jones, R. J. Wood, D. S. Davis, C. Freeman, C. R. Parish, M. D. Hulett, *The international journal of biochemistry & cell biology* **2010**, *42*, 1507.
- [37] C. T. Saez, G. J. Jansen, A. Smith, W. T. Morgan, *Biochemistry* **1995**, 2496.
- [38] H. R. Lijnen, M. Hoylaerts, D. Collen, *Journal of biological chemistry* **1980**, *255*, 10214.
- [39] A. L. Jones, M. D. Hulett, J. G. Altin, P. Hogg, C. R. Parish, *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279*, 38267.
- [40] D.-B. Borza, N. V. Shipulina, W. T. Morgan, *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **2004**, *15*, 663.
- [41] L. L. Leung, *The Journal of clinical investigation* **1986**, *77*, 1305.
- [42] X. Guan, J. C. Juarez, X. Qi, N. V. Shipulina, D. E. Shaw, W. T. Morgan, K. R. McCrae, A. P. Mazar, F. Doñate, *Thrombosis and haemostasis* **2004**, *92*, 403.
- [43] I. K. H. Poon, M. D. Hulett, C. R. Parish, *Blood* **2010**, *115*, 2473.
- [44] N. N. Gorgani, B. A. Smith, D. H. Kono, A. N. Theofilopoulos, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2002**, *169*, 4745.

-
- [45] T. T. Vu, B. A. Leslie, A. R. Stafford, J. Zhou, J. C. Fredenburgh, J. I. Weitz, *Thrombosis and haemostasis* **2016**, *115*, 89.
- [46] H. Bosshart, M. Heinzemann, *FEBS Letters* **2003**, *553*, 135.
- [47] V. Rydengård, A.-K. Olsson, M. Mörgelin, A. Schmidtchen, *The FEBS journal* **2007**, *274*, 377.
- [48] L. Kacprzyk, V. Rydengård, M. Mörgelin, M. Davoudi, M. Pasupuleti, M. Malmsten, A. Schmidtchen, *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, *1768*, 2667.
- [49] V. Rydengård, O. Shannon, K. Lundqvist, L. Kacprzyk, A. Chalupka, A.-K. Olsson, M. Mörgelin, W. Jahnen-Dechent, M. Malmsten, A. Schmidtchen, *PLoS pathogens* **2008**, *4*, e1000116.
- [50] N. N. Gorgani, C. R. Parish, S. B. Easterbrook Smith, J. G. Altin, *Biochemistry* **1997**, *36*, 6653.
- [51] N. N. Gorgani, J. G. Altin, C. R. Parish, *International immunology* **1999**, *11*, 1275.
- [52] N. N. Gorgani, J. G. Altin, C. R. Parish, *Immunology* **1999**, *98*, 456.
- [53] N. N. Gorgani, C. R. Parish, J. G. Altin, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29633.
- [54] W. T. Morgan, *Biochimica et Biophysica Acta* **1978**, *533*, 319.
- [55] M. Katagiri, K. Tsutsui, T. Yamano, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1987**, *149*, 1070.
- [56] W. T. Morgan, *Biochemistry* **1981**, 1054.
- [57] K. M. Priebatsch, I. K. H. Poon, K. K. Patel, M. Kvensakul, M. D. Hulett, *FEBS Letters* **2017**, *591*, 164.
- [58] K. M. Priebatsch, M. Kvensakul, I. K. H. Poon, M. D. Hulett, *Biomolecules* **2017**, *7*.
- [59] K. Patel, A. Kumar, S. Durani, *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, *1774*, 1247.
- [60] D.-B. Borza, W. T. Morgan, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5493.
- [61] O. Kassar, U. Schwarz-Linek, C. A. Blindauer, A. J. Stewart, *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **2015**, *13*, 101.
- [62] H. Wake, Y. Takahashi, Y. Yoshii, S. Gao, S. Mori, D. Wang, K. Teshigawara, M. Nishibori, *Free radical research* **2020**, *54*, 649.
- [63] W. T. Morgan, *Biochemistry* **2002**, *20*, 1054.
- [64] S. L. Guthans, W. T. Morgan, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1982**, *218*, 320.
- [65] Y. Yoshii, H. Wake, Y. Nishimura, K. Teshigawara, D. Wang, M. Nishibori, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2020**, *375*, 406.

- [66] H. Wake, S. Mori, K. Liu, Y. Morioka, K. Teshigawara, M. Sakaguchi, K. Kuroda, Y. Gao, H. Takahashi, A. Ohtsuka et al., *EBioMedicine* **2016**, *9*, 180.
- [67] N.-S. Chang, R. W. Leu, J. A. Rummage, J. K. Anderson, J. E. Mole, *Immunology* **1992**, 532.
- [68] D.-B. Borza, W. T. Morgan, *Journal of biological chemistry* **1997**, *272*, 5718.
- [69] S. Mori, H. K. Takahashi, K. Yamaoka, M. Okamoto, M. Nishibori, *Life Sciences* **2003**, *73*, 93.
- [70] T. Schinke, T. Koide, W. Jahnen-Dechent, *FEBS Letters* **1997**, *412*, 559.
- [71] K. K. Patel, I. K. H. Poon, G. H. Talbo, M. A. Perugini, N. L. Taylor, T. J. Ralph, N. J. Hoogenraad, M. D. Hulett, *IUBMB life* **2013**, *65*, 550.
- [72] M. Colwell, N. Ahmed, R. Butkowski, *Analytical biochemistry* **2017**, *525*, 67.
- [73] G. L. Rosano, E. A. Ceccarelli, *Frontiers in microbiology* **2014**, *5*, 172.
- [74] S. Sahdev, S. K. Khattar, K. S. Saini, *Molecular and cellular biochemistry* **2008**, *307*, 249.
- [75] H. H. Haeri, J. Blaffert, F. A. Schöffmann, M. Blech, J. Hartl, P. Garidel, D. Hinderberger, *Molecules* **2019**, *24*.
- [76] M. A. Uddin, H. Yu, L. Wang, K.-u.-R. Naveed, F. Haq, B. U. Amin, S. Mehmood, A. Nazir, Y. Xing, Di Shen, *Journal of Polymer Science* **2020**, *58*, 1924.
- [77] D. La Mendola, A. Magrì, A. M. Santoro, V. G. Nicoletti, E. Rizzarelli, *Journal of inorganic biochemistry* **2012**, *111*, 59.
- [78] A. Magrì, G. Grasso, F. Corti, F. Finetti, V. Greco, A. M. Santoro, S. Sciuto, D. La Mendola, L. Morbidelli, E. Rizzarelli, *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2018**, *47*, 9492.
- [79] A. Jancsó, A. Kolozsi, B. Gyurcsik, N. V. Nagy, T. Gajda, *Journal of inorganic biochemistry* **2009**, *103*, 1634.
- [80] P. G. Argudo, J. J. Giner-Casares, *Nanoscale Adv.* **2021**, *3*, 1789.
- [81] W. Gerlach, O. Stern, *Z. Physik* **1922**, *9*, 349.
- [82] G. E. Uhlenbeck, S. Goudsmit, *Nature* **1926**, *117*, 264.
- [83] D. G. avin, W. C. Tennant, *Molecular Physics* **1985**, *55*, 853.
- [84] C. Karunakaran, M. Balamurugan in *Spin Resonance Spectroscopy*, Elsevier, **2018**, S. 169–228.
- [85] M. M. Roessler, E. Salvadori, *Chemical Society reviews* **2018**, *47*, 2534.
- [86] V. A. Tran, A. I. Kokorin, G. Grampp, K. Rasmussen, *Appl Magn Reson* **2009**, *35*, 389.

-
- [87] J. P. Klare in *Protein Interactions*.
- [88] E. Bordignon in *eMagRes* (Hrsg.: R. K. Harris, R. L. Wasylishen), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2007**, S. 235–254.
- [89] O. Schiemann, T. F. Prisner, *Quarterly reviews of biophysics* **2007**, *40*, 1.
- [90] W. L. Hubbell, D. S. Cafiso, C. Altenbach, *Nature structural biology* **2000**, *7*, 735.
- [91] M. J. N. Junk, *Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2012**.
- [92] E. Bordignon, H. Brutlach, L. Urban, K. Hideg, A. Savitsky, A. Schnegg, P. Gast, M. Engelhard, E. J. J. Groenen, K. Möbius et al., *Appl Magn Reson* **2010**, *37*, 391.
- [93] A. Marko, A. Sojka, O. Laguta, P. Neugebauer, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2021**.
- [94] R. Y. Dong (Hrsg.) *Partially Ordered Systems*, Springer, New York, NY, **1994**.
- [95] A. H. Roos, J. F. Hoffmann, W. H. Binder, D. Hinderberger, *Soft matter* **2021**.
- [96] J. Eisermann, *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, **2019**.
- [97] P. M. Schosseler, ETH Zurich, **1998**.
- [98] G. W. Canters, G. Gilardi, *FEBS Letters* **1993**, *325*, 39.
- [99] B.-k. Shin, University of Pittsburgh, Pittsburgh, **2011**.
- [100] Edward I. Solomon/Michael J. Baldwin/Michael D. Lowery, *Chemical Reviews* **1992**, 521.
- [101] J. Peisach, W. E. Blumberg, *Archives of biochemistry and biophysics* **1974**, *165*, 691.
- [102] B. Bennett, J. M. Kowalski, *Methods in enzymology* **2015**, *563*, 341.
- [103] G. Jeschke, *Vorlesungsskript*, Universität Konstanz, Konstanz, **2006**.
- [104] J. Reichenwallner, *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, **2018**.
- [105] J. Hunold, *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, **2020**.
- [106] K. Scheffler, H. B. Stegmann (Hrsg.) *Elektronenspinresonanz. Grundlagen und Anwendung in der organischen Chemie*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1970**.
- [107] D. Hinderberger, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **2004**.
- [108] T. A. Rouault (Hrsg.) *Iron-sulfur clusters in chemistry and biology*, De Gruyter, Berlin, Boston, **2017**-.
- [109] S. K. Misra (Hrsg.) *Multifrequency electron paramagnetic resonance. Theory and applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.

- [110] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580.
- [111] Y. Deligiannakis, M. Louloudi, N. Hadjiliadis, *Coordination Chemistry Reviews* **2000**, *1*.
- [112] T. Prisner, M. Rohrer, F. MacMillan, *Annual review of physical chemistry* **2001**, *52*, 279.
- [113] S. van Doorslaer in *eMagRes* (Hrsg.: R. K. Harris, R. L. Wasylishen), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2007**, S. 51–70.
- [114] J. McCracken in *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* (Hrsg.: R. A. Scott), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2011**, S. 1.
- [115] J. Preisach in *Bioradicals Detected by ESR Spectroscopy*, S. 203–215.
- [116] D. Goldfarb, S. Stoll, *Modern EPR Spectroscopy*, John Wiley & Sons Incorporated, Newark, **2018**.
- [117] R. Pecora, *Journal of Nanoparticle Research* **2000**, *123*.
- [118] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, *Biophysical reviews* **2016**, *8*, 409.
- [119] S. Bhattacharjee, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2016**, *235*, 337.
- [120] F. Ross Hallett, *Food Research International* **1994**, *27*, 195.
- [121] S. W. Provencher, *Computer Physics Communications* **1982**, *27*, 213.
- [122] M. Kaszuba, M. T. Connah, *Part. Part. Syst. Charact.* **2006**, *23*, 193.
- [123] J. R. Lakowicz (Hrsg.) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, NY, **2010**.
- [124] A. Köhler, J. S. Wilson, R. H. Friend, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 701.
- [125] A. B. T. Ghisaidoobe, S. J. Chung, *International journal of molecular sciences* **2014**, *15*, 22518.
- [126] S. Barik, *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*.
- [127] M. R. Eftink, C. A. Ghiron, *Analytical biochemistry* **1981**, *114*, 199.
- [128] R. H. Pain, *Current protocols in protein science* **2004**.
- [129] A. S. Ladokhin, *Encyclopedia of Analytical Chemistry* **2000**, 5762.
- [130] G. S. Chaga, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2001**, *49*, 313.
- [131] H. Block, B. Maertens, A. Priestersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn, F. Schäfer in *Methods in Enzymology, Vol. 463* (Hrsg.: H. Block, B. Maertens, A. Priestersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn, F. Schäfer), Elsevier, **2009**, S. 439–473.
- [132] E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher, *Journal of Chromatography A* **1987**, *411*, 177.

-
- [133] J. Schmitt, H. Hess, H. G. Stunnenberg, *Molecular biology reports* **1993**, 18, 223.
- [134] A. K. Weyrauch, *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, **2018**.
- [135] GE Healthcare Life Sciences, *Affinity Chromatography Handbook, Vol. 2: Tagged Proteins*, **2016**.
- [136] K. J. Petty, *Current protocols in neuroscience* **2001**, Chapter 5, Unit 5.10.
- [137] R. Westermeier, *Elektrophorese leicht gemacht. Ein Praxisbuch für Anwender*, 2. Aufl., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2016**.
- [138] H. A. Sober, E. A. Peterson, *Journal of the American Chemical Society* **1954**, 76, 1711.
- [139] A. M. Lenhoff, *Materials Today: Proceedings* **2016**, 3, 3559.
- [140] P. Cutler, *Protein Purification Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, **2004**.
- [141] P. G. Righetti, *Journal of chromatography. A* **2004**, 1037, 491.
- [142] A. Jungbauer, R. Hahn in *Methods in Enzymology, Vol. 463* (Hrsg.: R. R. Burgess, M. P. Deutscher), Elsevier Acad. Press, San Diego, Calif., **2009**, S. 349–371.
- [143] A. Williams, V. Frasca, *Current protocols in protein science* **2001**, Chapter 8, Unit8.2.
- [144] GE Healthcare Life Sciences.
- [145] V. L. Ng, V. L. Herndon, C. R. Mendelson, J. M. Snyder, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1983**, 754, 218.
- [146] A. J. Hickey (Hrsg.) *Drugs and the pharmaceutical sciences*, CRC Press, Boca Raton, Florida, **2019**.
- [147] Carl Roth GmbH + Co. KG, *Gebrauchsanweisung RotiBlue. Kolloidale Coomassie-Färbung*.
- [148] G. Jeschke, *Molecular and Structural Biology V. Studying Macromolecules by EPR*.
- [149] O. B. Morozova, A. V. Yurkovskaya, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2021**, 23, 5919.
- [150] C. Vallotto, H. E. Williams, D. M. Murphy, Z. J. Ayres, R. Edge, M. E. Newton, C. J. Wedge, *International journal of pharmaceutics* **2017**, 533, 315.
- [151] M. R. Gunther, J. A. Peters, M. K. Sivaneri, *The Journal of biological chemistry* **2002**, 277, 9160.
- [152] G. Lassmann, L. A. Eriksson, F. Lenzian, W. Lubitz, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 9144.
- [153] G. Lassmann, L. A. Eriksson, F. Himo, F. Lenzian, W. Lubitz, *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 1283.
- [154] C. Schöneich, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2000**, 21, 1093.

- [155] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc., Trans.* **1894**, 65, 899.
- [156] M. Valko, K. Jomova, C. J. Rhodes, K. Kuča, K. Musílek, *Archives of toxicology* **2016**, 90, 1.
- [157] R. A. Floyd, J. M. Carney, *Annals of neurology* **1992**, 32 Suppl, S22-7.
- [158] H. Mattila, S. Khorobrykh, V. Havurinne, E. Tyystjärvi, *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2015**, 152, 176.
- [159] R. Romero, D. Contreras, M. Sepúlveda, N. Moreno, C. Segura, V. Melin, (Keine Angabe), *Journal of hazardous materials* **2020**, 382, 120982.
- [160] C. L. Hawkins, M. J. Davies, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2001**, 1504, 196.
- [161] S. P. Wolff, R. T. Dean, *The Biochemical journal* **1986**, 234, 399.
- [162] M. J. Davies, *The Biochemical journal* **2016**, 473, 805.
- [163] J. Du, J. J. Cullen, G. R. Buettner, *Biochimica et Biophysica Acta* **2012**, 1826, 443.
- [164] F. Shi, P. Zhang, Y. Mao, C. Wang, M. Zheng, Z. Zhao, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2017**, 483, 159.
- [165] I. G. Munteanu, C. Apetrei, *International journal of molecular sciences* **2021**, 22.
- [166] P. Zhou, J. Zhang, Y. Zhang, Y. Liu, J. Liang, B. Liu, W. Zhang, *RSC Adv.* **2016**, 6, 38541.
- [167] Y.-J. Tu, D. Njus, H. B. Schlegel, *Organic & biomolecular chemistry* **2017**, 15, 4417.
- [168] E. Niki, *The American journal of clinical nutrition* **1991**, 54, 1119S-1124S.
- [169] A. J. Nappi, E. Vass, *neurotox res* **2000**, 2, 343.
- [170] J. J. Warren, J. M. Mayer, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 7784.
- [171] A. A. Bobko, I. A. Kirilyuk, I. A. Grigor'ev, J. L. Zweier, V. V. Khramtsov, *Free radical biology & medicine* **2007**, 42, 404.
- [172] L. Chen, X. Li, J. Zhang, J. Fang, Y. Huang, P. Wang, J. Ma, *Environmental science & technology* **2015**, 49, 10373.
- [173] P. Zhou, J. Zhang, Y. Zhang, Y. Liu, J. Liang, B. Liu, W. Zhang, *RSC Adv.* **2016**, 6, 38541.
- [174] M. Teresa, S. Petersen, G. Prakash.
- [175] J. P. Reilly, *Mass spectrometry reviews* **2009**, 28, 425.
- [176] B. A. Kerwin, R. L. Remmele, *Journal of pharmaceutical sciences* **2007**, 96, 1468.
- [177] G. R. Eaton, S. S. Eaton, D. P. Barr, R. T. Weber, *Quantitative EPR. A Practitioners Guide*, 1. Aufl., Springer Verlag Wien, s.l., **2010**.

-
- [178] N. Kocherginsky, H. M. Swartz, M. Sentjurs, *Nitroxide spin labels. Reactions in biology and chemistry*, CRC Press, Boca Raton, Fla., **1995**.
- [179] M. J. N. Junk, U. Jonas, D. Hinderberger, *Small* **2008**, *4*, 1485.
- [180] R. I. Zhdanov in *Bioactive Spin Labels* (Hrsg.: R. I. Zhdanov), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1992**, S. 23–82.
- [181] S. S. Eaton, L. B. Woodcock, G. R. Eaton, *Concepts in magnetic resonance. Part A, Bridging education and research* **2018**, 47A.
- [182] A. W. Bosman, R. A. J. Janssen, E. W. Meijer, *Macromolecules* **1997**, *30*, 3606.
- [183] W. Konigsberg, *25*, 185.
- [184] N.-S. Choi, J.-H. Hahm, P. J. Maeng, S.-H. Kim, *Journal of biochemistry and molecular biology* **2005**, *38*, 177.
- [185] A. I. Luik, Y.N. Naboka, S. E. Mogilevich, T. O. Hushcha, N. I. Mischenko, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1998**, *54*, 1503.
- [186] U. Nobbmann, M. Connah, B. Fish, P. Varley, C. Gee, S. Mulot, J. Chen, L. Zhou, Y. Lu, F. Shen et al., *Biotechnology & genetic engineering reviews* **2007**, *24*, 117.
- [187] B. Lorber, F. Fischer, M. Bailly, H. Roy, D. Kern, *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* **2012**, *40*, 372.
- [188] A. L.J. Beckwith, S. Brumby, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1987**, *73*, 260.
- [189] D. R. Lide, W. E. Acree (Hrsg.) *CRC handbook of chemistry and physics. A ready-reference book of chemical and physical data*, CRC Press, Boca Raton, Fla., **1991**.
- [190] P. J. Carl, D. E. W. Vaughan, D. Goldfarb, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 5428.
- [191] H. H. Haeri, V. Jerschabek, A. Sadeghi, D. Hinderberger, *Macromol. Chem. Phys.* **2020**, *221*, 2000262.
- [192] C. S. Burns, E. Aronoff-Spencer, C. M. Dunham, P. Lario, N. I. Avdievich, W. E. Antholine, M. M. Olmstead, A. Vrielink, G. J. Gerfen, J. Peisach et al., *Biochemistry* **2002**, *41*, 3991.
- [193] B. B. Muhoberac, M. K. Burch, W. T. Morgan, *Biochemistry* **1988**, 746.
- [194] J. Huet, E. Vilkas, *Inorganica Chimica Acta* **1984**, 43.
- [195] F. Neese, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 4290.
- [196] H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Food Chemistry*, 4. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2009**.

- [197] T. Fehrenbach, *Dissertation*, Technischen Universität München, München, **2007**.
- [198] X. Wu, H. Koiwa, *Analytical biochemistry* **2012**, 421, 347.
- [199] I. Bio-Rad Laboratories, *A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*, **2017**.
- [200] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680.
- [201] L. C. Lane, *Analytical biochemistry* **1978**, 86, 655.
- [202] C. M. Stoscheck, *Methods in enzymology* **1990**, 182, 50.
- [203] S. C. Gill, P. H. von Hippel, *Analytical biochemistry* **1989**, 182, 319.
- [204] A. Aitken, M. P. Learmonth in *The Protein Protocols Handbook*, S. 3–6.
- [205] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, *Protein science : a publication of the Protein Society* **1995**, 4, 2411.
- [206] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Analytical biochemistry* **1985**, 150, 76.
- [207] Thermo Fisher Scientific, *Pierce BCA Protein Assay Kit User Guide*, **2020**.
- [208] J. M. Walker in *The Protein Protocols Handbook*, S. 11–15.
- [209] S. Stoll, A. Schweiger, *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2006**, 178, 42.
- [210] S. Stoll, A. Schweiger, *ESR spectroscopy in membrane biophysics* **2007**, 27, 299.
- [211] D. J. Schneider, J. H. Freed in *Biological Magnetic Resonance* (Hrsg.: L. J. Berliner, J. Reuben), Springer US, Boston, MA, **1989**, S. 1–76.
- [212] S. W. Provencher, *Computer Physics Communications* **1982**, 27, 229.

A. Anhang

A.1. Aufreinigung und allgemeine Charakterisierung des HPRGs

A.1.1. Alternative Methode: Anionenaustauschchromatographie

Es wurden neben der Aufreinigung über den Kationenaustauscher auch weitere chromatographische Methoden getestet. Dazu zählte die Verwendung des Anionenaustauschers aus „Q-Sepharose FF“ mit 1 ml Säulenbettvolumen bei einem pH-Wert von 8,5. Es wurde dazu ein Tris-Puffer verwendet und die Elution erfolgt mittels einem linearen Natriumchlorid-Gradienten. Dieser setzt sich aus Bindungspuffer (0 mM NaCl) und Elutionspuffer (1 M NaCl) zusammen. Für die chromatographische Aufreinigung wurden die HPRG-enthaltenden Fraktionen der Cobalt-Affinitätschromatographie in den Tris-Puffer über Dialyse (MWCO: 10kDa; Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette von Thermo Scientific) umgepuffert und direkt auf die Säule aufgegeben.

Die Auftragung proteinhaltiger Fraktionen auf einem SDS-PAGE-Gel ist in Abbildung A.1 und Chromatogramm ist in Abbildung A.2 gezeigt. Man erkennt zwischen Fraktion 5 und 15 zwei Peaks. Bei dem ersten Peak wird hauptsächlich Albumin von der Säule entfernt, wohingegen bei dem zweiten Peak mit einem Natriumchloridgehalt ab etwa 250 mM HPRG eluiert wird, welches jedoch noch Verunreinigungen von Albumin enthält. Das Maximum des Peaks wird bei einer Natriumchlorid-Konzentration von 300 mM bei Fraktion 12 erreicht. Dies ist in den Gelbanden der Fraktionen 12 bis 14 als schmale Bande bei einer Molekülgröße von etwa 60 kDa zu sehen. Bei der breiten Bande handelt es sich um HPRG.

Anhang

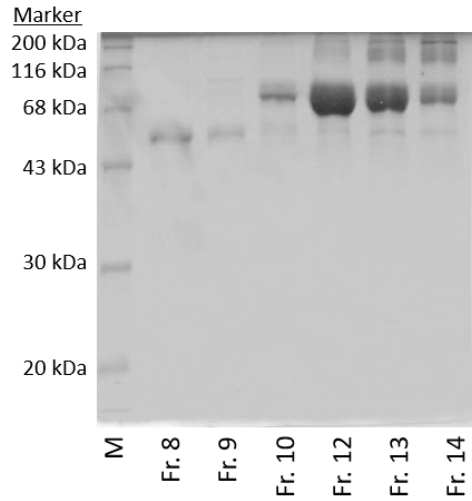


Abbildung A.1: SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen der Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie mit Marker (M).

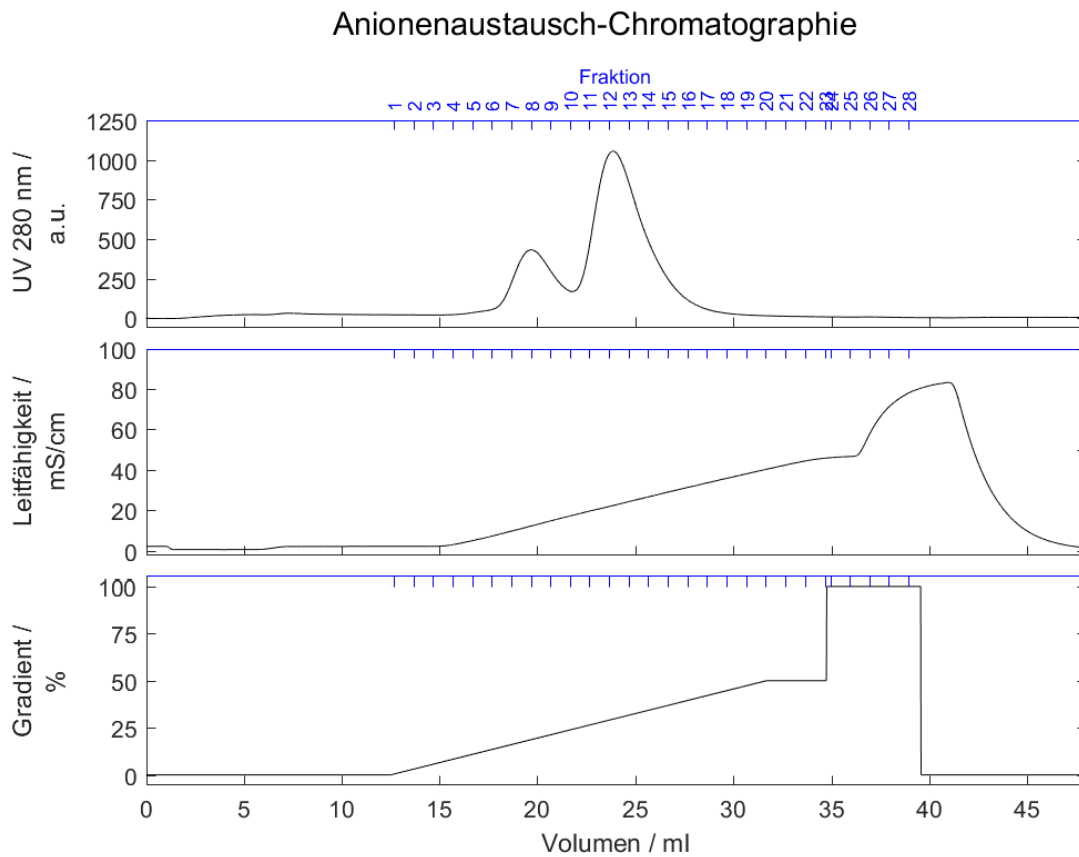


Abbildung A.2: Elutionsprofil der Aufreinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie und Elution mit einem Natriumchlorid-haltigen Puffer.

Aufreinigung und allgemeine Charakterisierung des HPRGs

Säule	Cytiva HiTrap Q FF, 1 ml
Probenaufgabe	5 ml der vereinigten und in Bindungspuffer umgepufferten Fraktionen der Co-Affinitätschromatographie
Detektion	280 nm und Leitfähigkeit
Flussrate	1 ml/min
Fraktionsvolumen	1 ml
Ablauf	<p>5 CV Equilibrierung mit Startpuffer (A1)</p> <p>Probenaufgabe</p> <p>8 CV Waschen mit Startpuffer (A1)</p> <p>Gradientenelution mit Fraktionierung zu je 10 ml (= 2 CV):</p> <p>Gradient über 20 CV von 0 % Elutionspuffer (B1) bis 50 % Elutionspuffer (B1)</p> <p>Gradient über 5 CV von 50 % Elutionspuffer (B1) bis 100 % Elutionspuffer (B1)</p> <p>5 CV 100 % Elutionspuffer (B1)</p>

Tabelle A.1: Zusammensetzung der Puffer für die Anionenaustausch-Chromatographie.

Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer	<p>20 mM Tris</p> <p>pH 8,5</p>
Elutionpuffer	<p>20 mM Tris</p> <p>1000 mM Natriumchlorid</p> <p>pH 7,4</p>

A.1.2. Alternative Methode: Affinitätschromatographie an Con A Sepharose 4B

Als weitere Aufreinigungsmethode wurde die Affinität an eine Con A 4B Sepharose-Säule genutzt. Da es sich bei HPRG im Gegensatz zu Albumin um ein Glykoprotein handelt, sollte nur HPRG an die Säule binden. Als Probe wurden 5 ml der HPRG-enthaltenden Fraktionen der Co-Affinitätssäule, welche in den Bindungspuffer durch Dialyse umgepuffert (MWCO: 10kDa; Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette von Thermo Scientific) wurden, verwendet. Nach Waschen der Säule mit Bindungspuffer wurde mit einem Gradienten mit Methyl- α -D-glucopyranosid von 0 mM (0 %) bis 500 mM (100 %) das gebundene Protein eluiert.

Das Chromatogramm ist in Abbildung A.4 und die Auftragung proteinhaltiger Fraktionen auf einem SDS-PAGE-Gel ist in Abbildung A.3 gezeigt. Es wurde bei der Probenaufgabe bereits ein großer Teil Protein nicht an die Säule gebunden. Die eluierten Fraktionen enthalten im Bereich von Fraktion 5 bis etwa 20 mit einem starken Tailing Protein, welches auf dem Gel als ein Gemisch aus HPRG und Albumin identifiziert werden konnte. Auch eine höhere Konzentration an Methyl- α -D-glucopyranosid bewirkte keine Änderung im Elutionsverhalten, sodass auch hier ein deutliches Tailing und keine eindeutige Trennung zwischen Albumin und HPRG zu erkennen war. Daher wurde auf weitere Testläufe mittels Con A 4B-Sepharose verzichtet.

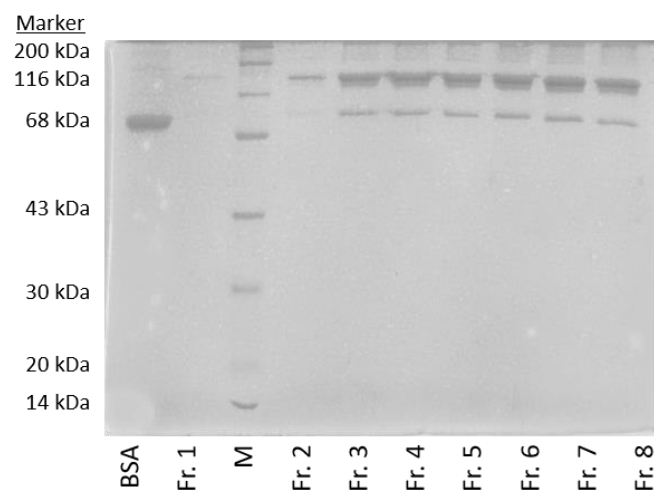


Abbildung A.3: SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen der Fraktionen der Con A 4 B-Affinitätschromatographie mit Marker (M) und bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenz.

Affinitätschromatographie an Con A 4B Sepharose

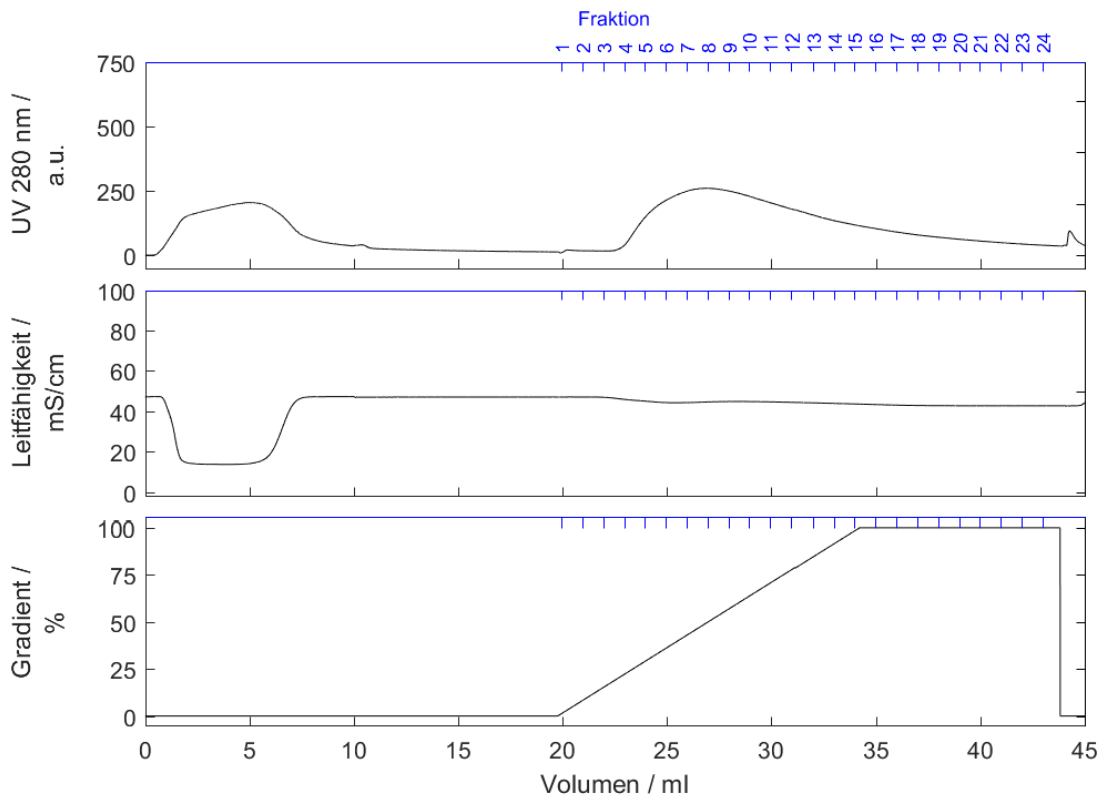


Abbildung A.4: Elutionsprofil der Aufreinigung mittels Con A 4B-Affinitätschromatographie und Elution mit einem Methyl- α -D-glucoopyranosid-haltigen Puffer.

Säule	Cytiva HiTrap Con A 4B Sepharose, 1 ml
Probenaufgabe	5 ml der vereinigten und in Bindungspuffer umgepufferten Fraktionen der Co-Affinitätschromatographie
Detektion	280 nm und Leitfähigkeit
Flussrate	1 ml/min
Fraktionsvolumen	1 ml
Ablauf	10 CV Equilibrierung mit Bindungspuffer (A1) Probenaufgabe 15 CV Waschen mit Bindungspuffer (A1) Gradientenelution mit Fraktionierung zu je 1 ml (= 1 CV): Gradient über 15 CV von 0 % Elutionspuffer (B1) bis 100 % Elutionspuffer (B1) 5 CV 100 % Elutionspuffer (B1)

Anhang

Tabelle A.2: Zusammensetzung der Puffer für die Con A 4B-Affinitätschromatographie.

Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer	20 mM Tris 500 mM Natriumchlorid 1 mM Manganchlorid 1 mM Calciumchlorid pH 7,4
Elutionpuffer	20 mM Tris 500 mM Natriumchlorid 500 mM Methyl- α -D-glucoopyranosid pH 7,4

A.2. Antioxidatives Verhalten des HPRGs

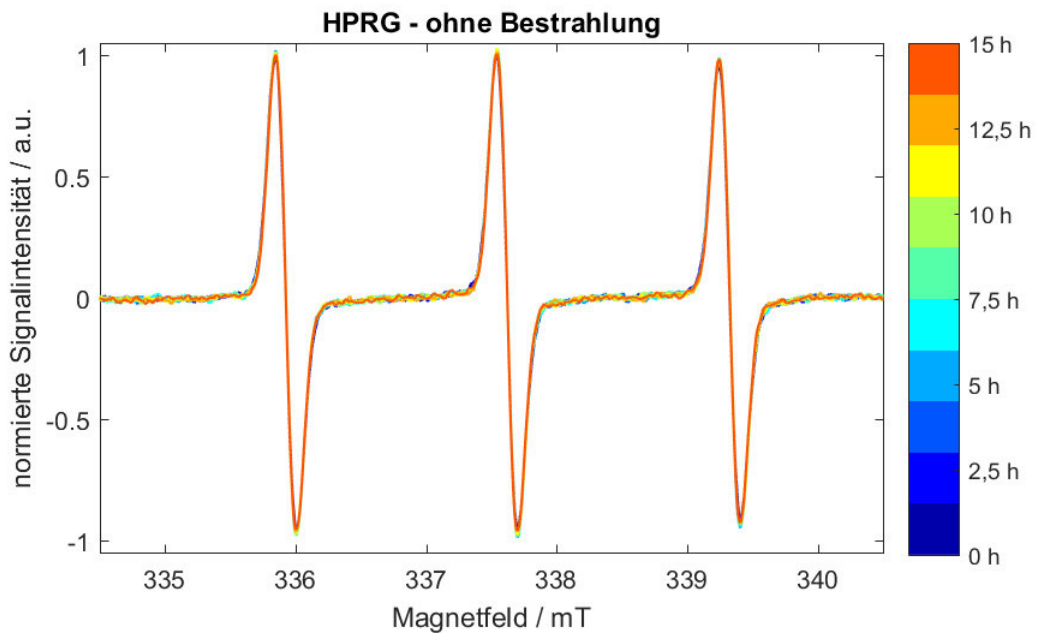


Abbildung A.5: Amplitudennormierte EPR-Spektren des radikalischen HPRGs über einen Zeitraum von 15 h in PBS pH 7,4.

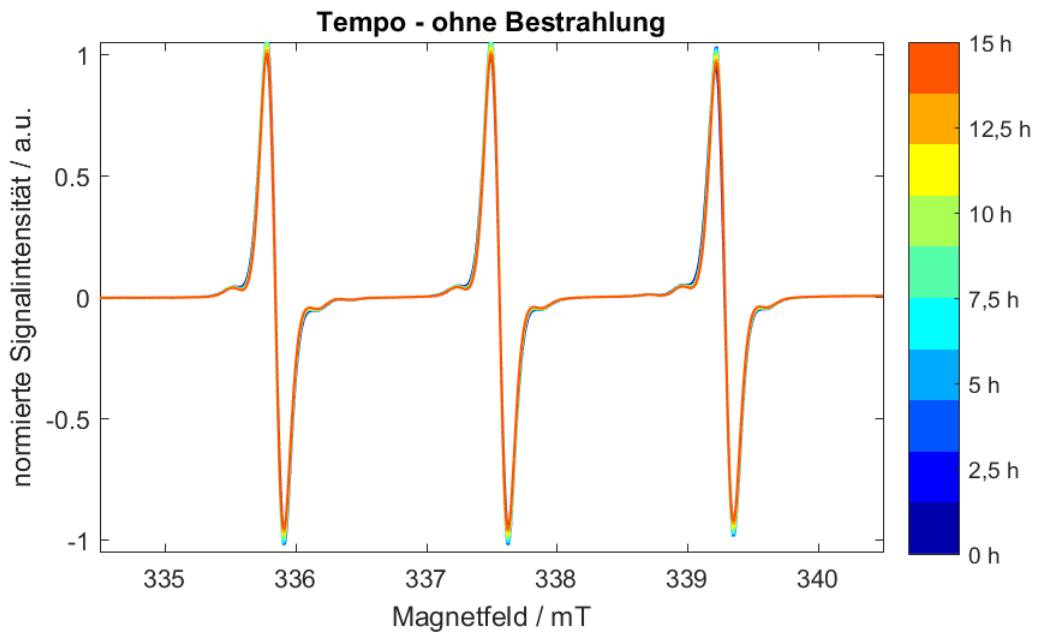


Abbildung A.6: Amplitudennormierte EPR-Spektren von TEMPO über einen Zeitraum von 15 h in PBS pH 7,4.

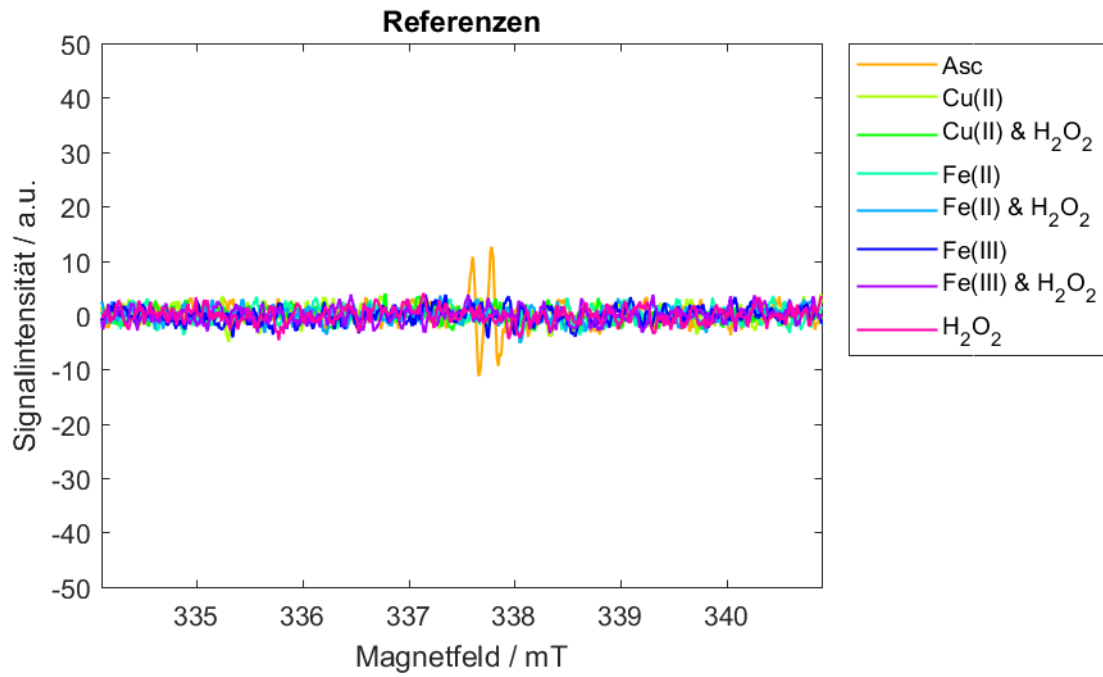


Abbildung A.7: cw-X-Band EPR-Spektren der Lösungen von Metallionen mit und ohne Wasserstoffperoxid in PBS pH 7,4.

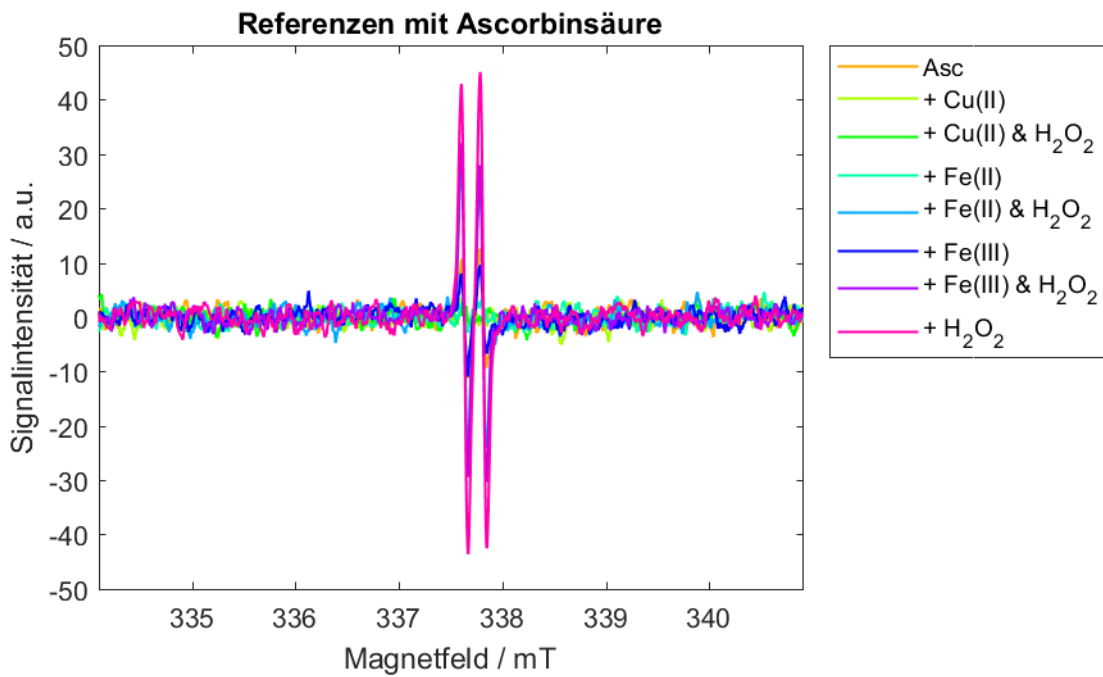
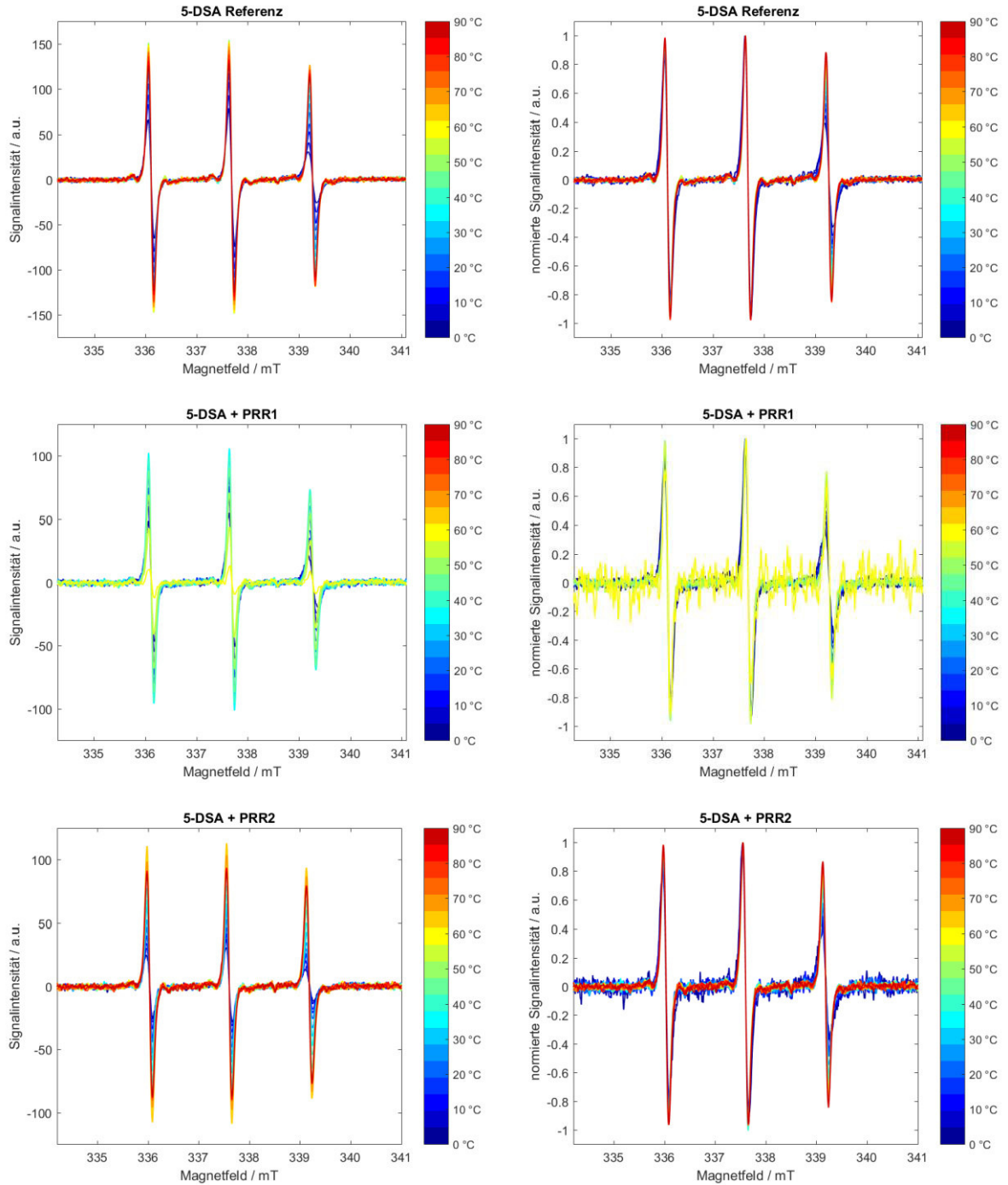


Abbildung A.8: cw-X-Band EPR-Spektren der Lösungen von Metallionen mit und ohne Wasserstoffperoxid bei Anwesenheit von Ascorbinsäure in PBS pH 7,4.

A.3. EPR-spektroskopische Untersuchung der Ligandenbindungskapazität

A.3.1. Ligand: Doxylstearinsäure als Fettsäureanalog

A.3.1.1. 5-Doxylstearinsäure



Anhang

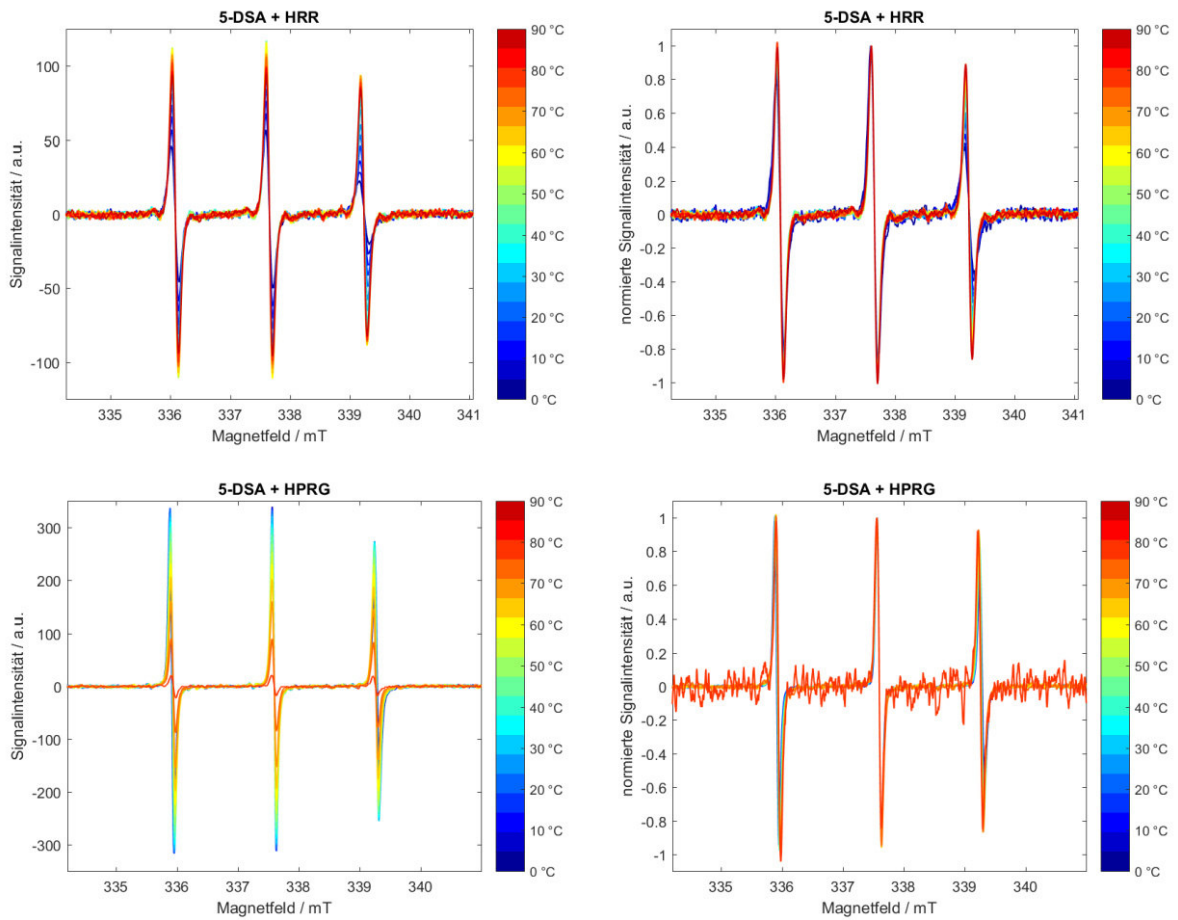


Abbildung A.9: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 5-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.

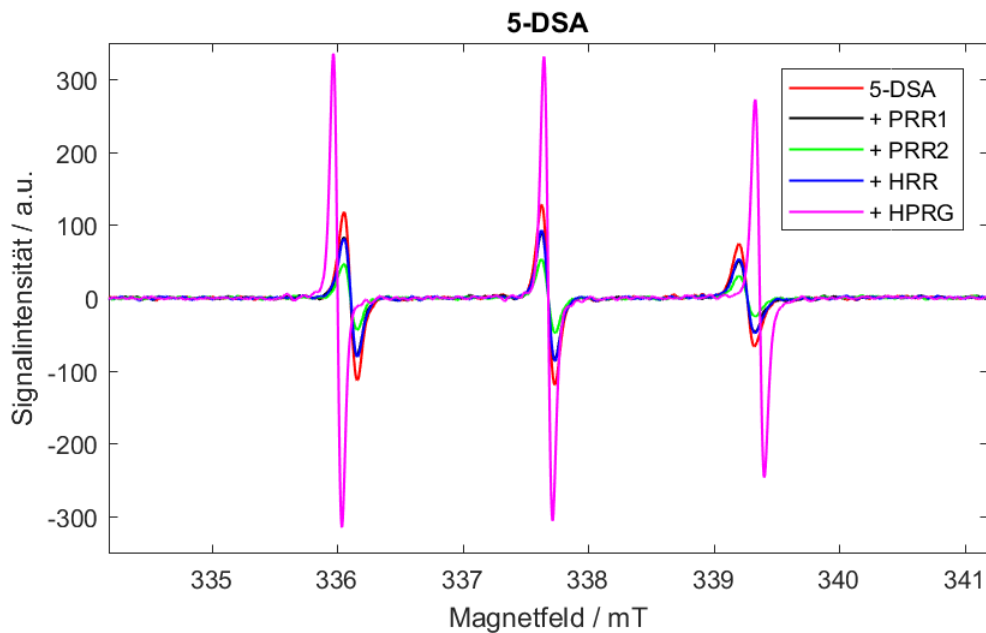


Abbildung A.10: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 5-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs bei 20 °C.

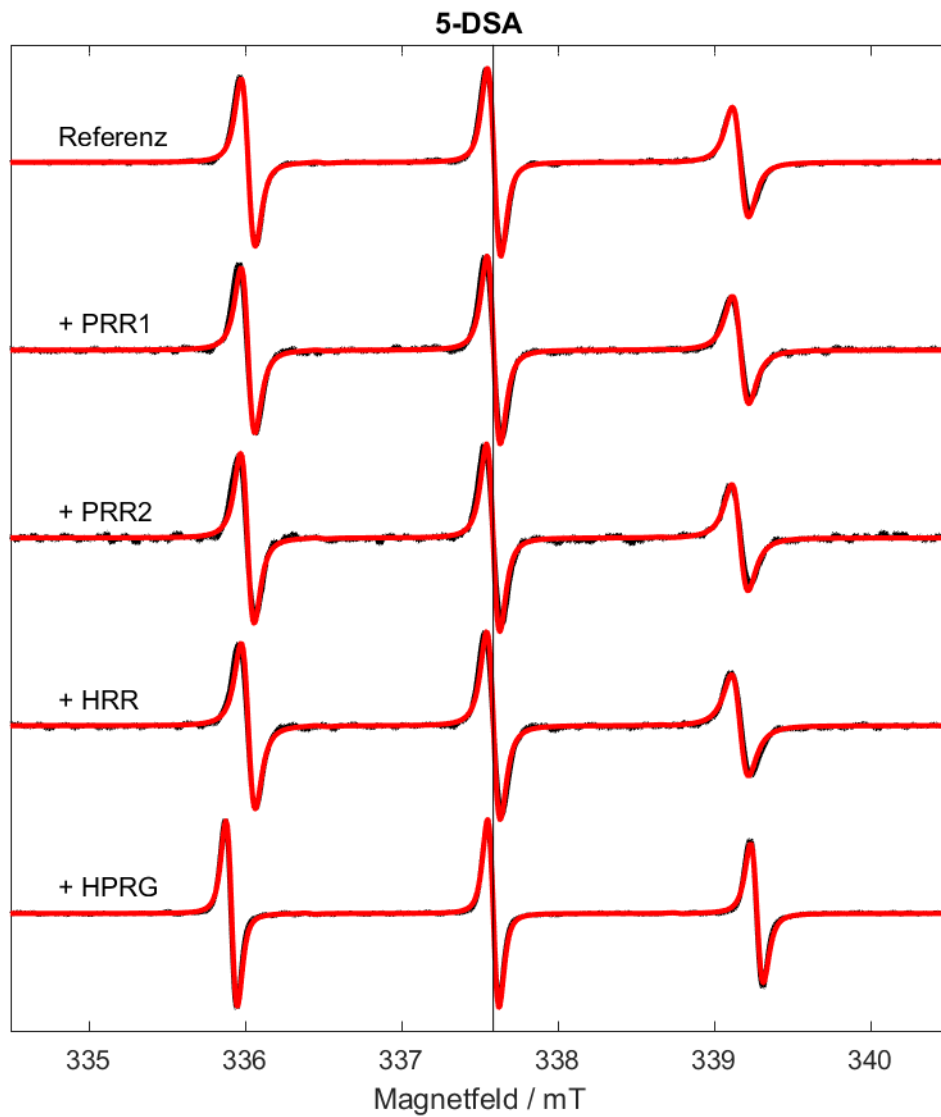
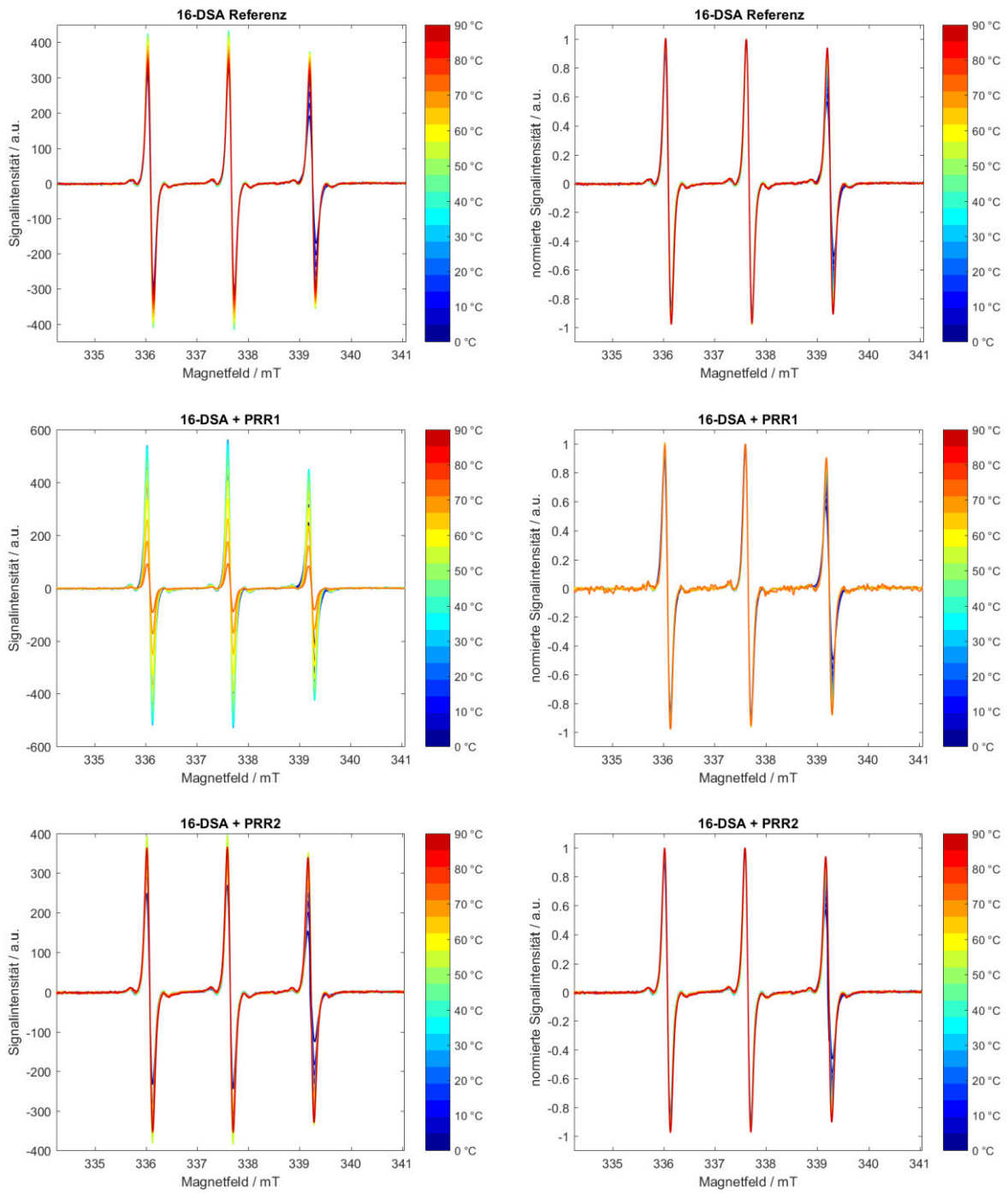


Abbildung A.11: Darstellung der gemessenen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für die Spinsonde 5-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.

A.3.1.2. 16-Doxylstearinsäure



EPR-spektroskopische Untersuchung der Ligandenbindungskapazität

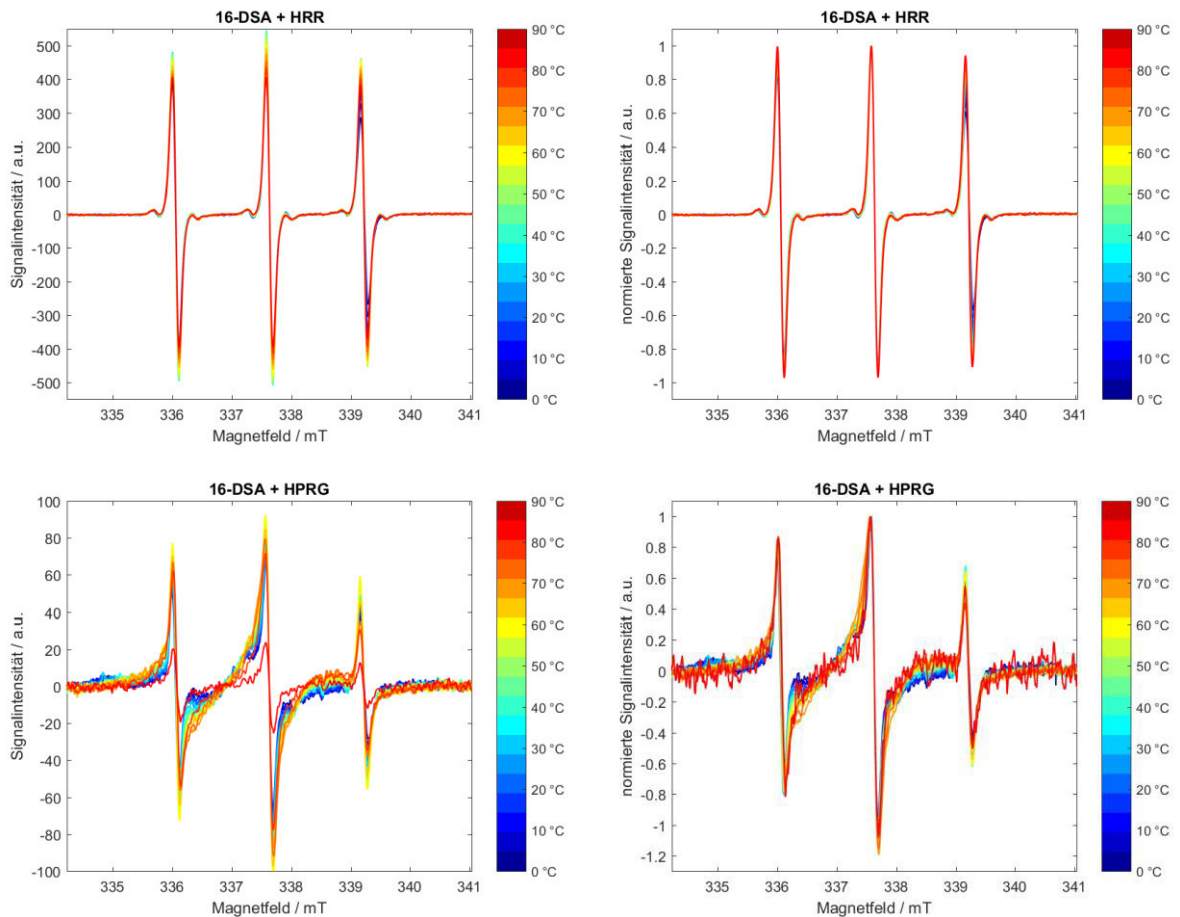


Abbildung A.12: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 16-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.

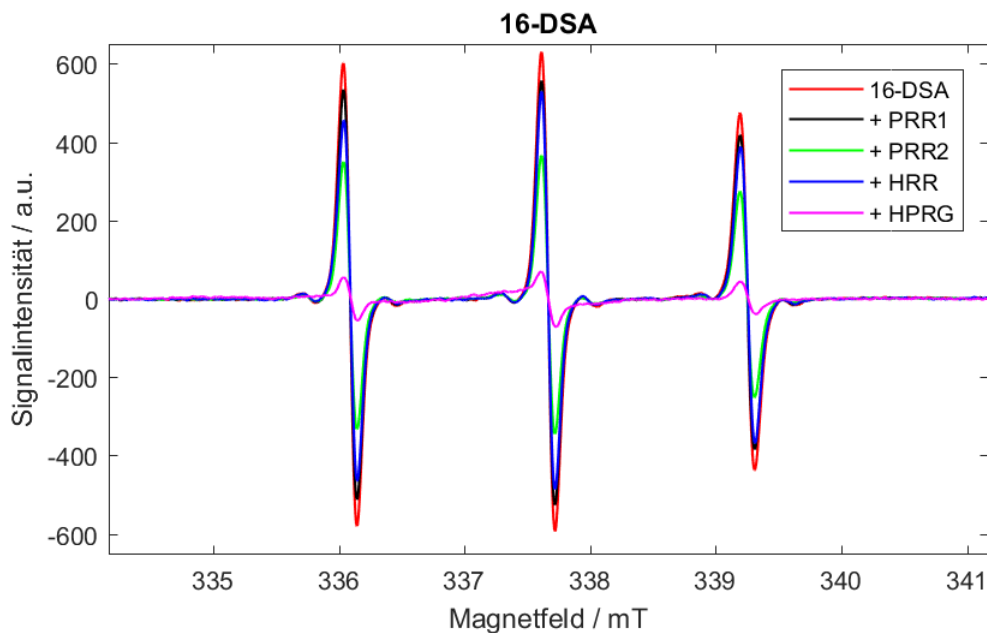
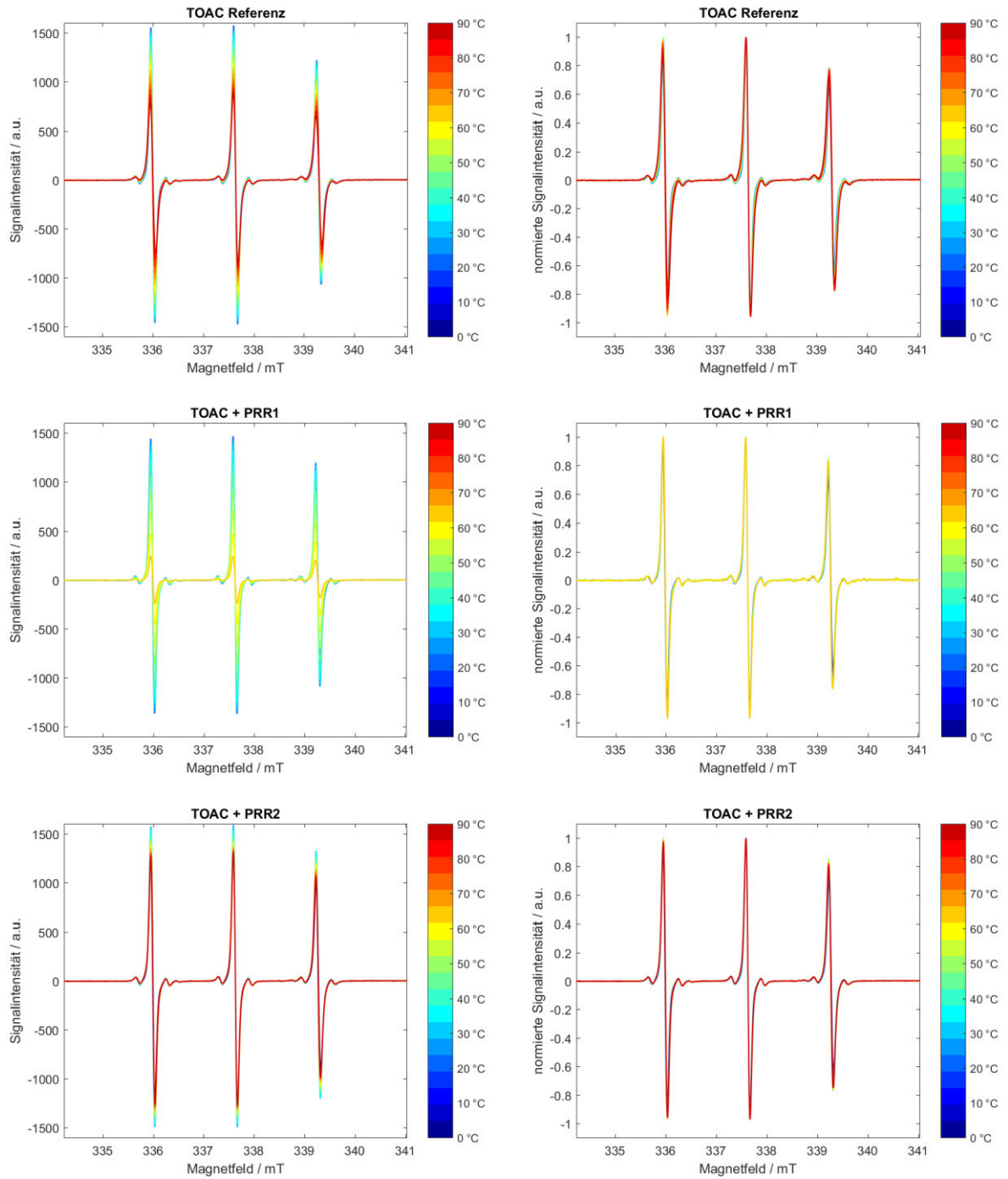


Abbildung A.13: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 16-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs bei 20 °C.



Abbildung A.14: Darstellung der gemessenen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für die Spinsonde 16-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.

A.3.2. Ligand: TOAC als Aminosäureanaloge



Anhang

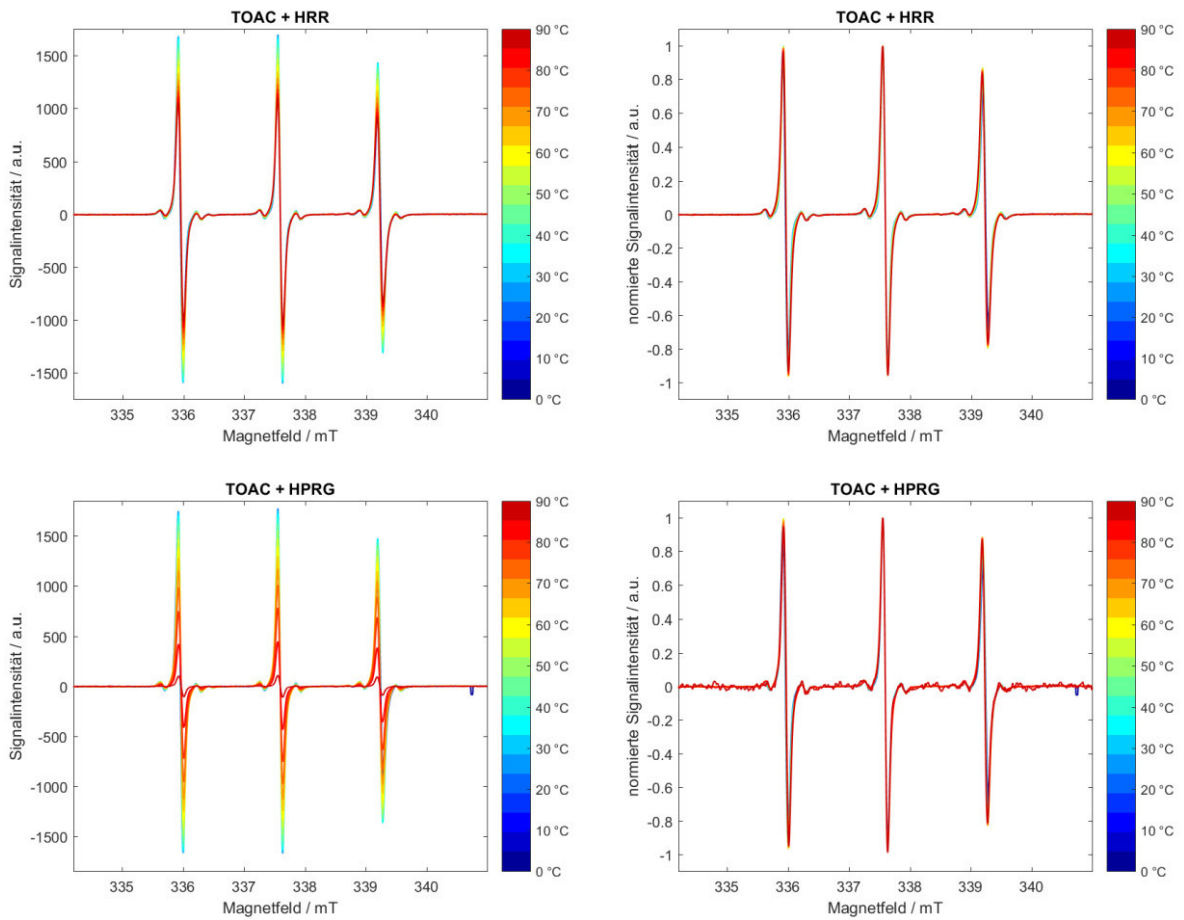


Abbildung A.15: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde TOAC mit HRR und den Peptiden des HPRGs in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.

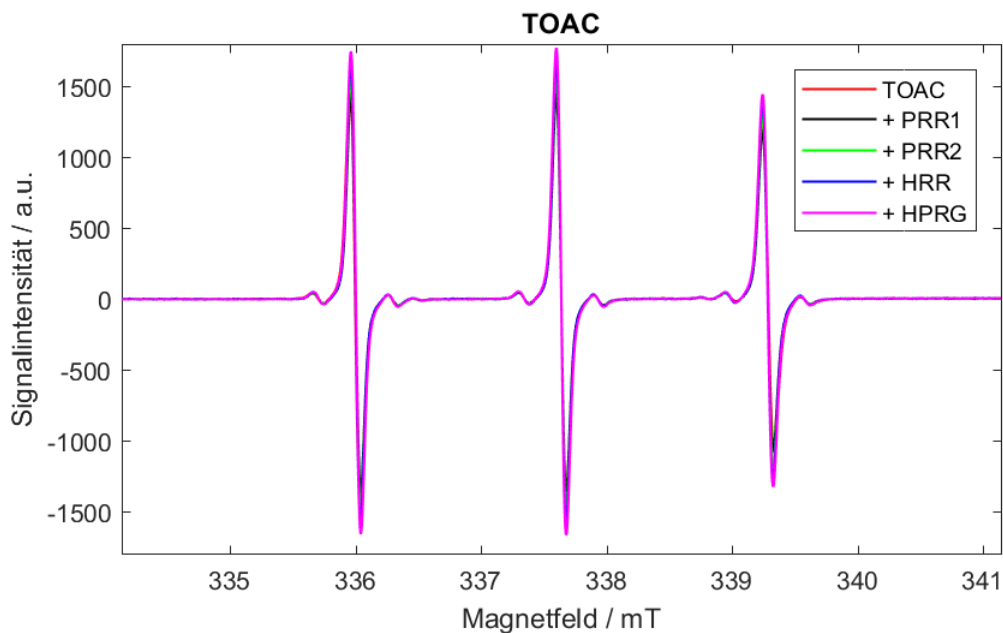


Abbildung A.16: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde TOAC mit HPRG und den Peptiden des HPRGs bei 20 °C.

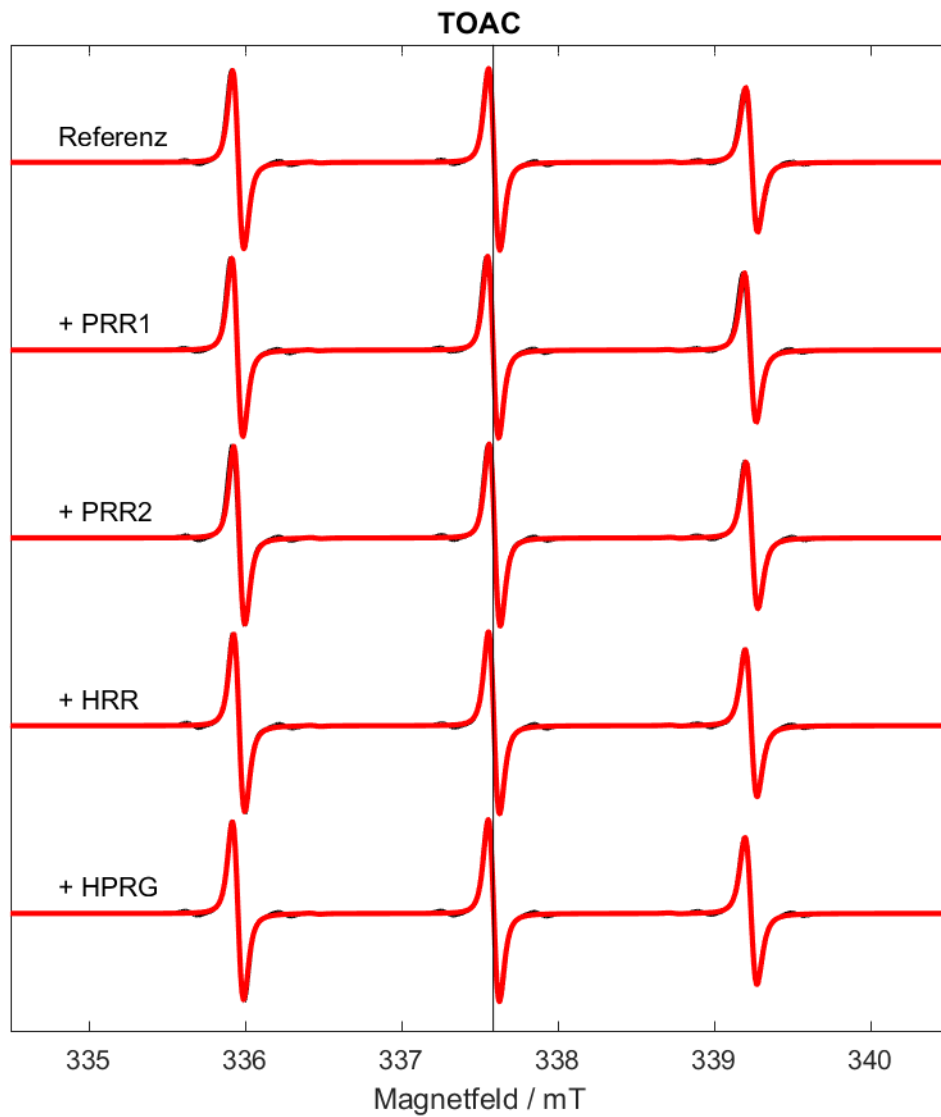
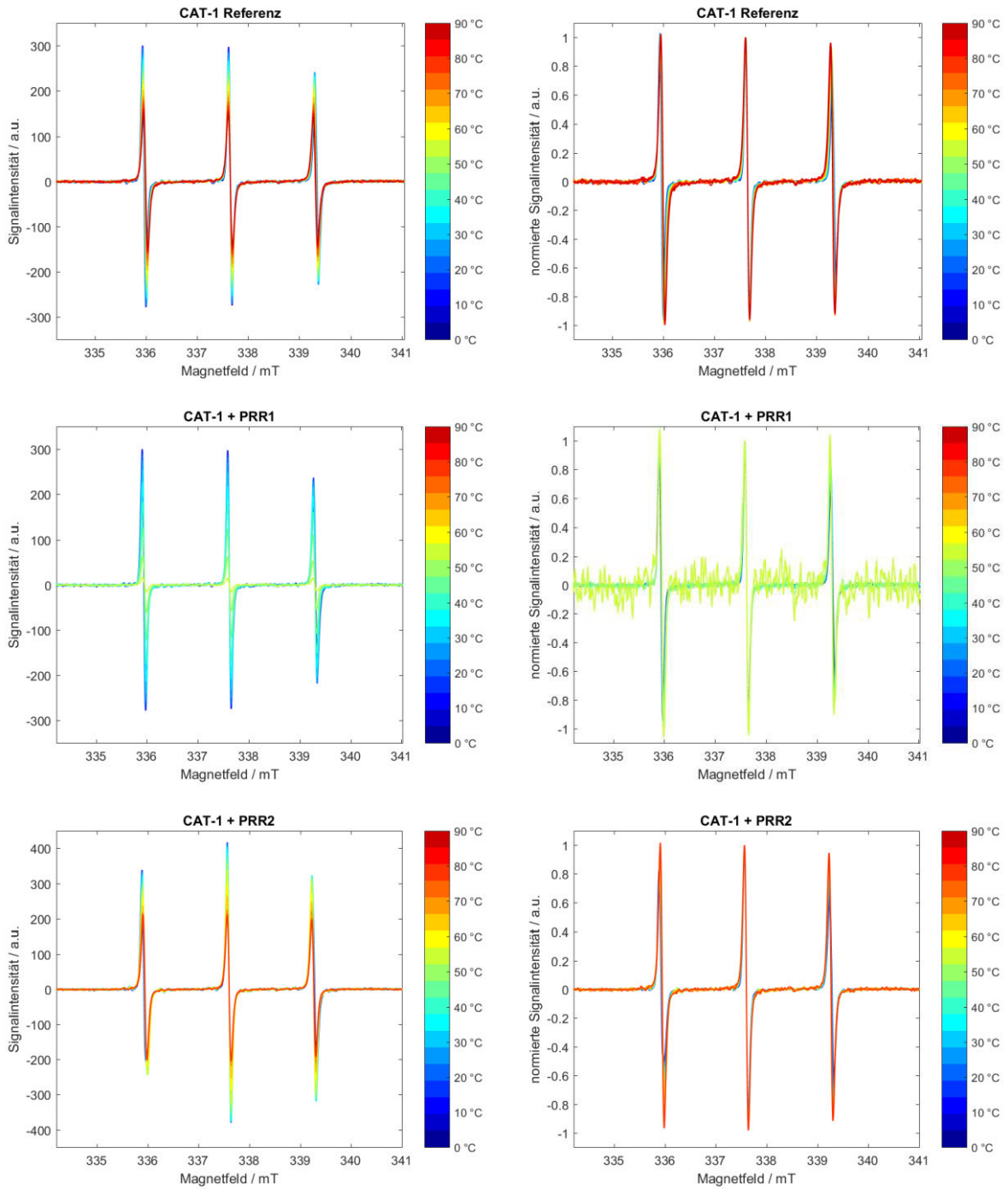


Abbildung A.17: Darstellung der gemessenen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für die Spinsonde TOAC mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.

A.3.3. Ligand: Cat-1 als negativ geladener Ligand

EPR-spektroskopische Untersuchung der Ligandenbindungskapazität

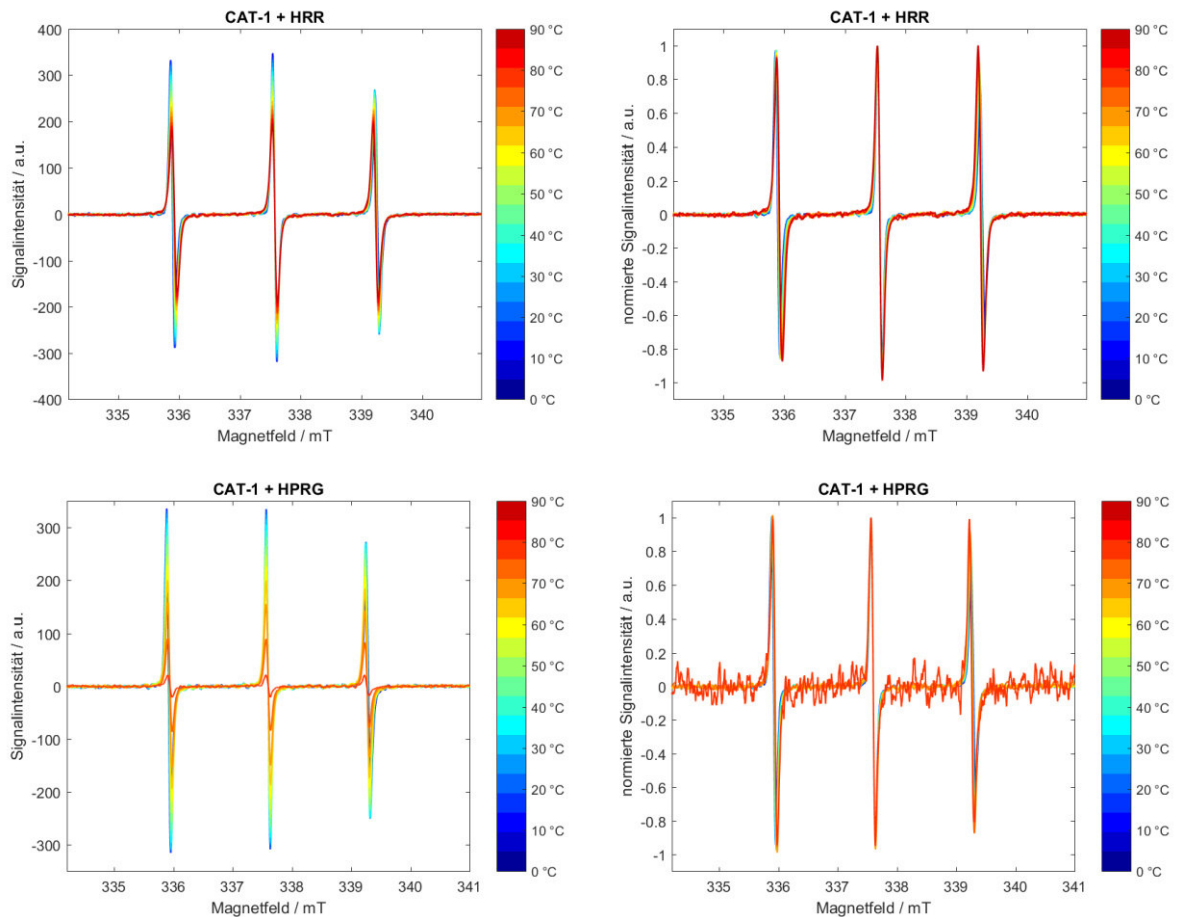


Abbildung A.18: cw-X-Band-EPR-Spektren von der 17-fach deuterisierten Spinsonde CAT-1 mit HPRG und den Peptiden des HPRGs in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.

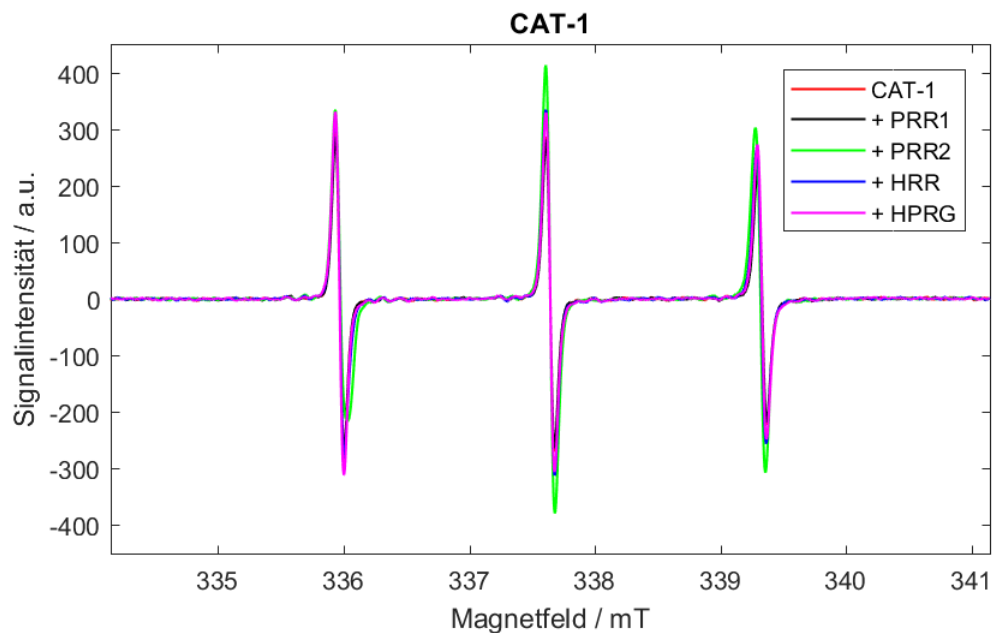


Abbildung A.19: cw-X-Band-EPR-Spektren von der 17-fach deuterisierte Spinsonde CAT-1 mit HPRG und den Peptiden des HPRGs bei 20 °C.

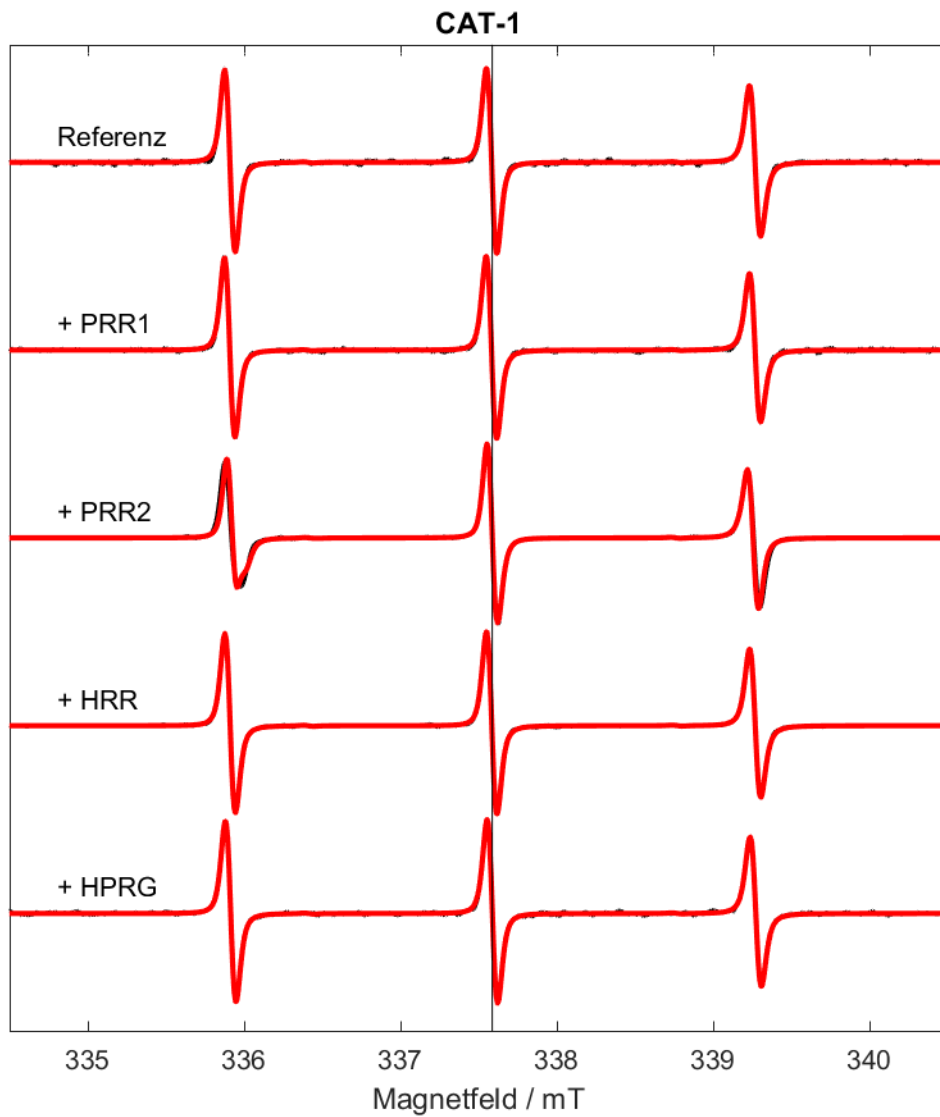
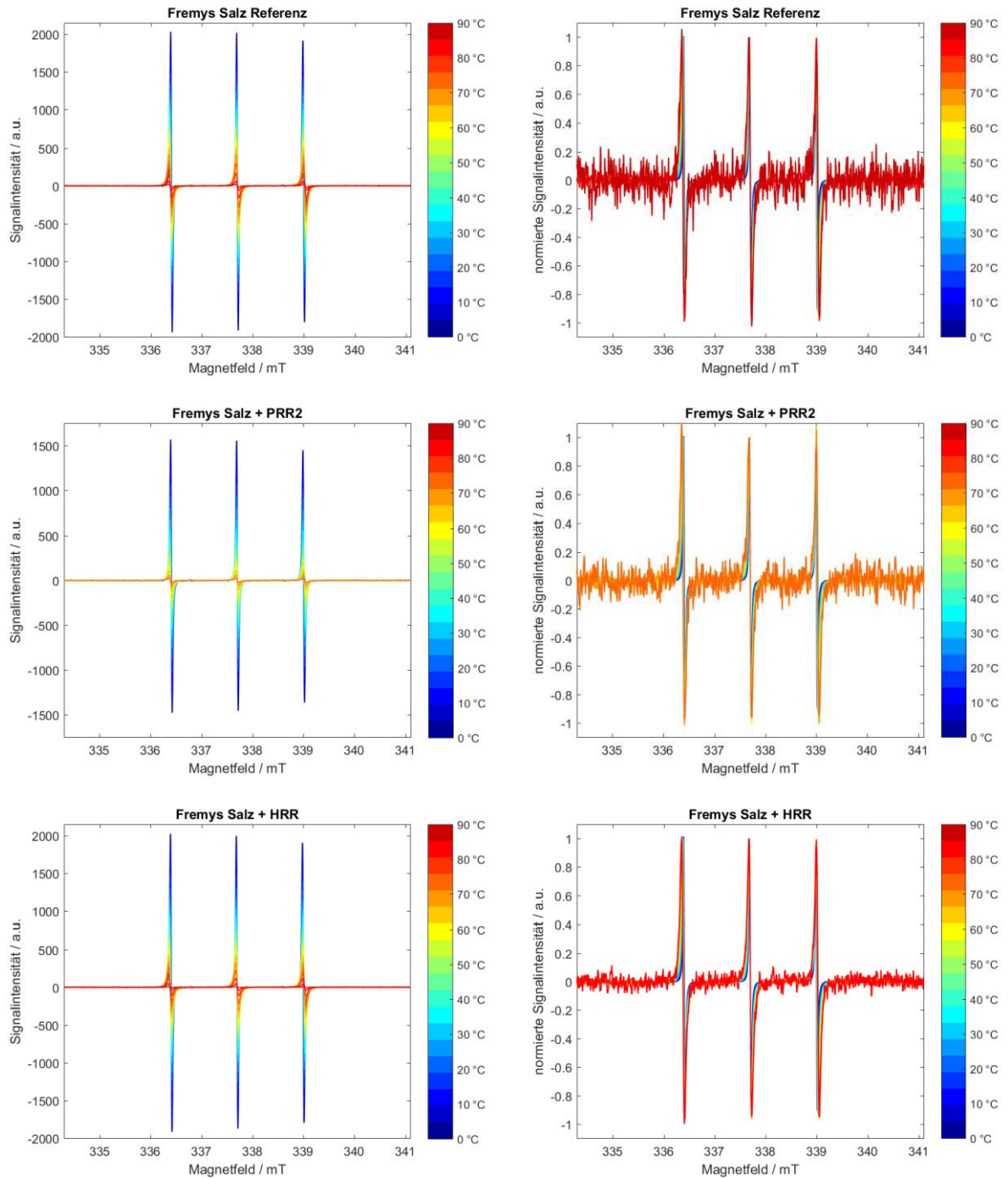


Abbildung A.20: Darstellung der gemessenen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für die 17-fach deuterisierte Spinsonde CAT-1 mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C

A.3.4. Ligand: Fremys Salz als positiv geladener Ligand



Anhang

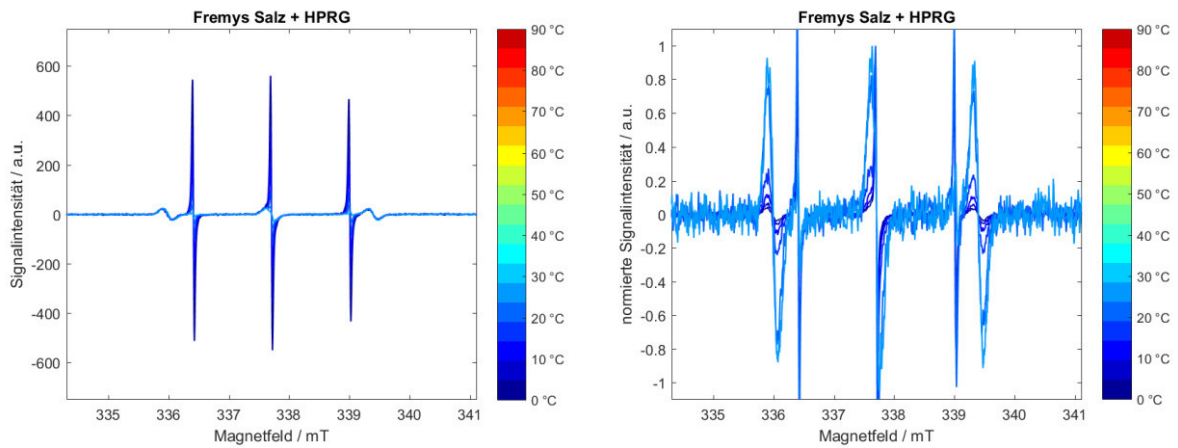


Abbildung A.21: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde Fremys Salz mit HPRG und den Peptiden des HPRGs (mit Ausnahme von PRR1) in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.

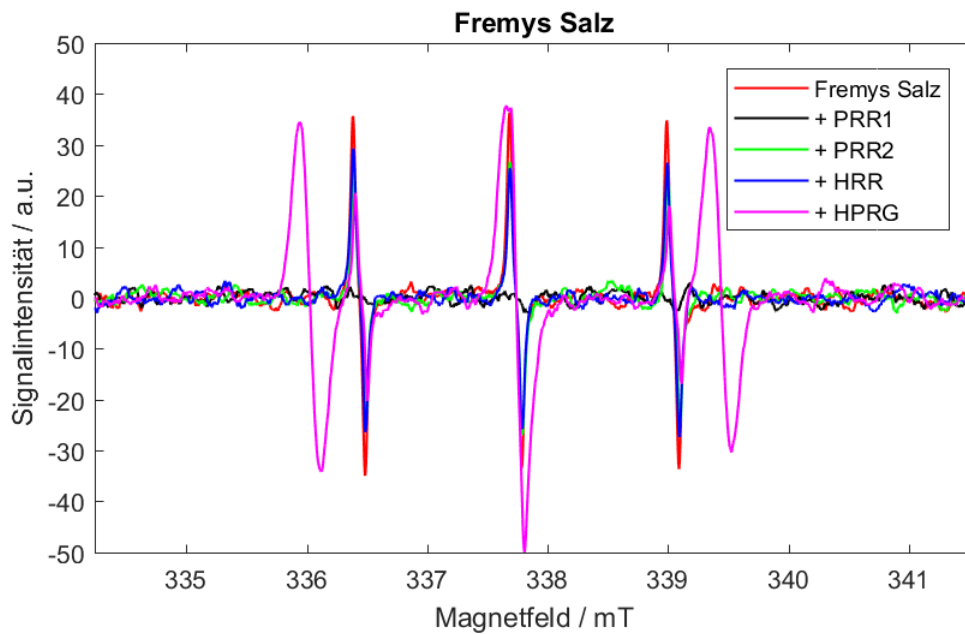


Abbildung A.22: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde Fremys Salz mit HPRG und den Peptiden des HPRGs bei 20 °C.

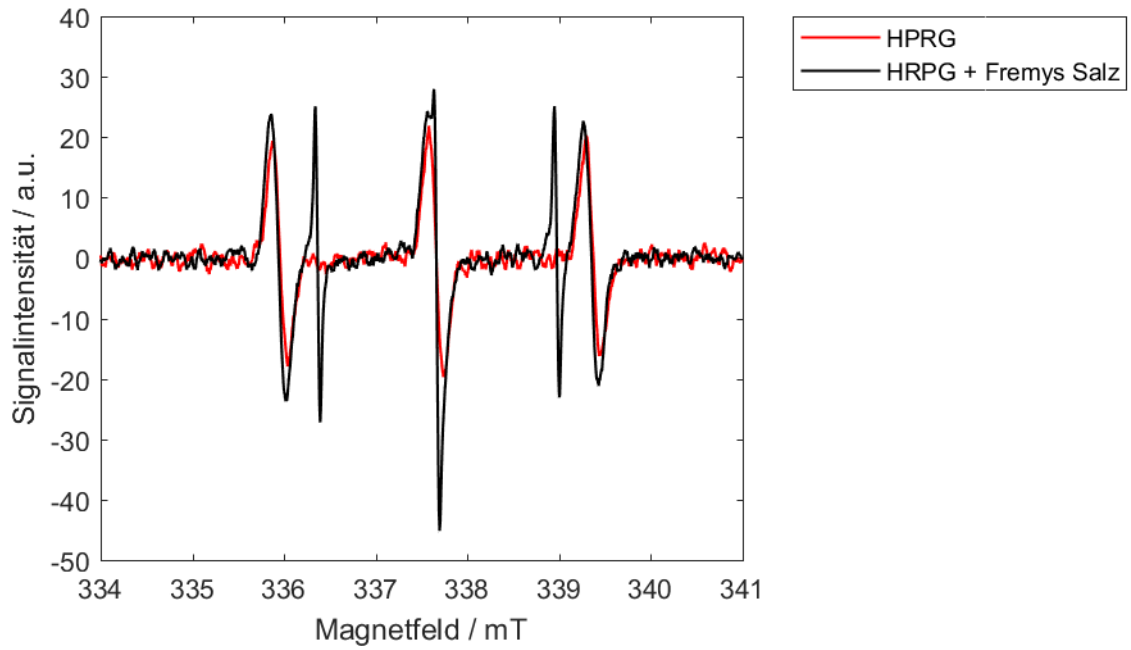


Abbildung A.23: cw-EPR-Spektren von 250 μM radikalischem HPRG und 250 μM radikalischem HPRG mit der Zugabe von 50 μM Fremys Salz. Man erkennt, dass die Signalintensitäten des radikalischen HPRGs bei der Zugabe von Fremys Salz leicht ansteigen.

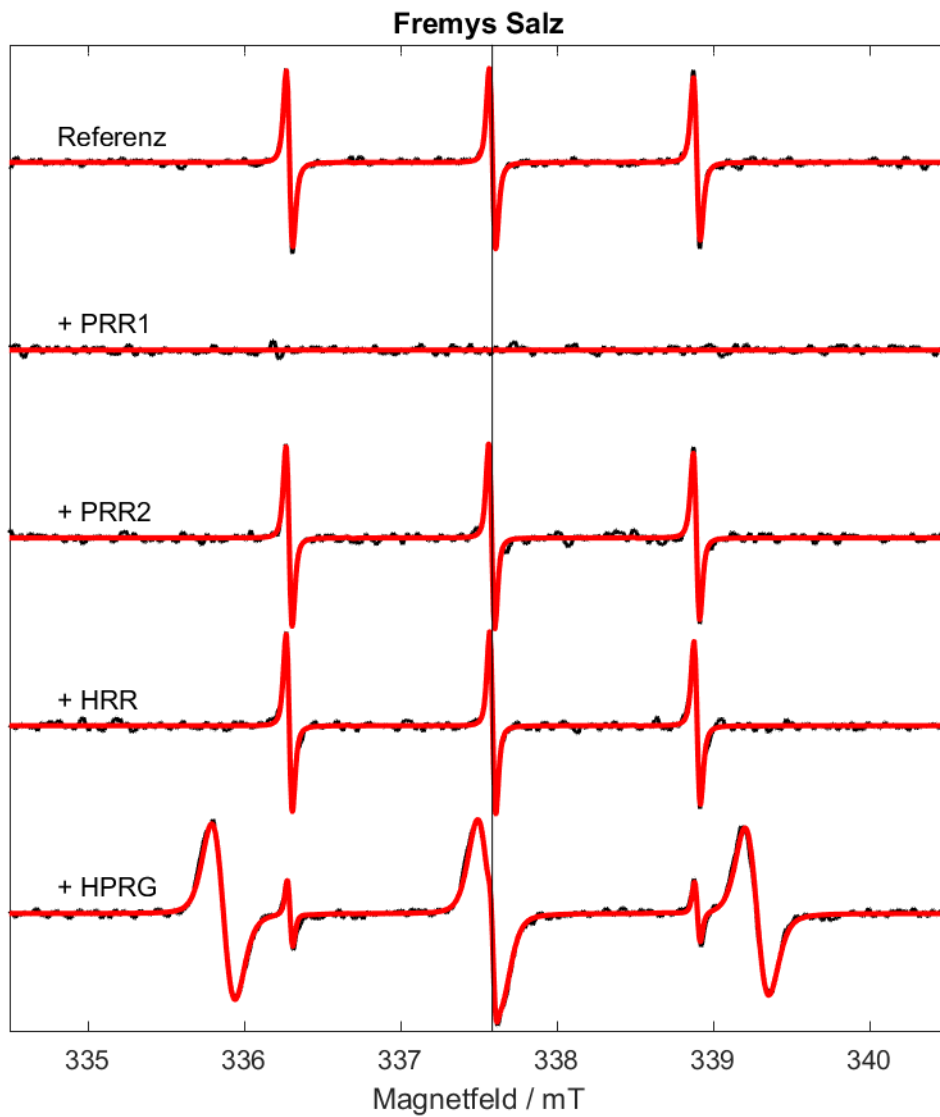


Abbildung A.24: Darstellung der gemessenen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für die Spinsonde Fremys Salz mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.

A.3.5. Labeln mittels MTSSL

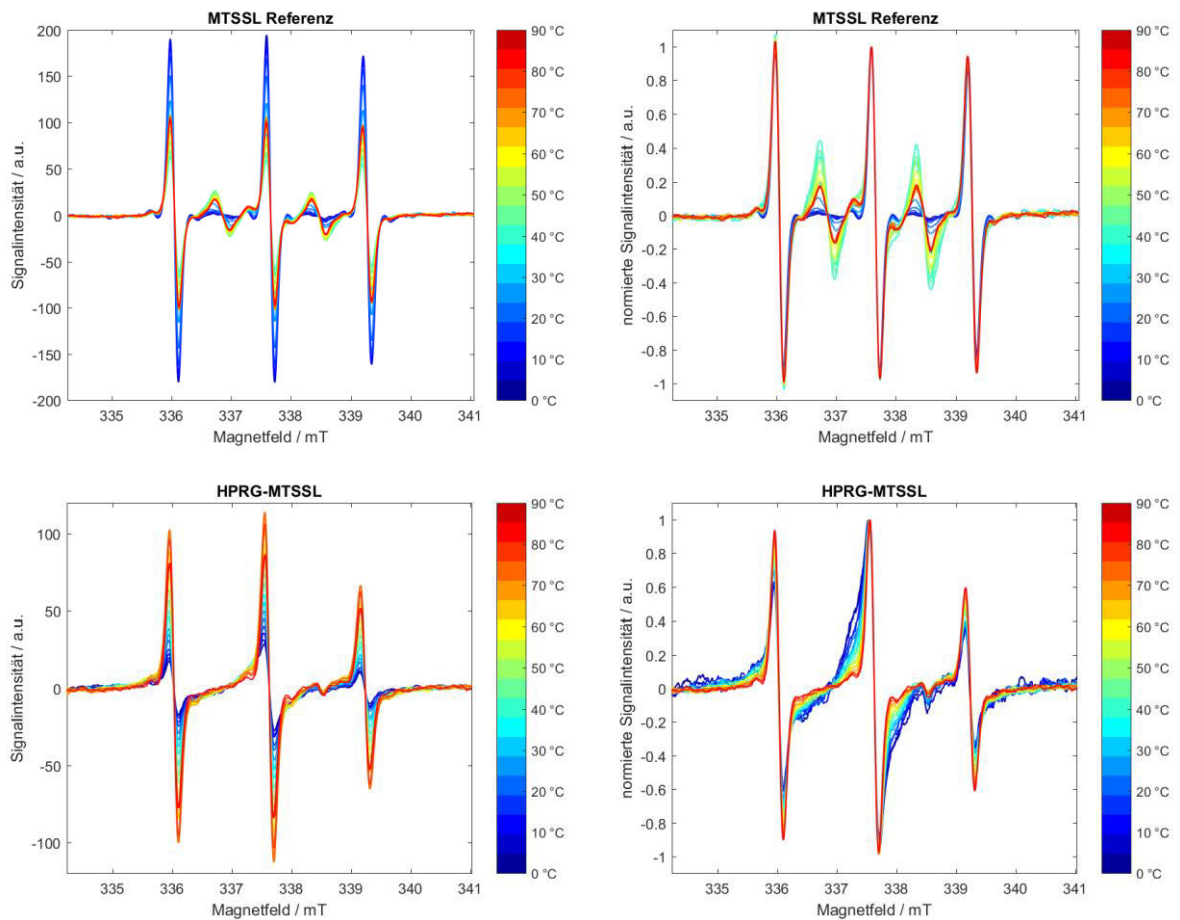


Abbildung A.25: cw-X-Band-EPR-Spektren von MTSSL und dem mit MTSSL gelabelten HPRG in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.

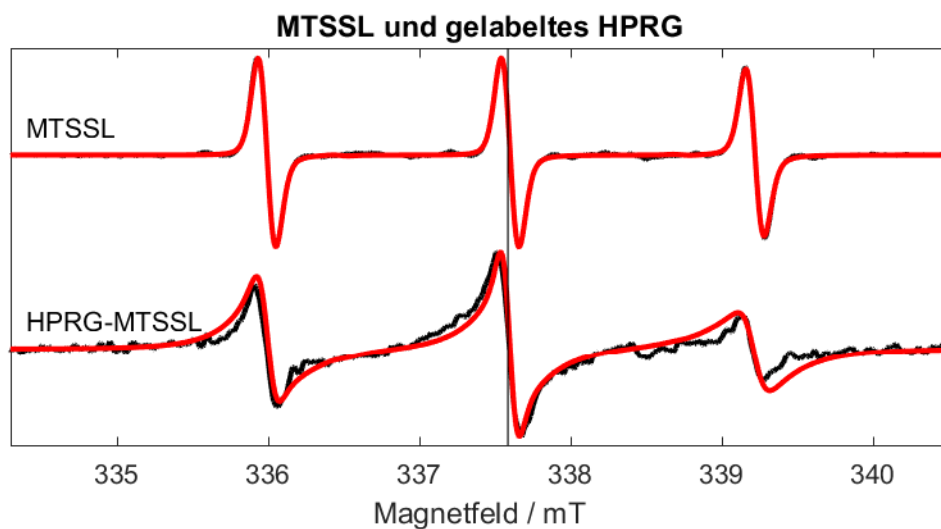


Abbildung A.26: Darstellung der gemessenen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für MTSSL und an HPRG kovalent gebundenes MTSSL für die Messung bei 20 °C

A.4. pH-abhängiges Lösungsverhalten des HPRGs

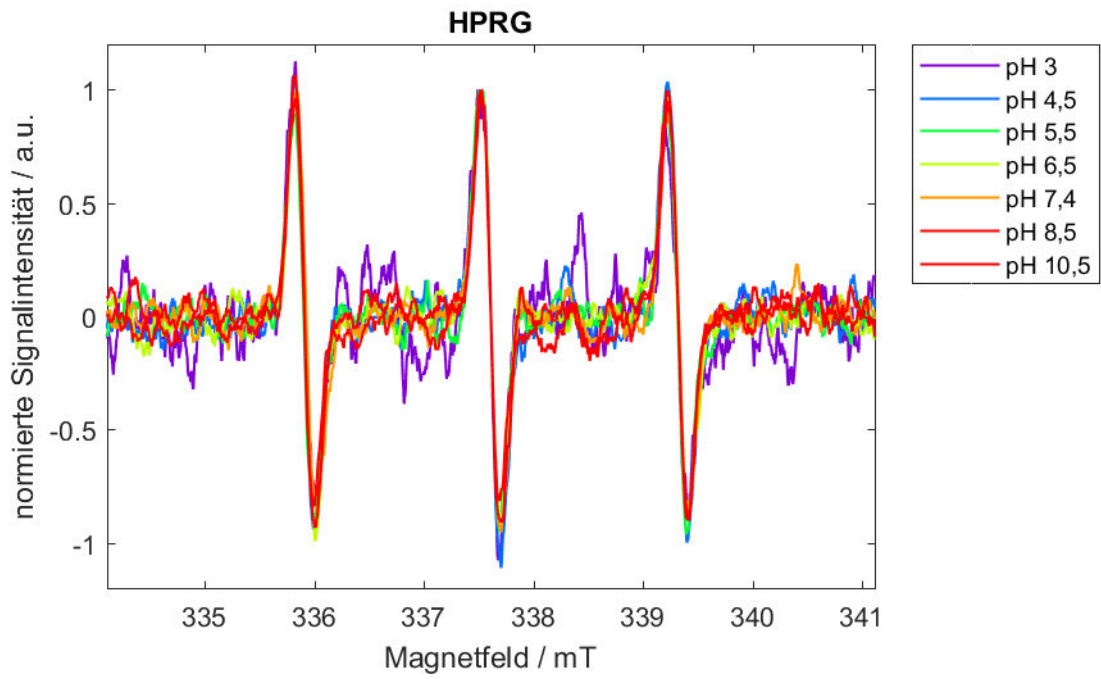


Abbildung A.27: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von 250 μM HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 20 °C.

A.5. EPR-spektroskopische Untersuchung der Kupferbindung

A.5.1. Protein:Kupfer-Verhältnis 1:2

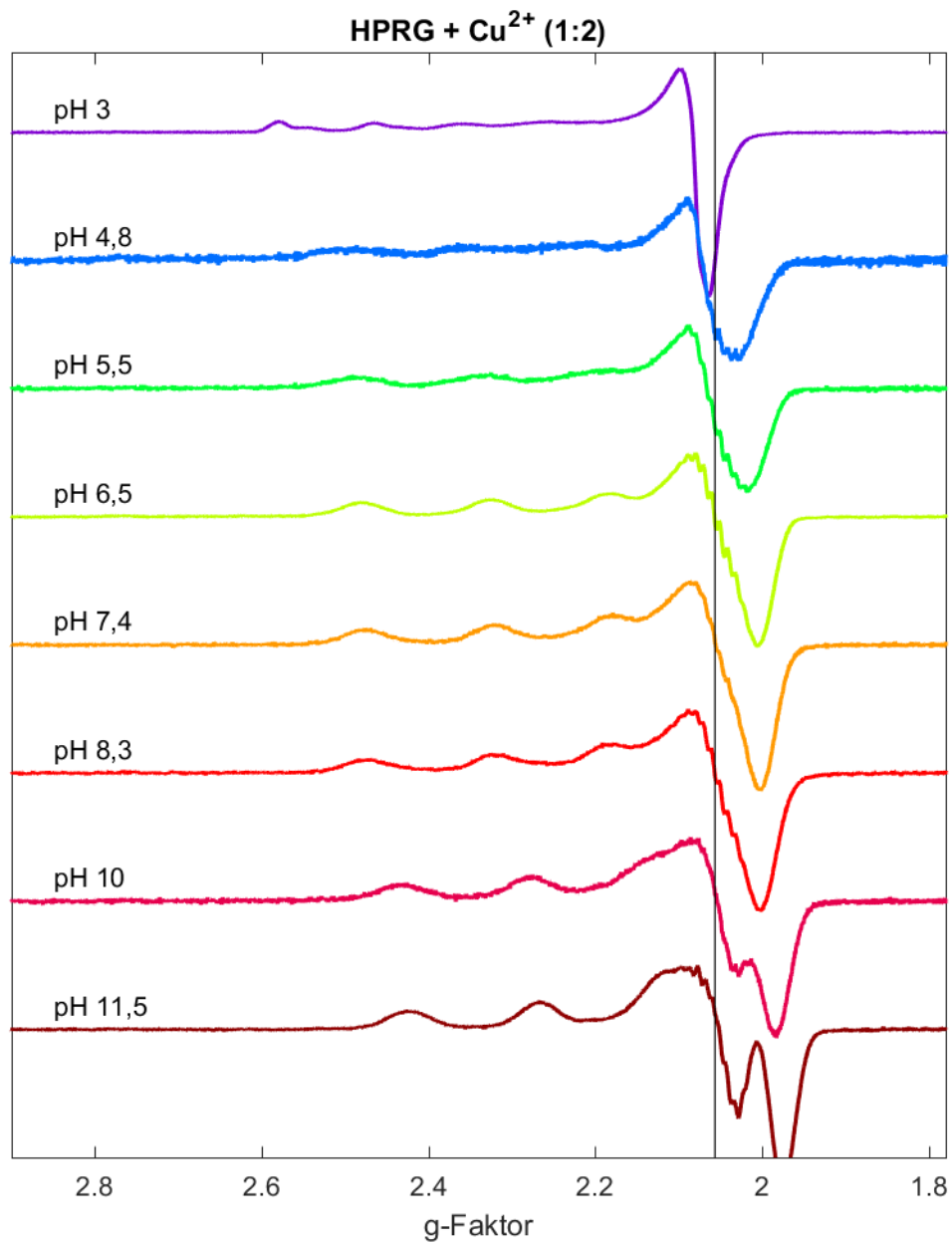


Abbildung A.28: g-Wert-aufgetragene cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:2 in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K. Die schwarze Linie kennzeichnet g_{xy} für die Probe bei pH 7,4.

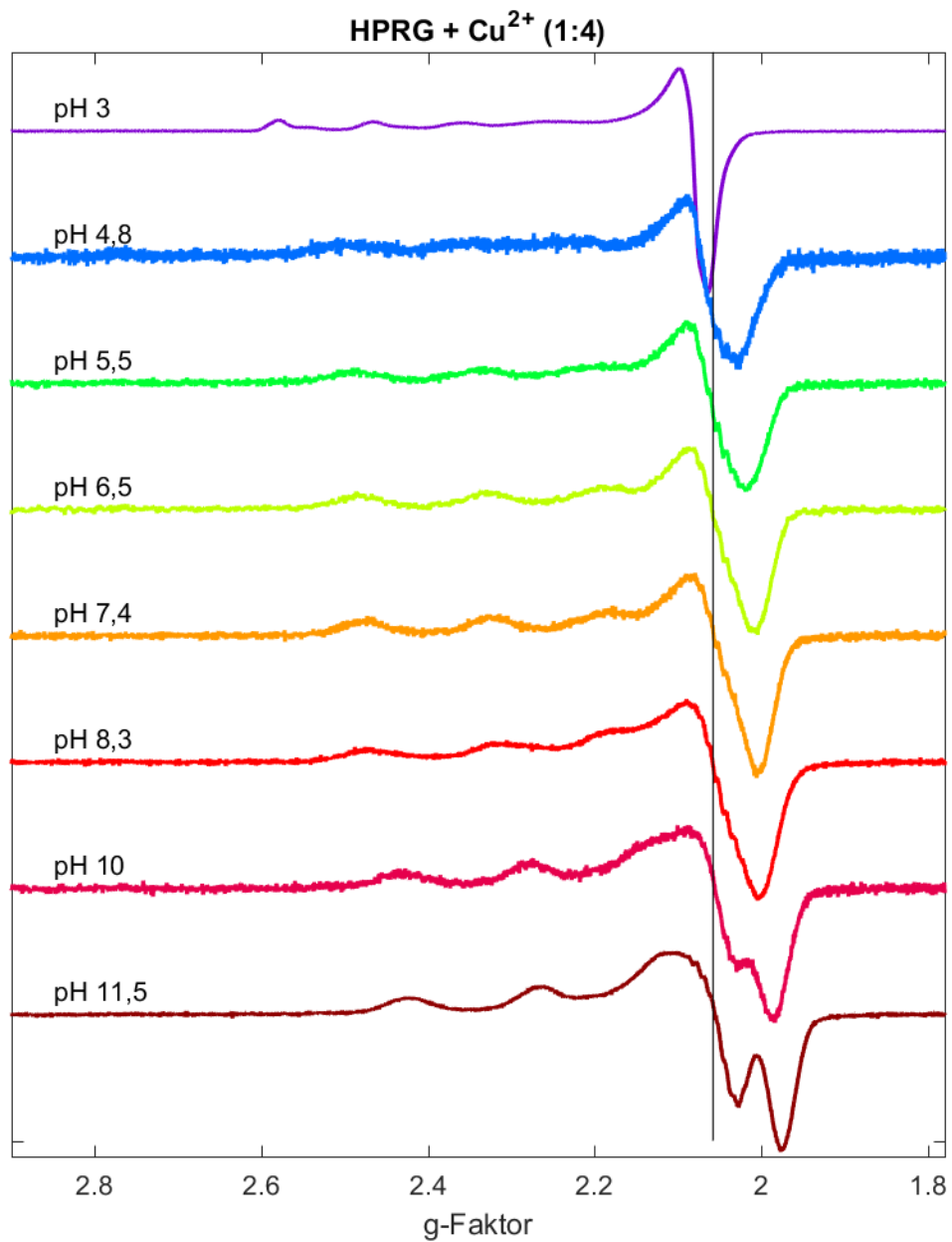
A.5.2. Protein:Kupfer-Verhältnis 1:4

Abbildung A.29: g-Wert-aufgetragene cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:4 in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K. Die schwarze Linie kennzeichnet $g_{x/y}$ für die Probe bei pH 7,4.

A.5.3. Protein:Kupfer-Verhältnis 1:7

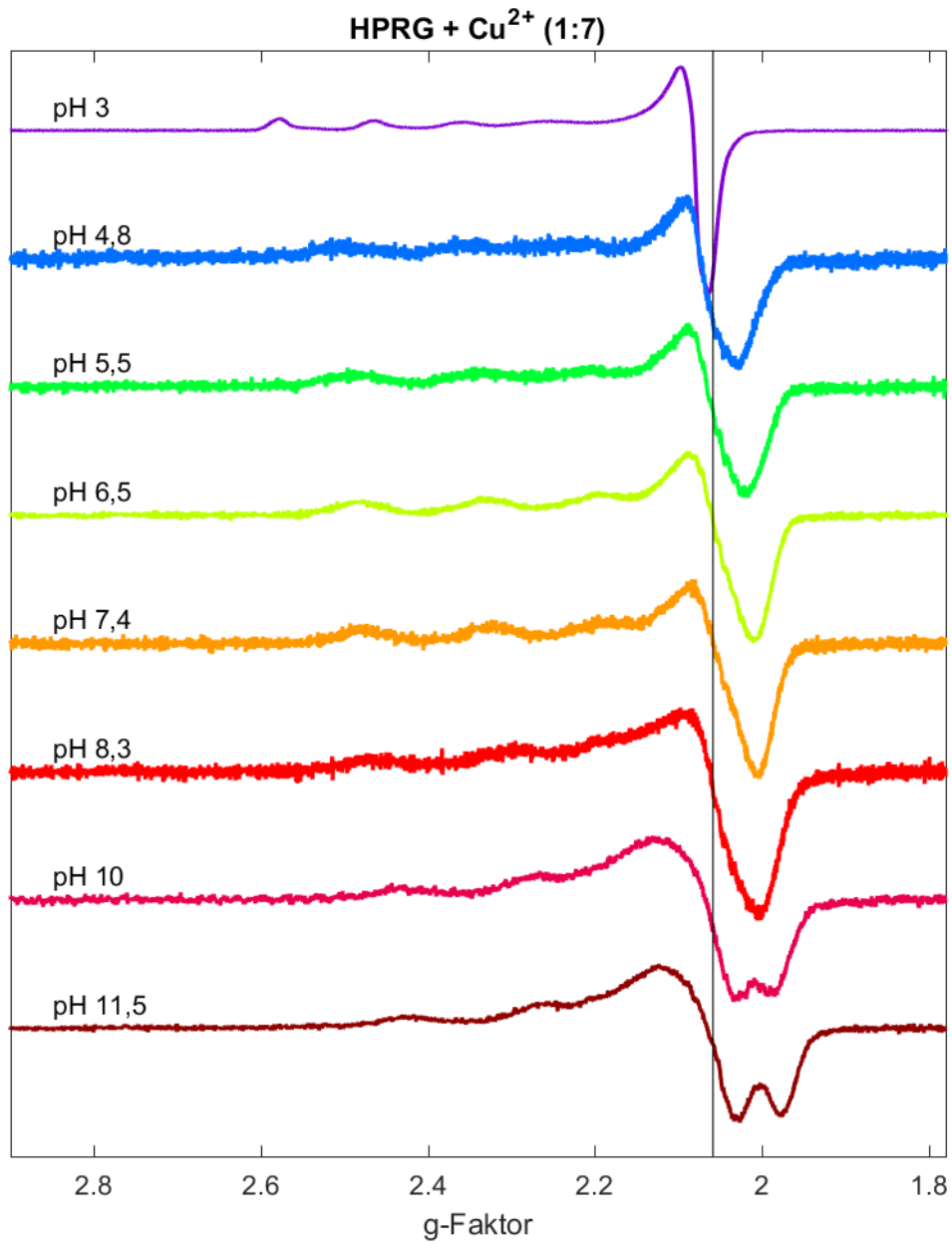


Abbildung A.30: g-Wert-aufgetragene cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:7 in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K. Die schwarze Linie kennzeichnet $g_{x/y}$ für die Probe bei pH 7,4.

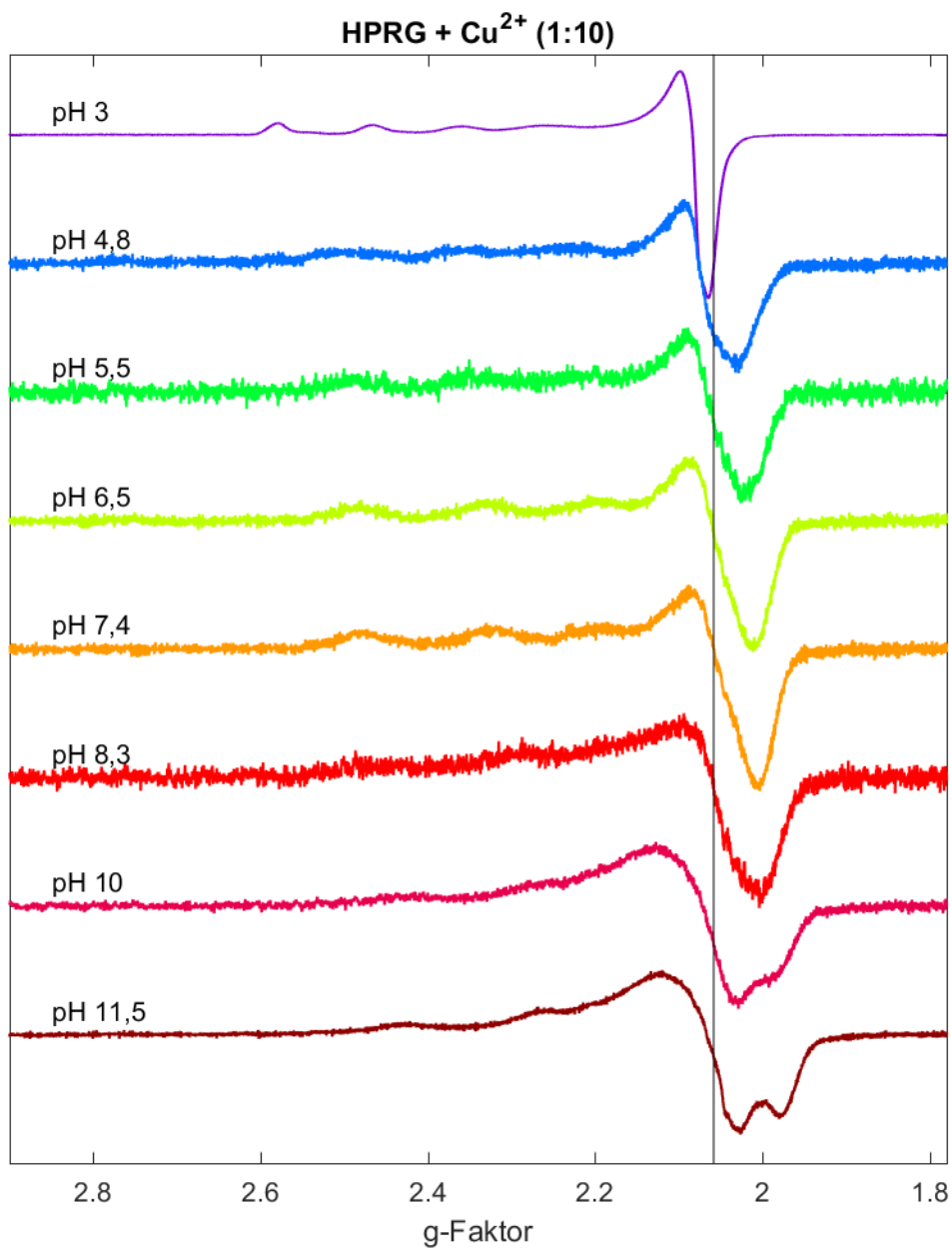
A.5.4. Protein:Kupfer-Verhältnis 1:10

Abbildung A.31: g-Wert-aufgetragene cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:10 in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K. Die schwarze Linie kennzeichnet $g_{x/y}$ für die Probe bei pH 7,4.

A.5.5. Referenz: Kupfer in Puffer bei verschiedenen pH-Werten

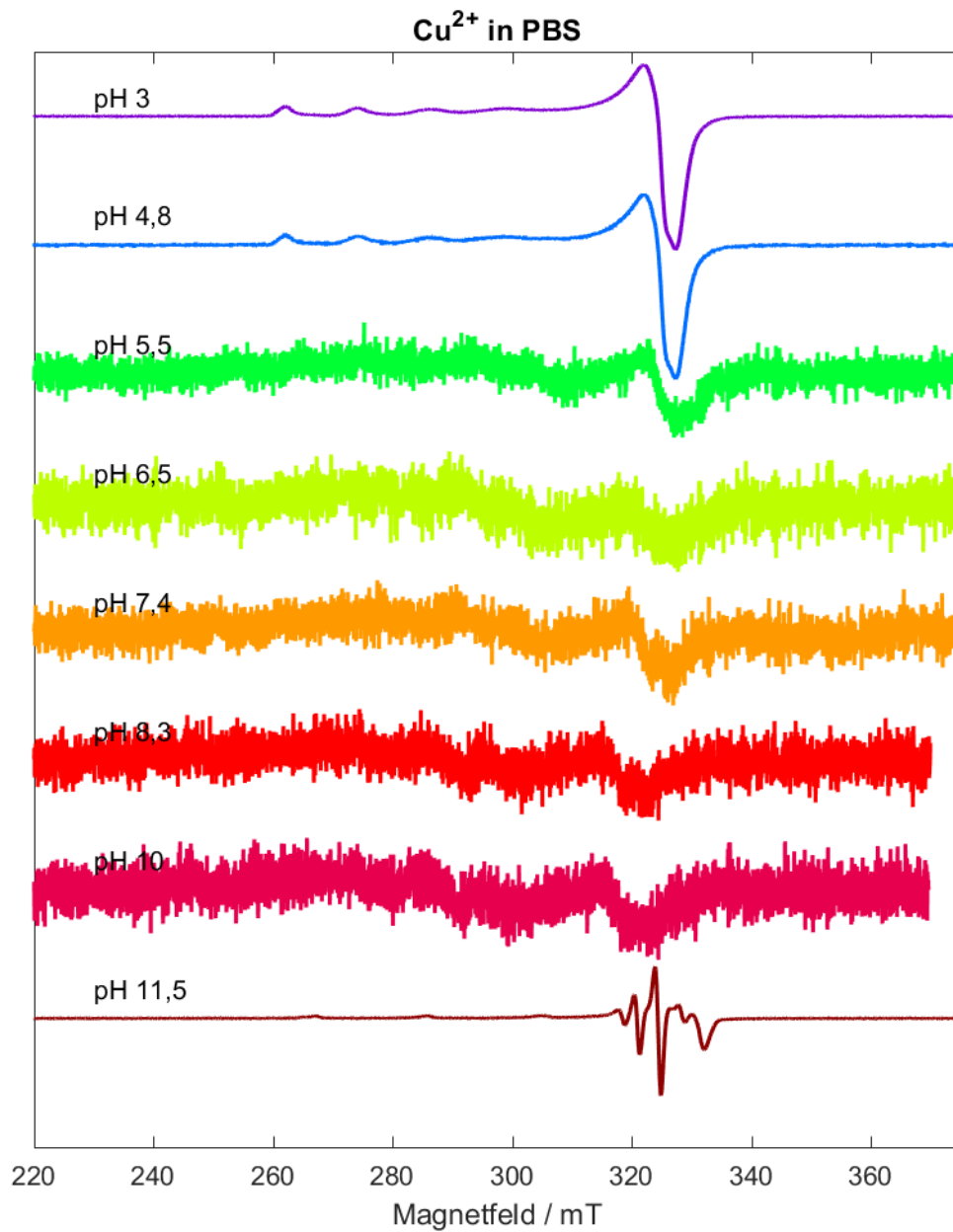


Abbildung A.32: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von 2 mM Kupfer in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.

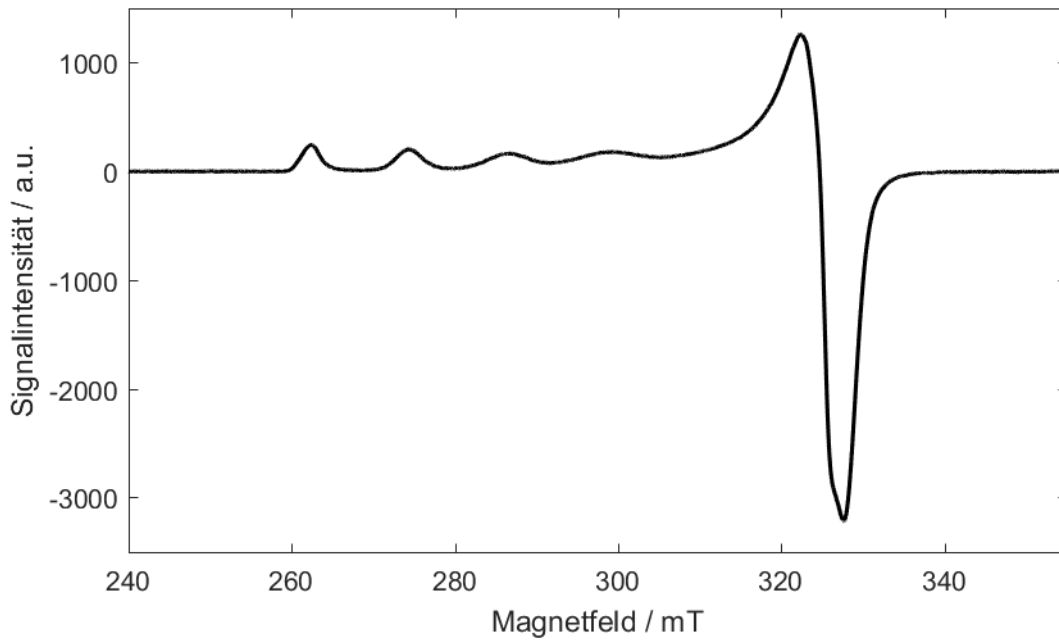
A.5.6. Darstellung der EPR-Referenzspektren von Kupfer in Wasser

Abbildung A.33: cw-EPR-Spektrum von Kupfer(II) in Wasser bei 77 K.

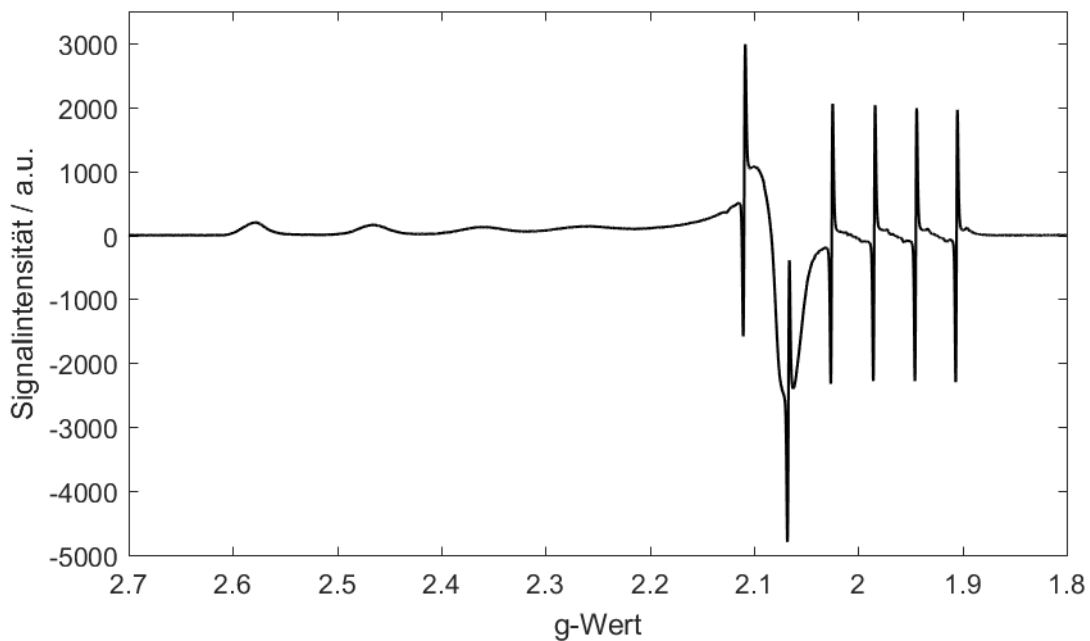


Abbildung A.34: cw-EPR-Spektrum von Kupfer(II) in Wasser bei 77 K unter Verwendung des Manganstandards zur Ermittlung der g-Werte.

A.5.7. Darstellung der pH-abhängigen Signalamplituden der HPRG:Kupfer-Proben

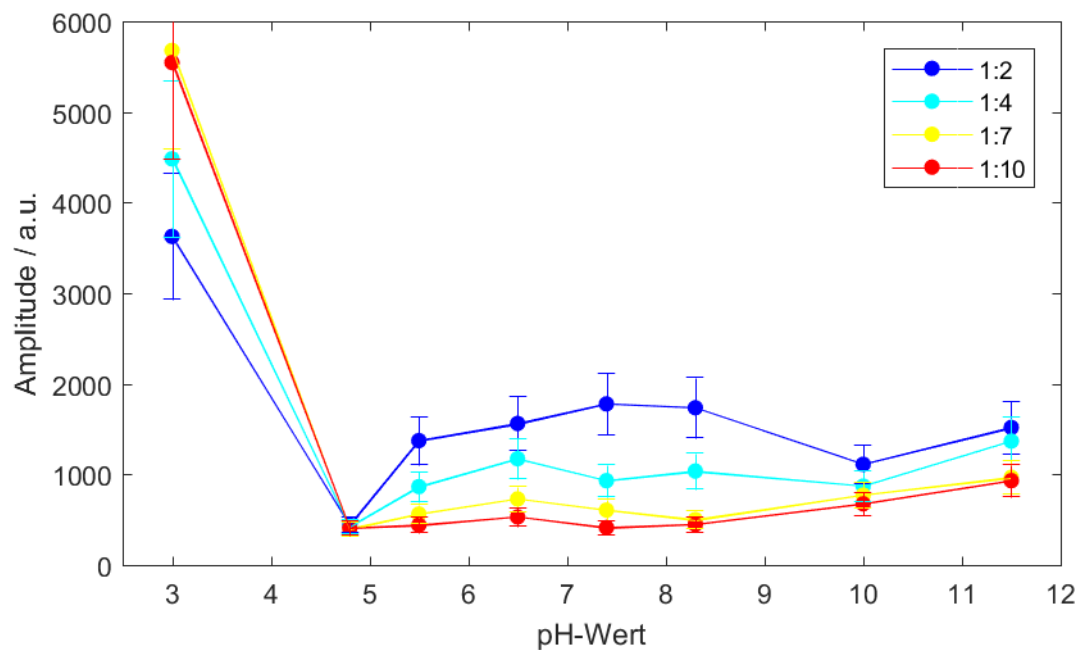


Abbildung A.35: Darstellung der Signalamplituden im Bereich von $g_{x/y}$ der cw-X-Band EPR-Spektren von HPRG:Kupfer über die verschiedenen pH-Werte bei verschiedenen Protein:Kupfer-Verhältnissen.

A.5.8. Darstellung der pH-abhängigen Doppelintegrale der HPRG:Kupfer-Proben

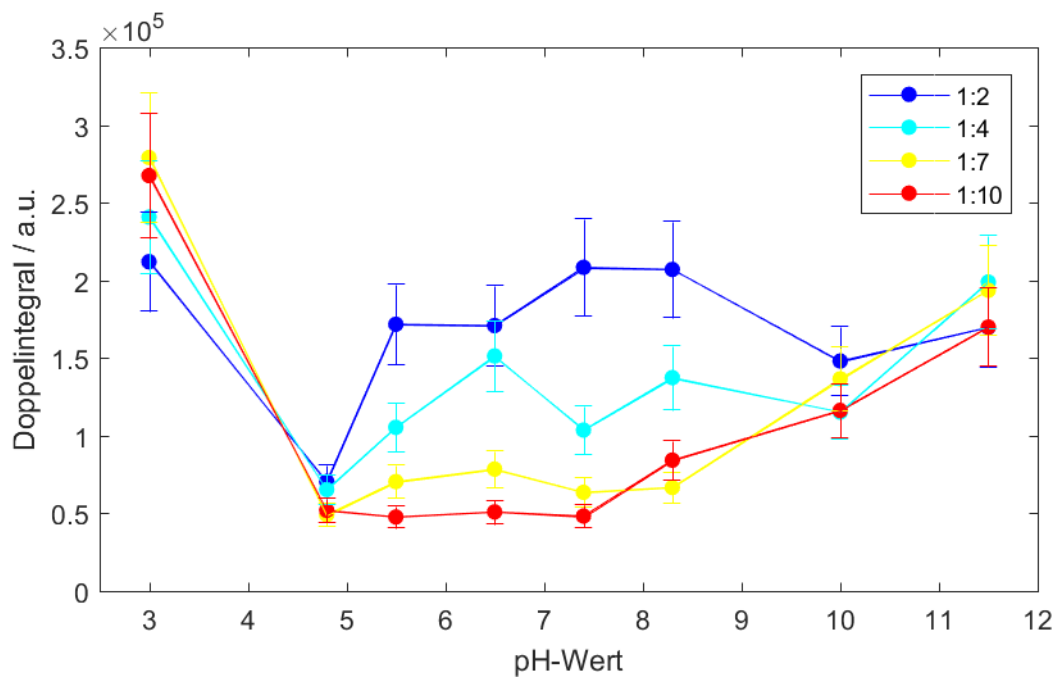


Abbildung A.36: Darstellung der Doppelintegrale der cw-X-Band EPR-Spektren von HPRG:Kupfer über die verschiedenen pH-Werte bei verschiedenen Protein:Kupfer-Verhältnissen.

A.5.9. Darstellung der pH-Abhängigkeit der $g_{x/y}$ -Werte der HPRG:Kupfer-Proben

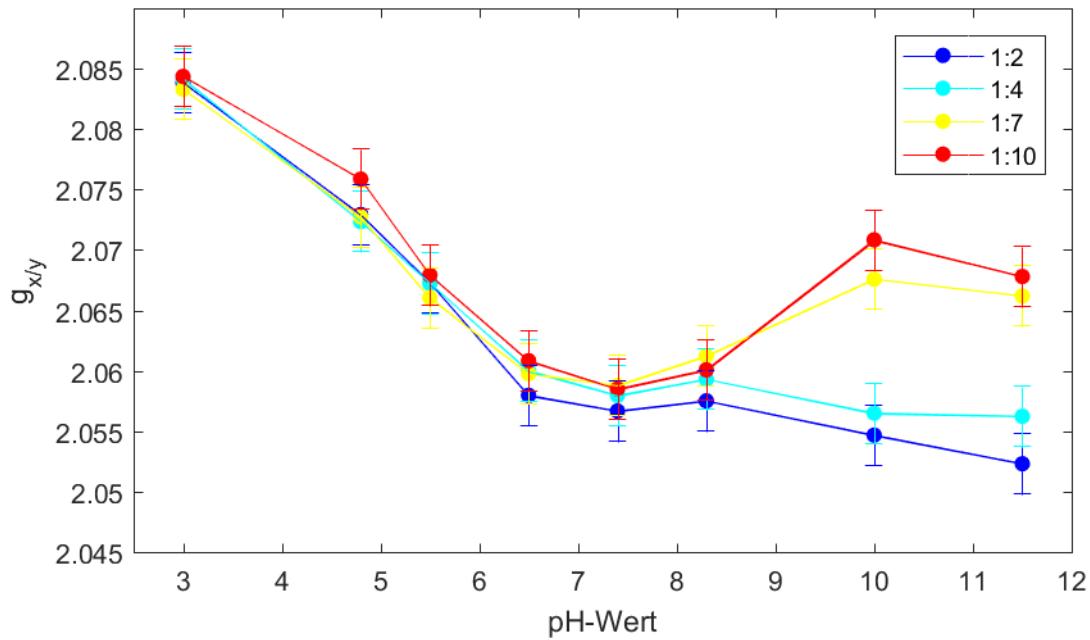


Abbildung A.37: Darstellung der ausgelesenen $g_{x/y}$ -Werte der cw-X-Band EPR-Spektren von HPRG:Kupfer über die verschiedenen pH-Werte bei verschiedenen Protein:Kupfer-Verhältnissen.

A.5.10. Darstellung der Transmissionsmessung der Peptid:Kupfer-Proben

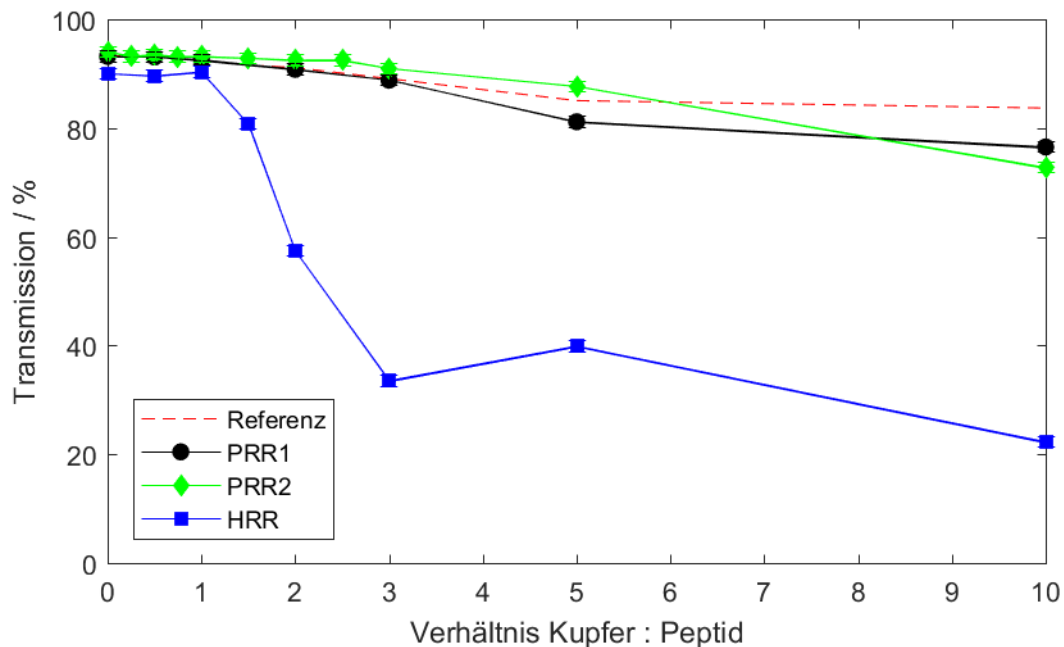


Abbildung A.38: Darstellung der Transmission von Peptid:Kupfer-Proben bei pH 7,4 in PBS-Puffer. Als Referenz dient die entsprechende Kupferkonzentration ohne Peptidanwesenheit in PBS-Puffer.

B. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aminosäuresequenz von rbHPRG ohne Berücksichtigung des Signalpeptids (GenBank-Nummer: XP_008264798.1).....	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen von rbHPRG (oben) und hHPRG (unten) mit den Zahlen als Aminosäurenummerierung und den ausgebildeten Disulfidbrückenbindungen und den freien Cysteinen in orange gekennzeichnet (adaptiert nach ^[14]).	2
Abbildung 1.3: Vergleich der Aminosäuresequenzabfolge in der HRR von rbHPRG (Genbank-Nummer: XP_008264798.1), hHPRG (Genbank-Nummer: AAI50592.1) und bHPRG (GenBank-Nummer: BAB33091.1).	3
Abbildung 1.4: Mögliche Strukturen des Glykosilierungsmusters des rbHPRGs (adaptiert von ^[25]).	4
Abbildung 1.5: Darstellung von hHPRG mit den Bindungsregionen verschiedener Liganden (adaptiert von ^[26]).	7
Abbildung 2.1: Aufspaltung der Energielevel von einem Elektron für ein Spin-System $S = 1/2$ im homogenen Magnetfeld.	13
Abbildung 2.2: Chemische Strukturen von typischen Nitroxid-Radikalen.	18
Abbildung 2.3: Allgemeine Struktur eines Nitroxid-Radikals (z.B.: TEMPO mit $R=H$) mit den Hauptachsen des Koordinatensystems.	18
Abbildung 2.4: Energie-Diagramm für ein Spin-System mit $S = 1/2$ und $I = 1$ mit den einzelnen Energiebeiträgen der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung (EZ), Kern-Zeeman-Wechselwirkung (NZ) und Hyperfeinwechselwirkung (HF) (adaptiert von ^[91]).	19
Abbildung 2.5: Einfluss der Polarität auf die Lokalisation des Radikals bei einer Nitroxidsonde.	20
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Einflusses der Polarität auf die Spektrenform.	20
Abbildung 2.7: Energie-Diagramm für ein Spin-System $S = 1/2$ und $I = 3/2$ (adaptiert nach ^[97]).	21
Abbildung 2.8: Orientierung eines Typ2-Kupfer(II)-Komplexes.	22
Abbildung 2.9: cw-X-Band-Kupferspektrum eines oktaedrisch-verzerrten Kupfer(II)-Komplexes mit Kennzeichnung des axialen und äquatorialen Bereichs im Spektrum.....	22
Abbildung 2.10: Schematischer Aufbau eines cw-Spektrometers (adaptiert nach ^[103,104]). ...	23
Abbildung 2.11: Signaldetektion durch Verwendung einer Modulationswelle (adaptiert nach ^[106]).	24
Abbildung 2.12: Pulssequenz zur Entstehung des Primärechos durch die Pulssequenz $(\pi/2)-\tau-(\pi)-\tau$ (A) und die Magnetisierung in Vektorschreibweise an verschiedenen Positionen der Sequenz (B).	25

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.13: Pulssequenz eines 2-Puls-ESSEM-Esperimentes (A) und eines 3-Puls-ESEEM-Experimentes (B).	26
Abbildung 2.14: Jablonski-Termschema zur Verdeutlichung von Prozessen mit Photonenabsorption und Photonenemission (adaptiert von ^[123]).	30
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Bindung der Histidin-Seitenketten an eine mit Nickel beladene Affinitätsäule (adaptiert nach ^[133]).	33
Abbildung 3.2: Elutionsprofil der Aufreinigung mittels Co(II)-Affinitätschromatographie und Elution mit einem Imidazolhaltigen Puffer.	34
Abbildung 3.3: SDS-PAGE mit einem 10 % Trenngel unter nicht-reduzierenden Bedingungen der Fraktionen der Co(II)-Affinitätschromatographie mit Marker (M) und bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenz.	35
Abbildung 3.4: Ladungs-pH-Diagramm für HPRG und Albumin.	36
Abbildung 3.5: Elutionsprofil der Aufreinigung mittels Kationenaustauscher und Elution mit einem Natriumchlorid-Salzgradienten.	37
Abbildung 3.6: SDS-PAGE mit einem 10 % Trenngel unter nicht-reduzierenden Bedingungen der Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie mit Marker (M) und bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenz.	38
Abbildung 3.7: SDS-PAGE mit einem 12 % Trenngel unter nicht-reduzierenden Bedingungen der einzelnen Aufreinigungsschritte.	39
Abbildung 3.8: cw-X-Band Messung des reinen HPRGs in PBS pH 7,4.	42
Abbildung 3.9: Gegenüberstellung des HPRG-Radikals mit verschiedenen Nitroxidsonden in PBS pH 7.4.	43
Abbildung 3.10: Darstellung des normierten EPR-Spektrums von reinem HPRG in PBS-Puffer (links) und die exemplarisch vergrößerte Darstellung des Zentralfeldsignals mit Markierung der sicheren Aufspaltungen (rot) und der weiteren, mögliche Aufspaltungen (rosa) (rechts).	44
Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des Aufspaltungsmusters durch einen $I=1$ -Kern mit der Hyperfeinaufspaltung A_N und der unaufgelösten Hyperfeinwechselwirkung durch drei nicht-äquivalente $I=1/2$ -Kerne mit unterschiedlicher Hyperfeinkopplungskonstante $A_{1/2,i}$, wobei gilt: $A_N > A_{1/2,i}$ und weiterhin $A_{1/2,1} > A_{1/2,2} > A_{1/2,3}$. Zur vereinfachten Darstellung ist die Aufspaltung nur für ein Signal des $I=1$ -Kerns gezeigt.	45
Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Aufspaltungsmusters durch einen $I=1$ -Kern mit der Hyperfeinaufspaltung A_N und der unaufgelösten Hyperfeinwechselwirkung durch äquivalente $I=1/2$ -Kerne mit identischer Hyperfeinkopplungskonstante $A_{1/2}$, wobei $A_N > A_{1/2}$	46
Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des Ablaufs der <i>Fenton</i> -Reaktion (adaptiert nach ^[159]).	48
Abbildung 3.14: Amplitudennormierte cw-EPR-Spektren des radikalischen HPRG unter verschiedenen Bedingungen in PBS pH 7,4.	50

Abbildung 3.15: Amplitudennormierte cw-EPR-Spektren von TEMPO unter verschiedenen Bedingungen in PBS pH 7,4.	50
Abbildung 3.16: Einfluss von Nitroxiden auf die <i>Fenton</i> -Reaktion (Kreis) (adaptiert nach ^[164]).	52
Abbildung 3.17: Amplitudennormierte cw-EPR-Spektren das mit Ascorbinsäure reduzierten HPRGs unter verschiedenen Bedingungen in PBS pH 7,4.....	54
Abbildung 3.18: Amplitudennormierte cw-EPR-Spektren von mit Ascorbinsäure reduzierten TEMPO unter verschiedenen Bedingungen in PBS pH 7,4.	54
Abbildung 3.19: Einfluss von Nitroxiden auf die <i>Fenton</i> -Reaktion (Kreis) bei Anwesenheit von Ascorbinsäure (adaptiert nach ^[164] und ergänzt nach ^[173]).	56
Abbildung 3.20: Amplitudennormierte EPR-Spektren des radikalischen HPRGs bei der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 419 nm über einen Zeitraum von 15 h in PBS pH 7,4.	58
Abbildung 3.21: Amplitudennormierte EPR-Spektren von TEMPO bei der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 419 nm über einen Zeitraum von 15 h in PBS pH 7,4.	58
Abbildung 3.22: Zusammenfassung der Effekte verschiedener Reaktionsbedingungen auf TEMPO und auf das HPRG-Radikal.	61
Abbildung 3.23: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 5-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.	62
Abbildung 3.24: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 16-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.	65
Abbildung 3.25: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde TOAC mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.	67
Abbildung 3.26: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der 17-fach deuterisierten Spinsonde CAT-1 mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.	69
Abbildung 3.27: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde Fremys Salz mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.	70
Abbildung 3.28: cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG und ¹⁵ N-markiertem Fremys Salz.	72
Abbildung 3.29: Reaktion zum Labeling von der Thiolgruppe eines Cysteins mit MTSSL.	72
Abbildung 3.30: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde MTSSL und dem mit MTSSL-gelabelten HPRG.	74
Abbildung 3.31: SDS-PAGE mit einem 10 % Trenngel unter nicht-reduzierenden Bedingungen von HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten mit Marker (M) und bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenz. Das Gel wurde nach einem Tag Inkubation im jeweiligen Puffer angefertigt.	79
Abbildung 3.32: SDS-PAGE mit einem 10 % Trenngel unter nicht-reduzierenden Bedingungen von HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten mit Marker (M) und bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenz. Das Gel wurde nach drei Wochen Inkubation im jeweiligen Puffer angefertigt.	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.33: cw-X-Band-EPR-Spektren von 250 μM HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 20 °C.....	81
Abbildung 3.34: Fluoreszenz-Emissionsspektren von 12,5 μM HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten (links) und die ausgelesenen Emissionsintensitäten und entsprechenden Wellenlängen des Emissionsmaximums (rechts). Die Anregungswellenlänge ist 280 nm.....	82
Abbildung 3.35: Intensitätsautokorrelationen (links) und intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen (rechts) bei Rückwärts- (oben) und Seitwärtsstreuung (unten) von 12,5 μM HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 20 °C.....	83
Abbildung 3.36: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:2 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.	87
Abbildung 3.37: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:4 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.	89
Abbildung 3.38: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:7 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.	92
Abbildung 3.39: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:10 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.	94
Abbildung 3.40: <i>Peisach</i> -Auftragung für rbHPRG mit Kupfer für verschiedene pH-Werte und verschiedene HPRG:Kupfer-Verhältnisse (Vorlage des <i>Peisach</i> -Diagramms adaptiert von ^[101,102]).	95
Abbildung 3.41: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von dem Peptid PRR1:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.	98
Abbildung 3.42: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid PRR1:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K.	99
Abbildung 3.43: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid PRR1:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der äquatorialen Orientierung.	101
Abbildung 3.44: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid PRR1:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der axialen Orientierung.	101
Abbildung 3.45: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von dem Peptid PRR2:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.	103
Abbildung 3.46: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid PRR2:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K.	104
Abbildung 3.47: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid PRR2:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der äquatorialen Orientierung.	105
Abbildung 3.48: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid PRR2:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der axialen Orientierung.	106

Abbildung 3.49: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von dem Peptid HRR:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.	107
Abbildung 3.50: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid HRR:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K.	108
Abbildung 3.51: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid HRR:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der äquatorialen Orientierung.	109
Abbildung 3.52: 3-Puls-ESEEM-Spektren von dem Peptid HRR:Kupfer 1:1 bei verschiedenen pH-Werten bei 20 K, gemessen in der axialen Orientierung.	110
Abbildung 3.53: <i>Peisach</i> -Auftragung für die Peptide des rbHPRGs (PRR1 – Kreis; PRR2 – Raute; HRR – Quadrat) mit Kupfer für verschiedene pH-Werte (Vorlage des <i>Peisach</i> -Diagramms adaptiert von ^[101,102]).	111
Abbildung 3.54: Zusammenstellung des Amplitudensignals und des ausgelesenen g-Wertes in äquatorialer Orientierung von Kupfer:Peptid 1:1 bei verschiedenen pH-Werten für die cw-X-Band-Spektren.	113
Abbildung 3.55: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer in PBS pH 7,4 in verschiedenen Kupfer:Protein-Verhältnissen bei 77 K.	115
Abbildung 3.56: Zusammenstellung des Amplitudensignals und des ausgelesenen g-Wertes in äquatorialer Orientierung von Kupfer:HPRG in PBS pH 7,4.	116
Abbildung 3.57: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von Peptid:Kupfer in PBS pH 7,4 in verschiedenen Kupfer:Peptid-Verhältnissen bei 77 K.	117
Abbildung 3.58: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid PRR1:Kupfer in PBS pH 7,4 in verschiedenen Kupfer:Peptid-Verhältnissen bei 20 K.	118
Abbildung 3.59: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid PRR2:Kupfer in PBS pH 7,4 in verschiedenen Kupfer:Peptid-Verhältnissen bei 20 K.	119
Abbildung 3.60: Magnetfeldzentrierte ESE-Spektren von dem Peptid HRR:Kupfer in PBS pH 7,4 in verschiedenen Kupfer:Peptid-Verhältnissen bei 20 K.	120
Abbildung 3.61: Zusammenstellung des Amplitudensignals und des ausgelesenen g-Wertes in äquatorialer Orientierung von Kupfer:Peptid in PBS pH 7,4 für die cw-X-Band-Spektren.	121
Abbildung 3.62: 3-Puls-ESEEM-Spektren von den Peptiden:Kupfer 1:1 bei 20 K, gemessen in der äquatorialen Orientierung.	122
Abbildung 3.63: 3-Puls-ESEEM-Spektren von den Peptiden:Kupfer 1:1 bei 20 K, gemessen in der axialen Orientierung.	122
Abbildung 4.1: Schematische Zusammenfassung der Dissertation.	125
Abbildung 5.1: Darstellung des Bicinchonsäure-Komplexes.	138
Abbildung 5.2: Kalibriergerade für den BCA-Test.	140

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 5.3: Darstellung der Absorptionswerte der einzelnen Probenverdünnungen mit den anhand der Regressionsgerade der Abbildung 5.2 ermittelten, zugehörigen Konzentrationen.....	141
Abbildung 5.4: Elutionsprofil der Abtrennung von gelabeltem Protein von freiem Label über eine Größenausschlusschromatographie.....	151
Abbildung 5.5: EPR-Spektren der Fraktionen 2 bis 5 von der Größenausschlusschromatographie.....	152
Abbildung A.1: SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen der Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie mit Marker (M).	XXIV
Abbildung A.2: Elutionsprofil der Aufreinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie und Elution mit einem Natriumchlorid-haltigen Puffer...XXIV	
Abbildung A.3: SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen der Fraktionen der Con A 4 B-Affinitätschromatographie mit Marker (M) und bovinem Serum Albumin (BSA) als Referenz.	XXVI
Abbildung A.4: Elutionsprofil der Aufreinigung mittels Con A 4B-Affinitätschromatographie und Elution mit einem Methyl- α -D-glucopyranosid-haltigen Puffer.	XXVII
Abbildung A.5: Amplitudennormierte EPR-Spektren des radikalischen HPRGs über einen Zeitraum von 15 h in PBS pH 7,4.	XXIX
Abbildung A.6: Amplitudennormierte EPR-Spektren von TEMPO über einen Zeitraum von 15 h in PBS pH 7,4.....	XXIX
Abbildung A.7: cw-X-Band EPR-Spektren der Lösungen von Metallionen mit und ohne Wasserstoffperoxid in PBS pH 7,4.	XXX
Abbildung A.8: cw-X-Band EPR-Spektren der Lösungen von Metallionen mit und ohne Wasserstoffperoxid bei Anwesenheit von Ascorbinsäure in PBS pH 7,4.....	XXX
Abbildung A.9: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 5-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.	XXXII
Abbildung A.10: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 5-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs bei 20 °C.....	XXXII
Abbildung A.11: Darstellung der gemessenen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für die Spinsonde 5-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.	XXXIII
Abbildung A.12: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 16-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.	XXXV
Abbildung A.13: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde 16-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs bei 20 °C.....	XXXV

Abbildung A.14: Darstellung der gemessen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für die Spinsonde 16-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.	XXXVI
Abbildung A.15: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde TOAC mit HPRG und den Peptiden des HPRGs in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.	XXXVIII
Abbildung A.16: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde TOAC mit HPRG und den Peptiden des HPRGs bei 20 °C.	XXXVIII
Abbildung A.17: Darstellung der gemessen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für die Spinsonde TOAC mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.	XXXIX
Abbildung A.18: cw-X-Band-EPR-Spektren von der 17-fach deuterisierten Spinsonde CAT-1 mit HPRG und den Peptiden des HPRGs in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.....	XLI
Abbildung A.19: cw-X-Band-EPR-Spektren von der 17-fach deuterisierte Spinsonde CAT-1 mit HPRG und den Peptiden des HPRGs bei 20 °C.	XLI
Abbildung A.20: Darstellung der gemessen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für die 17-fach deuterisierte Spinsonde CAT-1 mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.....	XLII
Abbildung A.21: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde Fremys Salz mit HPRG und den Peptiden des HPRGs (mit Ausnahme von PRR1) in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.	XLIV
Abbildung A.22: cw-X-Band-EPR-Spektren von der Spinsonde Fremys Salz mit HPRG und den Peptiden des HPRGs bei 20 °C.	XLIV
Abbildung A.23: cw-EPR-Spektren von 250 µM radikalischem HPRG und 250 µM radikalischem HPRG mit der Zugabe von 50 µM Fremys Salz.	XLV
Abbildung A.24: Darstellung der gemessen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für die Spinsonde Fremys Salz mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.....	XLVI
Abbildung A.25: cw-X-Band-EPR-Spektren von MTSSL und dem mit MTSSL gelabelten HPRG in 5 K Schritten von 0 bis 90 °C, wobei jeweils die unnormierten Spektren (links) und die normierten Spektren (rechts) gegenübergestellt sind.....	XLVII
Abbildung A.26: Darstellung der gemessen (schwarz) und der simulierten (rot) cw-X-Band-Spektren für MTSSL und an HPRG kovalent gebundenes MTSSL für die Messung bei 20 °C.....	XLVII
Abbildung A.27: Normierte cw-X-Band-EPR-Spektren von 250 µM HPRG in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 20 °C.	XLVIII

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung A.28: g-Wert-aufgetragene cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:2 in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K. Die schwarze Linie kennzeichnet $g_{x/y}$ für die Probe bei pH 7,4..... XLIX
- Abbildung A.29: g-Wert-aufgetragene cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:4 in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K. Die schwarze Linie kennzeichnet $g_{x/y}$ für die Probe bei pH 7,4.....L
- Abbildung A.30: g-Wert-aufgetragene cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:7 in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K. Die schwarze Linie kennzeichnet $g_{x/y}$ für die Probe bei pH 7,4.....LI
- Abbildung A.31: g-Wert-aufgetragene cw-X-Band-EPR-Spektren von HPRG:Kupfer 1:10 in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K. Die schwarze Linie kennzeichnet $g_{x/y}$ für die Probe bei pH 7,4.....LII
- Abbildung A.32: Magnetfeldzentrierte cw-X-Band-EPR-Spektren von 2 mM Kupfer in PBS bei verschiedenen pH-Werten bei 77 K.LIII
- Abbildung A.33: cw-EPR-Spektrum von Kupfer(II) in Wasser bei 77 K. LIV
- Abbildung A.34: cw-EPR-Spektrum von Kupfer(II) in Wasser bei 77 K unter Verwendung des Manganstandards zur Ermittlung der g-Werte. LIV
- Abbildung A.35: Darstellung der Signalamplituden im Bereich von $g_{x/y}$ der cw-X-Band EPR-Spektren von HPRG:Kupfer über die verschiedenen pH-Werte bei verschiedenen Protein:Kupfer-Verhältnissen. LV
- Abbildung A.36: Darstellung der Doppelintegrale der cw-X-Band EPR-Spektren von HPRG:Kupfer über die verschiedenen pH-Werte bei verschiedenen Protein:Kupfer-Verhältnissen..... LV
- Abbildung A.37: Darstellung der ausgelesenen $g_{x/y}$ -Werte der cw-X-Band EPR-Spektren von HPRG:Kupfer über die verschiedenen pH-Werte bei verschiedenen Protein:Kupfer-Verhältnissen..... LVI
- Abbildung A.38: Darstellung der Transmission von Peptid:Kupfer-Proben bei pH 7,4 in PBS-Puffer. Als Referenz dient die entsprechende Kupferkonzentration ohne Peptidanwesenheit in PBS-Puffer. LVI

C. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht über ermittelte Bindungskapazitäten von hHPRG und rbHPRG mit Metallionen.....	7
Tabelle 3.1: Quantifizierung der Aufreinigungsmethode über den BCA-Test. Alle Angaben auf die Isolation aus 25 ml Kaninchenserum bezogen.	40
Tabelle 3.2: Simulationsparameter für das cw-X-Band-EPR-Spektrum von HPRG in PBS pH 7,4.	42
Tabelle 3.3: Ausgelesene Magnetfeld und (normierte) Intensitäten der einzelnen Superhyperfeinaufspaltungen für das Tieffeld-, Zentralfeld-, und Hochfeldsignal der Stickstoffaufspaltung.	45
Tabelle 3.4: Simulationsparameter von der Spinsonde 5-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs für die Messung bei 20 °C.....	63
Tabelle 3.5: Simulationsparameter von der Spinsonde 16-DSA mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.	66
Tabelle 3.6: Simulationsparameter von der Spinsonde TOAC mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.	68
Tabelle 3.7: Simulationsparameter von der 17-fach deuterisierten Spinsonde CAT-1 mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.	69
Tabelle 3.8: Simulationsparameter von der Spinsonde Fremys Salz mit HPRG und den Peptiden des HPRGs.	71
Tabelle 3.9: Simulationsparameter für freies MTSSL und mit MTSSL gelabeltes HPRG.	74
Tabelle 3.10: pK _s -Werte der Aminosäureseitenketten (nach ^[189]).	96
Tabelle 3.11: Werte für den Asymmetrieparameter und die Quadrupolkopplungskonstante für die 3-Puls-ESEEM-Spektren der PRR1 bei verschiedenen pH-Werten für die Stickstoffsignale.....	102
Tabelle 3.12: Werte für den Asymmetrieparameter und die Quadrupolkopplungskonstante für die 3-Puls-ESEEM-Spektren der PRR2 bei verschiedenen pH-Werten für die Stickstoffsignale.....	106
Tabelle 3.13: Werte für den Asymmetrieparameter und die Quadrupolkopplungskonstante für die 3-Puls-ESEEM-Spektren der HRR bei verschiedenen pH-Werten für die Stickstoffsignale.....	111
Tabelle 3.14: Werte für den Asymmetrieparameter und die Quadrupolkopplungskonstante für die 3-Puls-ESEEM-Spektren der Peptidproben für physiologische Bedingungen für die Stickstoffsignale.....	123
Tabelle 5.1: Zusammensetzung der Puffer für die Co-Affinitätschromatographie.....	132
Tabelle 5.2: Zusammensetzung der Puffer für die Kationenaustausch-Chromatographie ...	133
Tabelle 5.3: Zusammensetzung der Puffer bzw. Lösungen für die Um-/Entsalzung..	134
Tabelle 5.4: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE.....	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 5.5: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele.	137
Tabelle 5.6: Pipettierschema für die Kalibrierreihe des BCA-Tests mit BSA als Standardsubstanz.	139
Tabelle 5.7: Pipettierschema für die Verdünnungen der proteinhaltigen Proben.	140
Tabelle 5.8: Pipettierschema für die Proteinproben für den BCA-Test.	141
Tabelle 5.9: Allgemeine Messparameter für cw-X-Band EPR-Messungen mit Temperatureinheit und bei 77 K.	142
Tabelle 5.10: g-Werte und ihre Abweichungen der einzelnen Manganstandard-Linien	143
Tabelle 5.11: Übersicht über die Simulationswerte und deren Abweichungen.	145
Tabelle 5.12: Pipettierschema für die Probenpräparation des antioxidativen Verhaltens von HPRG bei verschiedenen Bedingungen.	147
Tabelle 5.13: Pipettierschema für die Probenpräparation des antioxidativen Verhaltens von TEMPO bei verschiedenen Bedingungen.	148
Tabelle 5.14: Pipettierschema für die Probenpräparation der Referenzen für die Betrachtung des antioxidativen Verhaltens von HPRG und TEMPO.	149
Tabelle 5.15: Pipettierschema für die Präparation von 500 µl einer 500 µM Sondenlösung in PBS pH 7,4 aus der entsprechenden Ligandenstammlöung.	150
Tabelle 5.16: Pipettierschema für die Präparation von 30 µl Probenlösung mit 50 µM Sonde und 500 µM Protein bzw. Peptid in PBS pH 7,4 aus der entsprechenden der Protein-/Peptidstammlösung und der 500 µM Sondenlösung.	150
Tabelle 5.17: Pipettierschema für die Probenpräparation der HPRG:Cu(II)-Proben mit 17,5 % Glycerol bei pH 7,4. Die Cu(II)-Konzentration beträgt 2 mM, die Proteinkonzentration ist entsprechend an die Verhältnisse angepasst.	153
Tabelle 5.18: Pipettierschema für die Probenpräparation der HPRG:Cu(II)-Proben mit 17,5 % Glycerol für die verschiedenen Verhältnisse für die Messung der pH-abhängigen Kupferbindung.	153
Tabelle 5.19: Übersicht über die pH-Werte der einzelnen HPRG:Cu(II)-Proben mit 17,5 % Glycerol.	154
Tabelle 5.20: Pipettierschema für die Probenpräparation der Peptid:Cu(II)-Proben mit 17,5 % Glycerol für verschiedene Peptid:Cu(II)-Verhältnisse. Die Cu(II)-Konzentration beträgt 2 mM, die Peptidkonzentration ist entsprechend an die Verhältnisse angepasst.	154
Tabelle 5.21: Pipettierschema für die Probenpräparation der pH-Abhängigkeit von HPRG für die DLS und Fluoreszenzmessungen. Die Proteinkonzentration beträgt 12,5 µM in einem Gesamtvolumen von 200 µl.	156
Tabelle 5.22: Pipettierschema für die Probenpräparation der kupferabhängigen Transmissionsmessungen von PBS bei pH 7,4.	156
Tabelle 5.23: Pipettierschema für die Probenpräparation der kupferabhängigen Transmissionsmessungen des Peptides PRR1 in PBS pH 7,4.	157

Tabelle 5.24: Pipettierschema für die Probenpräparation der kupferabhängigen Transmissionsmessungen des Peptides PRR2 in PBS pH 7,4.....	157
Tabelle 5.25: Pipettierschema für die Probenpräparation der kupferabhängigen Transmissionsmessungen des Peptides HRR in PBS pH 7,4.	158
Tabelle A.1: Zusammensetzung der Puffer für die Anionenaustausch-Chromatographie.	XXV
Tabelle A.2: Zusammensetzung der Puffer für die Con A 4B-Affinitätschromatographie.	XXVIII

D. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich (in wertungsfreier Reihenfolge) bei den Leuten bedanken, die mir während der Promotionszeiten mit Rat und Tat zur Seite standen.

- ★ An erster Stelle möchte ich bei Prof. Dr. Dariush Hinderberger bedanken, welcher mir das Thema überlassen, mir bei der Gestaltung freie Hand gelassen und mich mit Diskussionen unterstützt hat.
- ★ Einem Dank gehört auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), welche finanziell die Arbeit unterstützt haben.
- ★ Auch möchte ich den Arbeitsgruppen um Prof. Dr. Ralf Bernd Klösigen und Jun.-Prof. Dr. Carla Schmidt danken, welche mich nicht nur mit dem „zum Laufen kriegen“ des Projektes, sondern auch mit den massenspektrometrischen Messungen unterstützt haben, sodass die Aufreinigung des Proteins gelang.
- ★ Ein weiterer Dank gebührt allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dariush Hinderberger, welche neben hilfreichen Diskussionen, einer lustigen Kaffeerunde auch für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Dabei möchte ich besonders meine Kollegen Dr. Anna Weyrauch, welche das Thema in Halle etabliert hatte, Dr. Haleh Hashemi Haeri, welche immer für Diskussionen über die EPR-Spektren ein offenes Ohr hatte, Jonas Volmer, welcher immer für spannende Diskussionen für neue Proteinaufreinigungsideen zu haben war, Heike Schimm und Annekatriin Rother, welche neben lustigen Sprüchen auch immer eine Idee für extravagante Messansätze hatten, und Vanessa Jerschabek, welche mich neben Messungen auch bei der Proteinaufreinigung unterstützte, hervorheben.
- ★ Schlussendlich möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, ohne die ich vermutlich die Promotionszeit nicht zu Ende gebracht hätte. Vielen Dank für den Rückhalt, das Aufbauen nach nicht-funktionierenden Messungen und die Zeit, in der ich auch mal die Promotion vergessen konnte. Vielen Dank dafür!
- ★ Einem besonderen Dank gebührt dabei Andreas, welcher neben einem offenen Ohr und klugen Ideen auch privat immer für mich da war/ist.

E. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Melanie Kampe
Geburtsdatum	03. September 1994
Geburtsort	Halle/Saale

Ausbildung:

06.2018 bis 11.2021	Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hinderberger im Fachbereich Physikalische Chemie am Institut für Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
---------------------	--

10.2013 bis 05.2018	Lebensmittelchemie-Studium am Institut für Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: 1. Staatsexamen / Diplom Anfertigung einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hinderberger mit dem Titel „Hydrophobine – Die Mikrostruktur selbstorganisierter Filme amphiphiler Pilzproteine“
---------------------	--

08.2005 bis 06.2013	Besuch des Georg-Cantor-Gymnasiums in Halle/Saale zum Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
---------------------	---

Melanie Kampe

F. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche eindeutig kenntlich gemacht habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass ich bisher an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung einen Promotionsversuch unternommen habe und dass ich die vorliegende Dissertation bei keiner anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe.

Ort, Datum

Melanie Kampe