

**NMR-spektroskopische Untersuchungen des Einflusses
von Cosolventien auf die Kältedenaturierung von
Lysozym sowie des inversen Temperaturübergangs des
elastin-mimetischen Polypeptids GVG(VPGVG)₃**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Chemie der Universität Dortmund vorgelegt

von Dipl.-Biochem. Karsten Vogtt

aus Stadtlohn

März 2006

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Geiger

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2006

Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. Roland Winter für die interessante Themenstellung und seine kompetente, wohlwollende Betreuung.

Prof. Dr. Alfons Geiger danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Prof. Dr. Burkhard Costisella bedanke ich mich für den Rat und die Unterstützung in allen Belangen der NMR-Spektroskopie sowie für die Bereitstellung der Messzeit am 600 MHz-Spektrometer.

Weiterer Dank gilt Dr. Claus Czeslik für seinen fachlichen Rat und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Stellvertretend für die mechanische Werkstatt bedanke ich mich bei Herrn K. Langner für die Unterstützung und Hilfe bei praktischen Problemen.

Ich möchte mich bei Dr. Revanur Ravindra, Dr. Jörg Eisenblätter, Dr. Guido Jackler, Dr. Rudolf Köhling, Chiara Nicolini, Dr. Jörg Baranski, Nadeem Javid und Monika Khurana für die freundliche Zusammenarbeit und Hilfe bedanken.

Allen Mitarbeitern und Angehörigen des Arbeitskreises PC I danke ich für das freundliche und angenehme Arbeitsklima.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Proteine	4
2.1	Strukturelemente	4
2.2	Thermodynamische Beschreibung der Proteinfaltung	7
2.3	Faltung	11
2.4	Stabilität	13
2.5	Der Einfluss von Cosolventien	15
2.6	Lysozym	18
2.7	Elastin und elastin-mimetische Polypeptide	19
3	Methoden	21
3.1	NMR: Grundlagen	21
3.1.1	2D-Spektren	24
3.1.2	Das NMR-Spektrum von Proteinen	26
3.2	Protonen-Austausch ^1H -NMR	27
3.3	^{13}C - T_1 -Relaxationszeiten	31
3.4	DSC und PPC	34
4	Experimente	36
4.1	Materialien	36
4.2	Software	36
4.3	Protonen-Austauschexperimente an HEL	36
4.4	NMR-Messungen an GVG(VPGVG) $_3$	39
4.5	DSC- und PPC-Messungen	40
4.6	^1H -NMR-Messungen der Hitzdenaturierung von HEL	40

5 Ergebnisse	42
5.1 Hitze- und Kältebestabilisierung von HEL	42
5.1.1 DSC-, PPC- und ^1H -NMR-Messungen der Hitzedenaturierung	42
5.1.2 <i>P</i> -Faktoren der Hitzedenaturierung	45
5.1.3 <i>P</i> -Faktoren der druckunterstützten Kältedenaturierung	49
5.2 Thermisch induzierte Faltung des Polypeptids	
GVG(VPGVG) ₃	55
5.2.1 Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale	55
5.2.2 Temperaturabhängige Messungen	61
5.2.3 ^1H - ^1H -2D-NOESY	71
6 Diskussion	73
6.1 Hitzedenaturierung von HEL	73
6.2 Kältedenaturierung von HEL	77
6.3 Thermisch induzierte Faltung des Polypeptids	
GVG(VPGVG) ₃	78
7 Zusammenfassung	86

Verwendete Abkürzungen und Symbole

An dieser Stelle werden nur die Abkürzungen erklärt, welche keine allgemeine Verbreitung über Lehrbücher o. Ä. haben oder essentiell für das Verständnis dieser Arbeit sind. Bei der Bezeichnung von Aminosäuren wird in Abbildungen und Formeln der Einbuchstabencode, ansonsten der voll ausgeschriebene Name verwendet. Die Position der Atome innerhalb eines Aminosäurerestes wird durch griechische Kleinbuchstaben gekennzeichnet (beginnend mit α , welches das Kohlenstoff kennzeichnet, das die Amino- und die Säuregruppe trägt). Fremdwörter werden nur verwendet, wenn sie sich nicht sinnvoll übersetzen lassen oder so weit verbreitet sind und Eingang in die Fachsprache gefunden haben, dass eine Übersetzung zu Missverständnissen führen würde. Sie werden durch eine kursive Schrift markiert.

α	thermischer Ausdehnungskoeffizient
ASA	engl.: <i>Accessible Surface Area</i>
DSC	engl.: <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
COSY	engl.: <i>Correlated Spectroscopy</i>
δ	chemische Verschiebung eines Signals im Vergleich zu einem Standardsignal
ΔH_{cal}	kalorimetrische Enthalpie
$\Delta H_{\text{hydr.}}$	Hydratisierungsenthalpie
ΔH_{H}	van't Hoff-Enthalpie
$\Delta G_{\text{unf.}}$	Gibbs-Energie der Entfaltung
$\Delta\mu_{i,\text{trans.}}$	Änderung des chemischen Potentials μ der Komponente i bei Transfer in eine andere Umgebung
$\Delta S_{\text{conf.}}$	Differenz der Konfigurationsentropien
$\Delta S_{\text{unf.}}$	Entropie der Entfaltung
ΔV_i^{\neq}	Aktivierungsvolumen der Komponente i
$E_{a,i}$	Aktivierungsenergie der Komponente i
F2, F1	Frequenzdomäne aus der Fourier-Transformation der Zeitdomänen t_2 bzw. t_1
γ	gyromagnetisches Verhältnis in $\text{T}^{-1}\text{s}^{-1}$
HEL	Lysozym aus Hühnereiweiß
HMBC	engl.: <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	engl.: <i>Heteronuclear Single-Quantum Coherence</i>
INEPT	engl.: <i>Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer</i>

ITT	engl.: <i>Inverse Temperature Transition</i> ; inverser Temperaturübergang
$k_{\text{obs.}}$	gemessene Austauschrate eines Amidprotons
k_{rc}	berechnete Austauschrate für ein Amidproton in Zufallsknäuel-Umgebung
NMR	Nuklearmagnetische Resonanz (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOESY	engl.: <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
ω	Kreisfrequenz
P	engl.: <i>protection factor</i> ; Grad der Abschirmung eines Amidprotons gegen Austausch mit einem Deuteron im Vergleich zum gleichen Amidproton in einer Zufallsknäuel-Umgebung.
PPC	engl.: <i>Pressure Perturbation Calorimetry</i>
rel. I	relative Intensität; Intensität eines Signals relativ zu einem Standardsignal
S-S	Disulfid-Brückenbindung über zwei Cystein-Reste
t_1	Evolutionszeit in einem 2D-NMR-Experiment; wird regelmäßig inkrementiert und dient als 2. Zeitdomäne zur Fourier-Transformation.
t_2	Akquisitionszeit; Zeitdomäne in 1D- und 2D-NMR-Experimenten
T_1	Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxationszeit
τ_c	Rotationskorrelationszeit
$\tau_{\text{est.}}$	abgeschätzte Rotationskorrelationszeit

Kapitel 1

Einleitung

Die Naturwissenschaften, welche sich mit dem Leben befassen, haben in den letzten Jahrzehnten einen raschen Fortschritt erlebt. Seit der Entdeckung der DNS-Doppelhelixstruktur [1] und der ersten Strukturbestimmung von Lysozym mittels Röntgenbeugung [2], konnte der Brückenschlag von der klassischen Biologie zur Chemie und Physik geschlagen und Lebensprozesse bis auf das molekulare Niveau geklärt werden. Seitdem besteht ein zunehmendes Interesse, Vorgänge in der belebten Natur auf molekularem Niveau und die ihnen zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Eigenschaften zu verstehen. In diesem Zuge wurden und werden spektroskopische Methoden auf biologische Systeme und Biomoleküle angewandt, um Informationen auf molekularer oder gar atomarer Ebene zu erhalten. Die Komplexität biologischer Systeme erschwert deren detaillierte Analysen, doch lassen sich z.B. mittels FT-IR- oder CD-Spektroskopie die Anteile von Sekundärstrukturen, mittels Röntgenbeugung und NMR-Spektroskopie sogar komplette dreidimensionale Strukturen von Proteinen ermitteln.

Eine besondere Beachtung muss hierbei das Medium Wasser erfahren: alle wichtigen Lebensvorgänge finden in diesem Lösungsmittel statt und viele Prozesse lassen sich erst begreifen, wenn man sie im Licht der Wechselwirkung zwischen Solvens und Solvendum betrachtet. Daher setzt ein tieferes Verständnis von Lebensprozessen auch eine Betrachtung der - bei biologischen Systemen zumeist wässrigen - Umgebung der Moleküle voraus. Die Wechselwirkung von Wasser und Cosolventien mit polaren, apolaren und aromatischen Molekülgruppen ist ein wesentlicher Faktor, der zum Zustandekommen der nativen Faltung, aber auch Fehlfaltung und Aggregation, der Proteine beiträgt.

Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung der Kältedenaturierung von Proteinen mittels NMR-Spektroskopie. Als Modellsysteme werden hierbei das globuläre Protein Lysozym aus Hühnerei-

weiß (HEL) und das elastin-mimetische Polypeptid GVG(VPGVG)₃ herangezogen. Lysozym ist ein weitverbreitetes, kommerziell in großen Mengen erhältliches Protein, dessen Kristall- und Lösungsstruktur bekannt ist, dessen NMR-Spektrum weitestgehend geklärt und zugeordnet ist [3] und welches sich daher sehr gut als Modellsystem eignet. Bei dem Octadekamer GVG(VPGVG)₃ handelt es sich um ein oktadekames Polypeptid, welches einen temperaturabhängigen Konformationswechsel durchläuft. Aufgrund seiner einfachen Zusammensetzung eignet es sich sehr gut für detaillierte NMR-spektroskopische Untersuchungen, mit denen es möglich ist, Informationen auf atomar-molekularem Niveau zu erhalten.

Im Gegensatz zur Hitzdenaturierung, welche im Wesentlichen durch die Konfigurationsentropie ΔS_{conf} getrieben wird, ist bei der Kältedenaturierung die Änderung der Hydratisierungsenthalpie ΔH_{hydr} der treibende Motor. Eine Beobachtung dieser Entfaltungsform bei tiefen Temperaturen erlaubt daher einen Rückschluss auf Hydratisierungsphänomene. Die Hydratisierung von Proteinen wird weiterhin durch die Anwesenheit von Cosolventien beeinflusst, weshalb die Zugabe kosmo- bzw. chaotroper Zusätze ein weiteres Mittel darstellt, Einfluss auf die Hydratation zu nehmen. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da Proteine in zellulärer Umgebung von einem komplexen Lösungsmittelgemisch umgeben sind. Im Speziellen sollen in dieser Arbeit die Kältedenaturierung von Lysozym und der Einfluss kosmotroper (Sorbitol) bzw. chaotroper (Harnstoff) Zusätze auf diese Art der Entfaltung untersucht werden. Wie bei den meisten Proteinen befindet sich die betreffende Übergangstemperatur des Lysozyms unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser. Daher muss unter Hochdruckbedingungen, unter denen das Wasser bis ca. -20 °C nicht gefriert, gearbeitet werden. Als Methode wird die sog. Protonen-Austausch-NMR im Deuteriumoxid-Puffer, d.h. die Beobachtung des Austauschverhaltens labiler Protonen gegen Deuteronen mittels ¹H-NMR, verwendet. Hierbei werden strukturelle Informationen aus der Substitutionsgeschwindigkeit, mit der ein gegebenes Amidproton des Proteins durch ein Deuteron des Lösungsmittels ausgetauscht wird, gewonnen. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die Inkubation der Proben unter den relativ harschen Tieftemperatur- und Hochdruckbedingungen räumlich und zeitlich von den NMR-Messungen getrennt ist: Zunächst erfolgt die Inkubation der Proben unter kältedenaturierenden Bedingungen, und erst danach, nach erfolgtem Protonen-Austausch, die NMR-Messung. Auf diese Art und Weise können strukturelle Informationen über einen stabilen, teilentfalteten Zustand erhalten und der Einfluss von Cosolventien bzw. Hydratationsphänomene auf diese Struktur untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit, das Phänomen der Kältedenaturierung zu untersuchen, bieten die sog. elastin-mimetischen Peptide, deren Sequenz einem repetitiven Motiv (hier: VPGVG) aus dem Protein Elastin nachempfunden ist, und die wie dieses Strukturprotein mit steigender Temperatur bei

Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes einen konformellen Übergang zu einer gefalteten Struktur vollziehen. Umgekehrt vollziehen sie also, genau wie bei der Kältedenaturierung von Proteinen, eine Entfaltung mit sinkenden Temperaturen. Dabei sind diese mimetischen Peptide im Vergleich zu Proteinen sehr klein und einfach aufgebaut, was sie zu einem sehr guten physikalisch-chemischen Modellsystem macht, an dem auch NMR-Messmethoden eingesetzt werden können, welche an den wesentlich größeren und komplexeren natürlichen Proteinen nicht bzw. nicht ohne größeren Aufwand bewerkstelligt werden können. So soll die temperaturabhängige Konformationsänderung des elastin-mimetischen Octadekamers $\text{GVG}(\text{VPGVG})_3$ mittels ^{13}C -NMR verfolgt werden. Nicht nur die relativ einfache Zusammensetzung dieses Moleküls, sondern auch der Temperaturbereich des Übergangs im messtechnisch günstigen Bereich oberhalb von $0\text{ }^\circ\text{C}$ ermöglichen hier eine sehr genaue Untersuchung. Insbesondere sollen hier auch die longitudinalen Relaxationsraten T_1 bestimmt werden, um Informationen über die Dynamik innerhalb des Moleküls zu erhalten. Mithilfe dieser Daten sollte es möglich sein, ein Bild des strukturellen Übergangs des Peptids auf molekularem Niveau zu gewinnen.

Kapitel 2

Proteine

2.1 Strukturelemente

Die Bezeichnung „Protein“ wurde vom schwedischen Chemiker Jöns Jacob Berzelius geprägt und entstammt dem griechischen Wort „*protos*“, was übersetzt „der Erste“ bedeutet. Diese Namensgebung ist, obwohl schon vor über 150 Jahren getätigt, sehr treffend gewählt: Proteine sind an allen essentiellen Lebensprozessen beteiligt. In Form von Enzymen katalysieren sie Reaktionen, als Hämoglobin oder Albumin transportieren sie Stoffe, Keratin und Kollagen z.B. sind Bestandteile von Geweben, als Immunglobuline dienen sie der Immunabwehr, und in Form von z.B. Vasopressin oder Gonadotropin fungieren sie als Hormone, die Prozesse steuern und regulieren. Selbst wenn die Speicherung der Erbinformationen eine Hegemonie der Nukleinsäuren ist, so sind an der Realisierung und Weitergabe dieser Informationen Proteine, wie z.B. die DNA- oder RNA-Polymerase, beteiligt. Die Rolle der Proteine innerhalb der Chemie des Lebens kann daher kaum überschätzt werden.

Aus chemischer Sicht handelt es sich bei Proteine um lineare Heteropolymere, als deren Monomere die zwanzig sog. proteinogenen Aminosäuren fungieren. Die biologischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Biopolymere werden hierbei allerdings nicht nur aus der Reihenfolge und Menge der einzelnen Aminosäuren bestimmt, sondern hängen stark davon ab, wie sich das Polymer faltet, d.h., welche dreidimensionale Struktur es einnimmt. Die Zusammenhänge und Faktoren, die die dreidimensionale Struktur von Proteinen bestimmen, sind daher ein Fokus in der derzeitigen Forschung. Es wird hierbei zwischen der Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur unterschieden. Unter der Primärstruktur versteht man die Aminosäuresequenz eines Proteins, d.h. die Art und die Reihenfolge der Aminosäuren, die das Protein bilden. Man unterscheidet hier zwischen polaren, unpolaren und aromatischen Aminosäureresten. Eine besondere Rolle nehmen

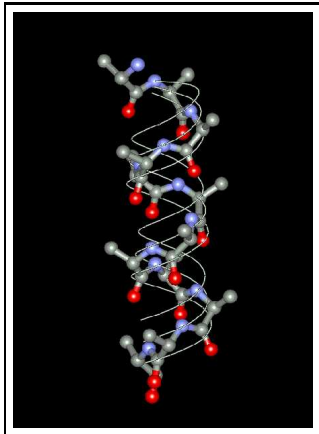


Abbildung 2.1: Dodeka-Alanin in alpha-helikaler Konformation.

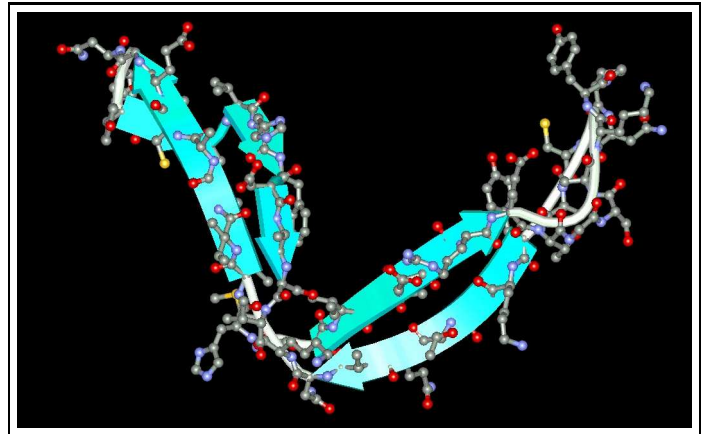


Abbildung 2.2: Ansicht des β -Faltblattbereiches zwischen den Aminosäureresten 79 und 104 der bovinen Ribonuklease A (PDB ID 1XPT [4]).

hier die Aminosäuren Cystein und Prolin ein: Erstere kann mit einem anderen Cystein eine sog. Disulfidbrücke ausbilden und so in die Peptidkette eine kovalente Verknüpfung einfügen. Letztere ist die einzige cyclische α -Iminosäure unter den proteinogenen Aminosäuren und besitzt daher eine relativ starre Konformation. Sie wird sehr oft auch als „Helixbrecher“ bezeichnet.

Auf der Ebene der Sekundärstruktur unterscheidet man die lokale räumliche Gerüststruktur ohne Berücksichtigung der Seitenketten, die die Polypeptidkette einnimmt. Am verbreitetsten sind hier helikale Strukturen und Faltblattstrukturen. Helices unterscheiden sich hinsichtlich der Ganghöhe n , d.i. die Anzahl der Reste pro helicaler Windung, und der Lage der Wasserstoffbrückenbindungen, die die Helix stabilisieren. Abb. 2.1 zeigt die α -helicale Konformation am Beispiel des Dodeka-Alanins, Abb. 2.2 ein Beispiel einer Faltblattstruktur aus der bovinen Ribonuklease A. Zur Unterscheidung von Helices in Proteinen wurde eine Bezeichnung der Art n_m entwickelt, wobei n die Anzahl der Reste pro Windung und m die Anzahl der Atome ist - einschließlich dem betreffenden Wasserstoffatom -, die sich innerhalb des durch die Wasserstoffbrücke geschlossenen Ringes befinden.

Abb. 2.3 zeigt ein Schema dieses Systems. Die α -Helix ist demnach eine 3.6_{13} -Helix, welche etwas gestauchter als die 3_{10} -Helix ist. α -Helices finden sich sehr oft in Faser- und globulären Proteinen; in Lysozym sind sowohl α - als auch 3_{10} -Helices zu finden (siehe Kapitel 2.6). Abb. 2.4 zeigt das Schema eines antiparallelen β -Faltblattes. Dieses sekundäre Strukturmotiv ist ebenfalls in globulären Proteinen weit verbreitet. Helix- und Faltblattstrukturen stellen die repetitiven Motive innerhalb der Proteinstruktur dar, neben denen es noch die Knäuel- und Schleifenkonformationen gibt, die nicht-repetitiv sind und sich nicht so einfach und elegant beschreiben lassen. Das wohl wichtigste Strukturelement hier stellt wohl die sog. β -Schleife dar - so benannt, weil dieses Motiv sehr oft

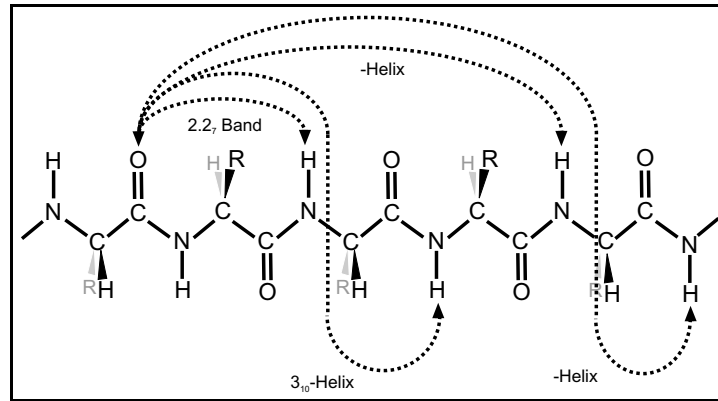


Abbildung 2.3: Schema der Wasserstoffbrücken für verschiedene Helices. Die gestrichelten Linien symbolisieren den jeweiligen Wasserstoffbrückenkontakt zwischen dem Carbonylsauerstoff und dem Amidproton, „R“ steht für die jeweilige Aminosäureseitenkette.

aufeinanderfolgende Stränge antiparalleler β -Faltblätter verbindet. An dieser Stelle soll hier nur auf die β -Schleife des Typs II eingegangen werden, da diese bei der Untersuchung des elastin-ähnlichen Polypeptids GVG(VPGVG)₃ eine wichtige Rolle spielt. Abb. 2.5 zeigt ein Modell dieses sekundären Strukturelements. Das Vorkommen eines Prolins in Position 2 dieser Konformation ist sehr häufig, und da beim Typ II der Carbonylsauerstoff des Restes 2 der Seitenkette des Aminosäurerestes 3 sehr nahe kommt, findet sich in Position 3 hier meistens ein Glycin.

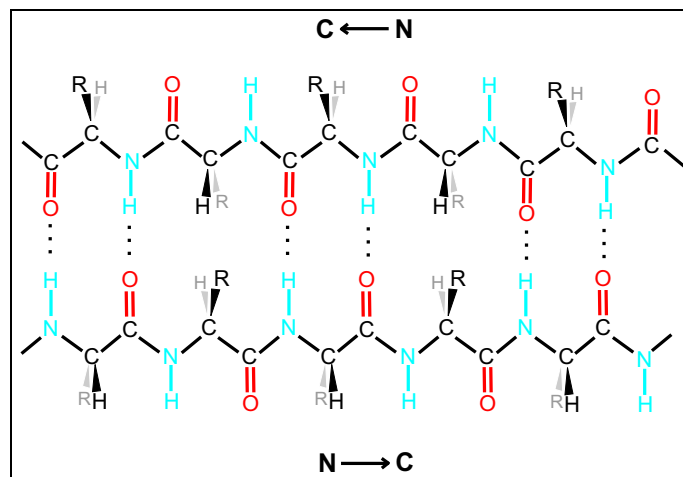


Abbildung 2.4: Schema eines antiparallelen β -Faltblatts. Die beiden Stränge liegen sich hierbei gegenläufig gegenüber. Parallele Faltblätter, bei denen die gegenüberliegenden Ketten gleich ausgerichtet sind, existieren ebenfalls; hier sind die Wasserstoffbrücken im Vergleich zum antiparallelen Faltblatt allerdings etwas verzerrt.

Unter dem Begriff der Tertiärstruktur versteht man die gesamte Struktur eines Polypeptids, welche durch die Orientierung der Sekundärstrukturelemente untereinander gebildet wird. Die einzelnen

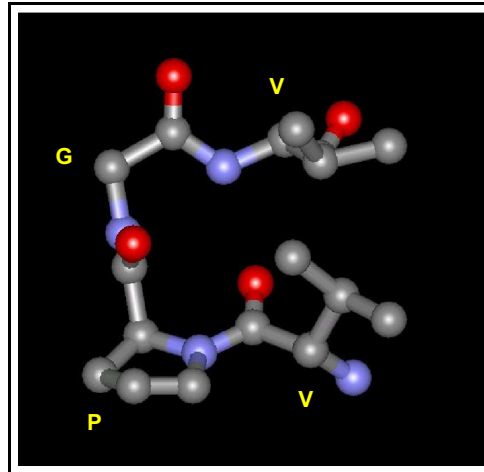


Abbildung 2.5: Modelldarstellung einer β -Schleife für die Reste $V_1P_2G_3V_4$. Dieses Motiv wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff von V_1 und dem Amidproton von V_4 stabilisiert. Die Torsionswinkel der Reste 2 und 3 sind hierbei: $\Phi_2 \approx -60^\circ$, $\Psi_2 \approx 120^\circ$, $\Phi_3 \approx 90^\circ$ und $\Psi_3 \approx 0^\circ$. Die β -Schleife des Typs I unterscheidet sich von der hier dargestellten nur dadurch, dass die Peptidbindung zwischen Rest 2 und 3 um 180° gedreht ist.

gefalteten Polypeptidketten lagern sich in einzelnen Fällen zu Oligomere zusammen, was wiederum unter dem Begriff der Quartärstruktur zusammengefasst wird. Ein bekanntes Beispiel eines Proteins mit Quartärstruktur ist der Blutfarbstoff Hämoglobin, welches ein Tetramer aus identischen Untereinheiten ist.

2.2 Thermodynamische Beschreibung der Proteinfaltung

Nach Hawley [5] kann das Faltungsverhalten von Proteinen mit einem Zweizustandsmodell beschrieben werden, das zwischen einem gefalteten N und einem entfalteten Zustand D unterscheidet:

$$\Delta G_{unf.} = G_D - G_N \quad (2.1)$$

Gemäß dem Zusammenhang

$$d(\Delta G_{unf.}) = -\Delta S dT + \Delta V dp \quad (2.2)$$

kann durch Integration und Taylorreihenentwicklung nach T und p folgender Ausdruck für $\Delta G_{unf.}(p, T)$ gewonnen werden:

$$\begin{aligned}
\Delta G_{\text{unf.}} &= \frac{\Delta\beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\alpha(p - p_0)(T - T_0) - \\
&\Delta C_p \left[T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] + \Delta V_0(p - p_0) - \\
&\Delta S_0(T - T_0) + \Delta G_0
\end{aligned} \tag{2.3}$$

wobei die einzelnen Parameter wie folgt definiert sind:

$$\begin{aligned}
\Delta S &= S_D - S_N = -\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial T}\right)_p \\
\Delta V &= V_D - V_N = \left(\frac{\partial G}{\partial p}\right)_T \\
\Delta G_0 &= \Delta G(p_0, T_0) \\
\Delta S_0 &= \Delta S(p_0, T_0) \\
\Delta V_0 &= \Delta V(p_0, T_0) \\
\Delta\beta &= \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial p}\right)_T \\
\Delta C_p &= T \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial T}\right)_p \\
\Delta\alpha &= \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial T}\right)_p = -\left(\frac{\partial \Delta S}{\partial p}\right)_T
\end{aligned}$$

Hierbei ist α der thermische Ausdehnungsfaktor $\alpha = \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_p$, β der isotherme Kompressibilitätsfaktor $\beta = \left(\frac{\partial V}{\partial p}\right)_T$ und C_p die Wärmekapazität $C_p = T \left(\frac{\partial S}{\partial T}\right)_p$.

Für die reine Temperaturabhängigkeit der Gibbs-Entfaltungsenthalpie lässt sich $\Delta G_{\text{unf.}}$ in Form der modifizierten Gibbs-Helmholtz-Gleichung mit T_m als der mittleren Temperatur des Denaturierungsübergangs wie folgt formulieren:

$$\Delta G_{\text{unf.}} = \Delta H_m \left(\frac{T_m - T}{T_m} - \Delta C_p (T_m - T (1 - \ln(\frac{T}{T_m}))) \right) \tag{2.4}$$

Empirisch konnte dabei auf Basis von Daten kleiner, globulärer Proteine näherungsweise folgende Zusammenhang zwischen der Anzahl der Aminosäurereste N und den Größen ΔC_p , $\Delta H(T = 333 \text{ K})$ sowie $\Delta S(T = 333 \text{ K})$ gefunden werden [6, 7]:

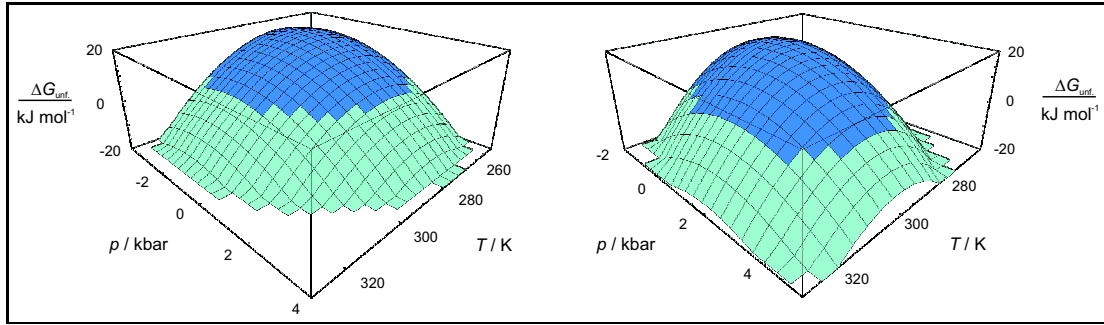


Abbildung 2.6: ΔG_{unf} als Funktion der Temperatur und des Drucks berechnet nach Formel 2.3 für das Protein Chymotrypsinogen (rechts) und Ribonuklease (links) [5]. Die dunkelblau markierte Fläche zeigt den Bereich an, in dem ΔG_{unf} größer als Null ist.

$$\Delta C_p \approx 0,058N \frac{\text{kJ}}{\text{molRestK}} \quad (2.5)$$

$$\Delta H(T = 333\text{K}) \approx 2,92N \frac{\text{kJ}}{\text{molRest}} \quad (2.6)$$

$$\Delta S(T = 333\text{K}) \approx 0,088N \frac{\text{kJ}}{\text{molRestK}} \quad (2.7)$$

Insbesondere konnte gezeigt werden, dass ΔC_p mit der Änderung der *accessible surface area* ASA und damit mit dem Grad der Hydratisierung korreliert.

Mit Formel 2.3 lässt sich der Temperatur- und Druckbereich berechnen, in dem die Gibbs-Energie der Entfaltung positiv ist, d.h. der Bereich, in dem das Protein den nativen, gefalteten Zustand einnimmt. Abb. 2.6 zeigt die Gibbs-Energie der Entfaltung als Funktion des Drucks p und der Temperatur T , wie sie sich für die Proteine Chymotrypsinogen und Ribonuklease gemäß [5] berechnen lässt. Es ist ersichtlich, dass es bei gegebenem Druck zwei Temperaturen gibt, bei denen die Bedingung $\Delta G_{\text{unf}} = 0$ erfüllt ist, und dass mit zunehmendem Druck ΔG_{unf} stetig abnimmt. Dementsprechend lassen sich drei Methoden der Denaturierung unterscheiden: die Hitzedenaturierung bei hohen Temperaturen, die Kältedenaturierung bei niedrigen Temperaturen und die Druckdenaturierung bei hohen Drücken.

Abb. 2.7 zeigt schematisch diesen Zusammenhang zwischen Entfaltung und Druck sowie Temperatur. Bei hohen Temperaturen führt die hohe Differenz der Konfigurationsentropien ΔS_{conf} zwischen gefalteten und ungefalteten Protein zur Denaturierung, während bei sehr hohen Drücken das

negative Übergangsvolumen ΔV_0 den nativen Zustands destabilisiert. Bei niedrigen Temperaturen kommt es zu einer Zunahme der Hydratisierung und damit zu einer Abnahme der entsprechenden Enthalpieänderung $\Delta H_{\text{hydr.}}$, die zu einem entfalteten, hochgradig hydratisierten Zustand führt. Diese Zunahme an Hydratisierung ist begleitet von einem Übergang zu einer höheren Wärmekapazität C_p . Diese Änderungen wurden für Proteine bei den Übergängen bei sowohl tiefer als auch hoher Temperatur gefunden [8, 9].

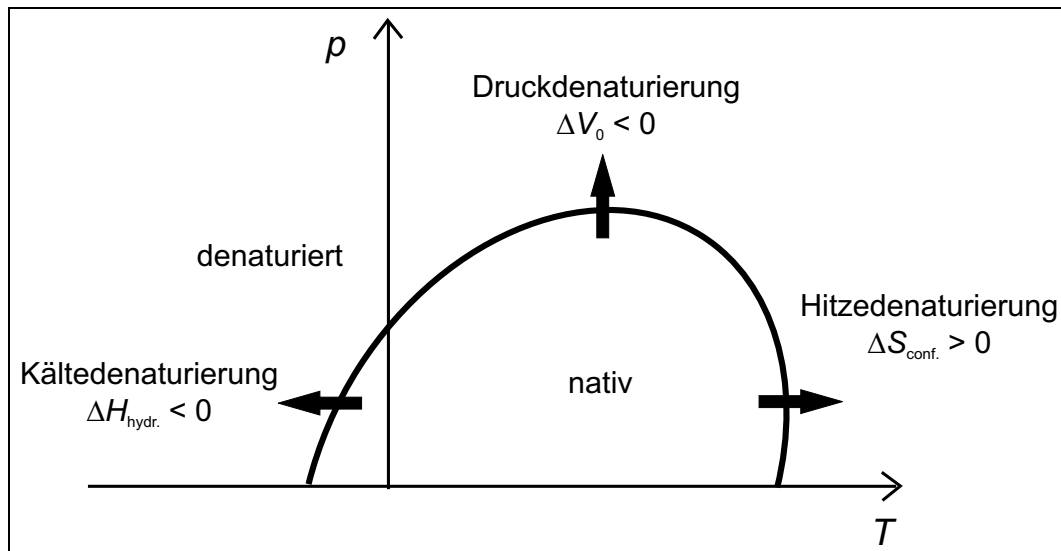


Abbildung 2.7: Schema des p,T -Zustandsdiagramms von monomeren Proteinen.

Neben den bisher behandelten Denaturierungsformen, die durch die thermodynamischen Parameter Druck und Temperatur eingeleitet werden, können Proteine auch durch chemische Zusätze, wie z.B. Harnstoff oder Guanidiniumchlorid, entfaltet werden. Hierbei binden diese Agentien preferentiell ans Protein, anstatt in Lösung vollständig solvatisiert vorzuliegen, und destabilisieren durch diese Interaktion den nativen Zustand des Proteins. Allerdings gibt es auch Cosolventien, welche die Stabilität der Biomoleküle erhöhen, indem sie vornehmlich nicht an die Oberfläche des Proteins binden, sondern sich hauptsächlich ungebunden und stark hydratisiert in Lösung aufhalten (vgl. Kap. 2.5).

Die native Struktur eines Proteins ist damit das Ergebnis einer Summe verschiedener Einflüsse, auf dessen Gleichgewichtslage die einzelnen Denaturierungsfaktoren einwirken können. Daher soll in den folgenden Kapiteln auf die einzelnen stabilisierenden und destabilisierenden Faktoren näher eingegangen werden.

2.3 Faltung

Unter physiologischen Bedingungen falten sich Proteine spontan in die native Konformation, indem sie einen selbst organisierten Faltungsprozess (engl. „*self assembly*“) durchführen. Dabei ist davon auszugehen, dass der Verlauf nicht zufällig vonstatten geht, sondern durch bestimmte treibende Kräfte gesteuert wird, da in der Zeit, die Proteine üblicherweise zur Faltung brauchen, unmöglich alle möglichen Konformationen eingenommen werden können [10, 11].

In dem Diffusions-Kollisions-Modell von Karplus und Weaver [12] wird davon ausgegangen, dass sich lokale Strukturen schnell ausbilden, aber auch sehr schnell wieder zerfallen. Treten so entstandene Mikrodomänen allerdings in Wechselwirkung miteinander, können sich stabilisierte Strukturen höherer Ordnung bilden, die von Dauer sind. So wird stufenweise das gefaltete Protein aus lokalen Mikrodomänen zusammengesetzt, was die anzunehmende Faltungszeit drastisch herabsetzt.

Ein weiteres Modell schlägt als Erklärung den sog. hydrophoben Kollaps vor, der auf dem hydrophoben Effekt basiert und bei dem die treibende Kraft der Faltung das Zusammenlagern hydrophober Reste ist, die hierdurch ihre wasserexponierte Fläche verkleinern [13, 14, 15]. Nachdem das Protein auf nahezu native Dichte kollabiert ist, bilden sich Sekundär- und Tertiärstruktur.

Diese Ansätze wurden mit Hilfe von *lattice*-Modellen weiterentwickelt, wobei der Parameter Q als Maß für den Fortschritt der Faltung dient und wobei mittels computergestützter Monte Carlo Rechnungen erste Faltungsszenarien entworfen werden konnten [16, 17, 18]. Q ist dabei der Anteil der bereits geknüpften nicht-kovalenten Kontakte innerhalb des Proteins, d.h. Q ist gleich Null für das vollständig entfaltete und gleich Eins für das kompakte, native Protein. Mit derlei Modellen konnten Energielandschaften der freien Energie F als Funktion des Anteils geknüpfter nativer Kontakte Q sowohl für Modellproteine als auch für globuläre Proteine wie z.B. Lysozym berechnet werden [19, 20]. Es ist jedoch bis heute nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz die 3D-Struktur eines Proteins zu berechnen, obwohl erwiesen ist, dass es bei einer gegebenen Umgebung die Aminosäuresequenz ist, welche die native dreidimensionale Struktur bestimmt [21].

Experimentell konnte für die viele Proteine nachgewiesen werden, dass der Faltungsprozess über (mindestens) ein Intermediat verläuft, welches *Molten Globule* genannt wird [22]. Hier liegt das Protein im Wesentlichen schon sehr kompakt mit gefalteter Sekundärstruktur vor. Lysozym aus Hundemilch besitzt z.B. einen außerordentlich stabilen *Molten Globule*-Zustand, der nahezu diskret über DSC-Messungen beobachtbar ist [23].

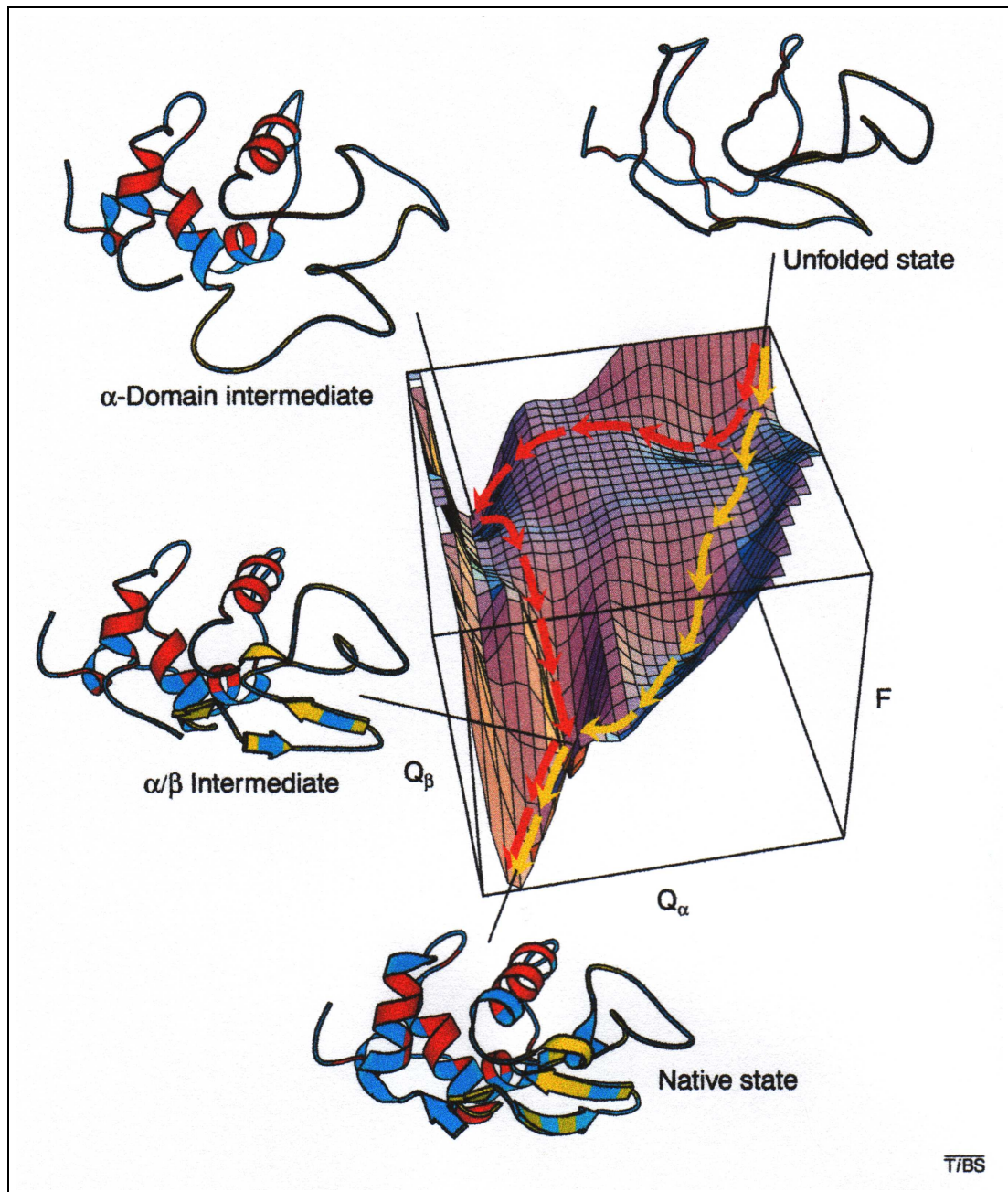


Abbildung 2.8: Die freie Energie F von Lysozym als Funktion des Faltungsfortschritts Q_α in der α -Domäne und Q_β in der β -Domäne. Die gelbe Trajektorie zeigt den direkten Faltungsweg an, während die rote Trajektorie den Verlauf über ein Intermediat mit gefalteter α -, jedoch unstrukturierter β -Domäne nimmt [20].

2.4 Stabilität

Unter physiologischen Bedingungen weisen Proteine eine nur geringe Stabilisierung von etwa $0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ pro Rest auf, so dass ein Protein mit hundert Resten eine Stabilisierungsenergie von nur 40 kJ mol^{-1} besitzt - das Äquivalent einer Stabilisierung durch etwa zwei Wasserstoffbrücken. Wie schon unter Abschnitt 2.2 angedeutet, ist die Stabilisierungsenergie ΔG_{unf} das Ergebnis einer Anzahl verschiedener Faktoren. Hierbei lassen sich der Einfluss von Salzbrücken, Wasserstoffbrücken, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und hydrophoben Kräften unterscheiden.

Salzbrücken sind ionische Wechselwirkungen zwischen geladenen Resten, wie z.B. der γ -Carboxylgruppe des Glutamins und der ϵ -Aminogruppe des Lysins. Der Anteil dieser Wechselwirkungen an der Stabilität von Proteinen wird als eher niedrig eingeschätzt und i. d. R. vernachlässigt. Wasserstoffbrücken hingegen spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Stabilisierung und der Struktur von Proteinen. Hierbei handelt es sich um vorwiegend elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einem partiell positiv geladenem Wasserstoff einer Donorgruppe und einem partiell negativ geladenem Akzeptoratom (zumeist Sauerstoff oder Stickstoff). Der Abstand zwischen den beiden Atomen beträgt ca. $0,3 \text{ nm}$ und trägt zur Stabilisierungsenergie mit 12 bis 30 kJ mol^{-1} pro Wasserstoffbrücke bei.

Unter Dipol-Dipol-Wechselwirkungen werden verschiedene attraktive Kräfte zwischen elektrisch neutralen Molekülgruppen zusammengefasst. Diese sog. van-der-Waals-Kräfte bestehen zwischen z.B. permanenten Dipolen oder Dipolen und induzierten Dipolen. Diese Wechselwirkungen sind schwächer als die der Salz- oder Wasserstoffbrücken, aber aufgrund der hohen Häufigkeit dieser van-der-Waals-Wechselwirkungen spielen sie eine große Rolle für die Proteinstabilisierung.

Als sog. hydrophoben Effekt bezeichnet man das Phänomen, dass unpolare Substanzen die Kontaktfläche zu Wasser minimieren und es so z.B. bei amphiphilen Molekülen wie Fettsäuren zur Ausbildung von Doppelmembranen kommt. Betrachtet man die Gibbs-Energie des Transfers einer unpolaren Komponente von einem unpolaren Lösungsmittel zu Wasser, so findet sich oft, dass dieser Transfer enthalpisch günstig, entropisch jedoch ungünstig [24]. So ist die Exponierung hydrophober Reste an der Oberfläche von Proteinen thermodynamisch ungünstig (vgl. 2.3, 'hydrophober Kollaps'), da die Hydratisierung unpolarer Oberflächen mit einer Verminderung der Entropie verbunden ist. Man nimmt an, dass dies an der clathratartigen Struktur liegt, die Wassermoleküle bei der Hydratisierung dieser Reste einnehmen.

All diese Einflüsse haben eine eigene Temperatur- und Druckabhängigkeit, die letztendlich zu einem Entfaltungsverhalten, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, führt. Anhand von Modellabschät-

zungen konnte gezeigt werden, dass die Enthalpie der Entfaltung für die Wasserstoffbrücken größer als Null ist und sie mit Änderung der Temperatur annähernd konstant bleibt. Die Enthalpieänderung der van-der-Waals-Wechselwirkungen ist ebenfalls größer Null - sie stabilisiert also die Faltung -, mit zunehmender Temperatur nimmt sie jedoch ab. Die Enthalpieänderungen $\Delta H_{\text{hydr.}}$ der polaren, aromatischen als auch der aliphatischen (= hydrophoben) Gruppen sind kleiner als Null, stabilisieren also die denaturierte Spezies. Die Hydratationsenthalpie polarer Gruppen sinkt dabei jedoch mit steigender Temperatur, d.h. sie wird noch negativer, während die Hydratisierungsenthalpie aromatischer Gruppen gegen Null konvergiert und diejeniger aliphatischer Gruppen ansteigt und bei höheren Temperaturen sogar größer als Null ist [25]. Unter Einbezug der jeweiligen Entropieänderungen bei der Entfaltung bedeutet dies für die entsprechenden Gibbs-Entfaltungsenergien, dass der Anteil der polaren Hydratisierung den nativen Zustand destabilisiert (d.h. $\Delta G_{\text{unf.}}(\text{polar}) < 0$), die Hydratisierung aromatischer Gruppen schwach destabilisierend ist, während die Hydratisierung unpolarer Gruppen jedoch stabilisierend auf den nativen Zustand unter Standardbedingungen wirkt (siehe Abb. 2.9). Mit abnehmender Temperatur erniedrigt sich die Gibbs-Entfaltungsenergie für die Hydratation polarer Reste und führt so zur Kältdenaturierung, während mit zunehmender Temperatur der Term $-T\Delta S_{\text{conf.}}$ überwiegt und die Hitzdenaturierung eintritt.

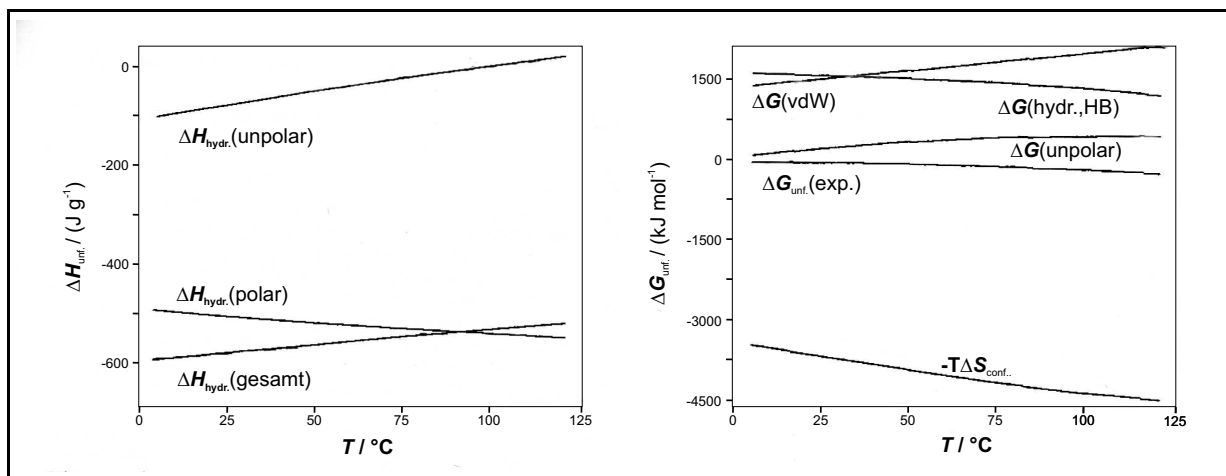


Abbildung 2.9: Hydratisierungsenthalpien $\Delta H_{\text{unf.}}(\text{hydr.})$ der Entfaltung für polare, unpolare und für alle Aminosäurereste von Lysozym (links), sowie die Gibbs-Energie-Beiträge einzelner Wechselwirkungen in Myoglobin (rechts) (wobei $\Delta G(\text{vdW})$ die Gibbs-Energie-Änderung der van-der-Waals-Wechselwirkungen, $\Delta G(\text{hydr., HB})$ die Gibbs-Energie-Änderung der Wasserstoffbrücken, $\Delta G(\text{unpolar})$ die Gibbs-Energie-Änderung der hydrophoben Hydratisierung und $-T\Delta S_{\text{conf.}}$ der Term der Konfigurationsentropie ist. $\Delta G_{\text{unf.}}(\text{exp.})$ ist die gesamte Gibbs-Entfaltungsenergie.). Grafiken modifiziert nach [26, 25].

2.5 Der Einfluss von Cosolventien

Es ist seit langem bekannt, dass chemische Zusätze die native Struktur von Proteinen stabilisieren bzw. destabilisieren können. In der Natur liegen Proteine so gut wie nie in ideal verdünnten, wässrigen Lösungen vor, sondern befinden sich in der Regel in Lösungen mit einer großen Anzahl von anderen Komponenten. So ist das Cytoplasma der Zelle eine komplexe Mischung aus Wasser, Proteinen, Nukleinsäuren, (Poly-)Sacchariden, Lipiden und einer Vielzahl kleinerer organischer und anorganischer Bestandteile. Eine erschöpfende physikalisch-chemische Behandlung von Proteinen *in vivo* müsste also den Einfluss anderer Cosolventien explizit mit einbeziehen. Für vereinfachte Modelle der Proteinstabilität reicht es jedoch, sich eine ternäre Lösung aus Protein Pr , Wasser H_2O und Ligand L vorzustellen, zumal der Effekt der Destabilisierung als auch der Stabilisierung einheitlich über das Verhalten des hydratisierenden Wassers beschrieben werden kann.

Stellt man sich das Gleichgewicht zwischen vollkommen hydratisiertem Protein Pr und Protein, welches einen Liganden L gebunden hat, vor, so ist das Anbinden eines Liganden an einem Bindungsort eine Austauschreaktion mit Wassern [27]:



Demgemäß lässt sich die Gleichgewichtskonstante des Austausches K_{ex} , wie folgt formulieren [28]:

$$K_{\text{ex}} = \frac{[Pr \cdot L][H_2O]^n}{[Pr \cdot nH_2O][L]} \quad (2.9)$$

Betrachtet man die Bindung an gleichartige, nicht aufeinander einwirkende Bindungsplätze, so lässt sich die mittlere Anzahl gebundener Liganden ν_L als Funktion von $[L]$ formulieren [27] [29]:

$$\nu_L = \frac{[(K_{\text{ex}} - [H_2O]^{-1})[L]]}{1 + K_{\text{ex}}[L]} \quad (2.10)$$

Da $[H_2O] = \text{const.} = 55,56 \text{ M}$, ergibt sich für $K_{\text{ex}} > 0,018$ eine normale Adsorptionskurve die sich asymptotisch mit steigendem $[L]$ dem Wert 1 nähert. In diesem Fall spricht man von preferentieller Bindung, d.h., die Bindung des Liganden ist günstiger als die von Wasser. Ist K_{ex} kleiner als 0,018, so wird ν_L kleiner als Null und der Ligand wird vornehmlich abgestoßen bzw. Wasser wird vornehmlich an dem Bindungsplatz gebunden; man spricht dann von preferentieller

Exklusion (engl. *preferential exclusion*) bzw. preferentieller Hydratisierung [28]. In der Praxis sind die freien Bindungsenergien von Wasser ΔG_{H_2O} und der verwendeten Liganden ΔG_L nur gering unterschiedlich, sodass hohe Konzentrationen (0,2 M - 10 M) an Ligand eingesetzt werden müssen, um einen Effekt zu erzielen, weshalb von den Liganden L auch als Cosolvens gesprochen wird.

Die preferentielle Bindung von Wasser bzw. der preferentielle Ausschluss von Liganden an der Oberfläche eines Proteins hat wiederum einen Einfluss auf die Stabilität des Biomoleküls, da dieses in einem Gleichgewicht zwischen gefalteter und ungefalteter Form vorliegt, auf das die Bindung bzw. preferentielle Nichtbindung von Liganden Einfluss nehmen kann. Im vorliegenden Fall für die Entfaltung von Proteinen, muss also die Änderung der freien Entfaltungsenergie $\Delta\Delta G_{\text{unf.}}$ bei Transfer von Wasser H_2O in das Cosolvens-System L beachtet werden. Definiert man daher die *freie Transferenergie* $\Delta\mu_{Pr,\text{trans.}}$ des Proteins als Differenz des chemischen Potentials im Cosolvens-System und im rein wässrigen Medium, so gilt [28]:

$$\begin{aligned}\Delta\mu_{Pr,\text{trans.}} &= \mu_{Pr,L} - \mu_{Pr,H_2O} \\ &= \mu_{Pr,L}^0(p, T) - \mu_{Pr,H_2O}^0(p, T) \\ &\quad + RT \ln\left(\frac{a_{Pr,L}}{a_{Pr,H_2O}}\right)\end{aligned}\tag{2.11}$$

Wobei $\mu_{Pr,i}^0(p, T)$ die Standardpotentiale von Pr im System i und $a_{Pr,i}$ die entsprechenden Aktivitäten sind. Hieraus lässt sich die Änderung der freien Entfaltungsenergie bei Zugabe von Cosolventien wie folgt formulieren [30]:

$$\begin{aligned}\Delta\Delta G_{\text{unf.}} &= \Delta G_{\text{unf.,L}} - \Delta G_{\text{unf.,H}_2O} \\ &= \Delta\mu_{Pr,\text{trans.}}^D - \Delta\mu_{Pr,\text{trans.}}^N\end{aligned}$$

Letzte Formel sagt also aus, dass der Einfluss des Cosolvens auf die freie Energie der Entfaltung gleich der Differenz der freien Transferenergien von denaturierter und nativer Spezies ist. Hier wird deutlich, wie Cosolventien das Gleichgewicht zwischen nativer und denaturierter Konformation beeinflussen können: Agenzien, welche stark ans Protein binden, werden die offene, entfaltete Struktur stabilisieren und dementsprechend das Gleichgewicht in diese Richtung verschieben, während Stoffe, welche vornehmlich von der Oberfläche und damit von der Wechselwirkung mit Proteinen abgestoßen werden, den umgekehrten Effekt haben.

Neben der freien Transferenergie ist es sinnvoll, zwei weitere Größen zu definieren, die die Interaktion von Cosolvens und Protein beschreiben. Der *preferentielle Wechselwirkungsparameter*

$$\left(\frac{\partial\mu_{Pr}}{\partial[L]}\right)_{T,p,[Pr]} = \left(\frac{\partial\mu_L}{\partial[Pr]}\right)_{T,p,[L]} \quad (2.12)$$

beschreibt den Gradienten der Transferenergie mit Änderung der Cosolvens-Konzentration [28]. Entsprechend ergibt eine Integration über $[L]$ die Änderung der Transferenergie des Proteins mit steigender Ligandenkonzentration:

$$\Delta\mu_{Pr,trans.} = \int_0^{[L]} \left(\frac{\partial\mu_{Pr}}{\partial[L]}\right)_{T,p,[Pr]} d[L] \quad (2.13)$$

Der *preferentielle Bindungsparameter* beschreibt die Menge an $[L]$ die zugegeben bzw. entnommen werden müsste, um das thermodynamische Gleichgewicht des Lösungsmittelsystems nach Zugabe von Pr wiederherzustellen:

$$\left(\frac{\partial[L]}{\partial[Pr]}\right)_{T,p,\mu_L} = -\frac{\left(\frac{\partial\mu_{Pr}}{\partial[L]}\right)_{T,p,[Pr]}}{\left(\frac{\partial\mu_L}{\partial[L]}\right)_{T,p,[Pr]}} \quad (2.14)$$

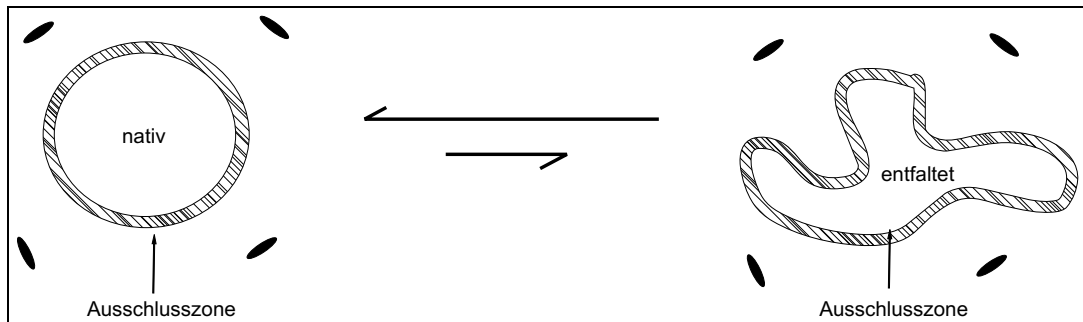


Abbildung 2.10: Schema der Proteinstabilisierung durch Cosolventien. Die Ausschlusszone im entfaltenen Zustand ist größer als im nativen. Da die Bindung der Cosolventien thermodynamisch ungünstig ist, wird das Gleichgewicht in Richtung nativer Zustand verschoben.

Hier lassen sich nun der stabilisierende und der destabilisierende Fall unterscheiden: Cosolventien, welche vornehmlich von der Oberfläche des Proteins ausgeschlossen werden ($\left(\frac{\partial[L]}{\partial[Pr]}\right)_{T,p,\mu_{H_2O}} < 0$; $\left(\frac{\partial\mu_{Pr}}{\partial[L]}\right)_{T,p,[Pr]} > 0$), stabilisieren die native Konformation, da sie bevorzugt mit dem Wasser wechselwirken. Eine Proteinentfaltung, welche sogar noch mehr unpolare Oberfläche dem Wasser exponieren würde, ist in diesem Falle energetisch sehr ungünstig (siehe Abb. 2.10). Binden die Cosolventien jedoch bevorzugt ans Protein ($\left(\frac{\partial[L]}{\partial[Pr]}\right)_{T,p,\mu_{H_2O}} > 0$; $\left(\frac{\partial\mu_{Pr}}{\partial[L]}\right)_{T,p,[Pr]} < 0$), wird die entfaltete, mehr Oberfläche exponierende Konformation stabilisiert (siehe Abb. 2.11).

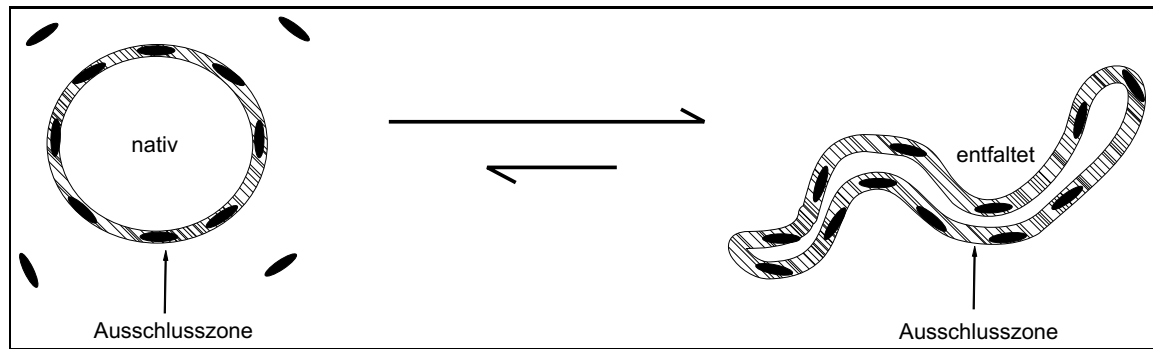


Abbildung 2.11: Schema der Proteindestabilisierung durch Cosolventien. Da die Bindung der Cosolventien thermodynamisch günstig ist, wird der entfaltete Zustand, der mehr Bindungsfläche bietet, stabilisiert.

2.6 Lysozym

Lysozym ist ein globuläres Protein, welches in Zellen und Sekreten von Vertebraten vorkommt und die Hydrolyse der glycosidischen $\beta(1 \rightarrow 4)$ -Bindung zwischen Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin im bakteriellen Mureinskelett katalysiert. Es trägt dementsprechend zur Bakterienabwehr bzw. zur Beseitigung bakterieller Überreste bei. Die Sequenz besteht aus 129 Aminosäurereste, welche über vier Disulfidbrücken vernetzt sind (C6-C127, C30-C115, C64-C80 und C76-C94) und eine molare Masse von 14.3 kD besitzt. Strukturell besteht es aus zwei Domänen, die α - und β -Domäne genannt werden. Erstere besteht im Wesentlichen aus den 4 zentralen α -Helices A, B, C und D, einer 3_{10} -Helix und zwei Schleifen. Die β -Domäne wird im Wesentlichen durch ein dreibändiges β -Faltblatt, eine 3_{10} -Helix und eine lange Schleifenregion gebildet [31]. Lysozym ist ein sehr kompaktes Molekül, welches eine nahezu ellipsoide Form mit Abmessungen von ca. $3 \times 3 \times 4.5$ nm einnimmt. Seine herausragende strukturelle Eigenschaft ist eine lange Spalte entlang des Ellipsoids, welche das Substrat bindet. Das dreibändige β -Faltblatt ist Bestandteil dieser Furche.

Abb. 2.12 zeigt eine Ansicht entlang der katalytischen Furche von Lysozym aus Hühnereiweiß. Diese Furche teilt das Protein in seine zwei Domänen: im oberen Teil des Bildes ist die α -Domäne mit den vier Haupthelices und der 3_{10} -Helix, unterhalb der Substratbindungsspalte ist das β -Faltblatt und eine weitere 3_{10} -Helix sichtbar.

Die Beschreibung von Faltungs- bzw. Denaturierungsintermediaten von HEL ist teilweise etwas uneinheitlich, da verschiedene Methoden angewandt werden können, diese Intermediate herzustellen und zu beschreiben. Während für das Molekül Lactalbumin - welches 40 % Homologie mit Lysozym aufweist, jedoch eine andere Funktion hat - seit langem ein stabiles Intermediat beschrieben ist, wird für HEL zumeist nur von einem kinetisch akkumulierten Intermediat berichtet [33, 34, 35, 36].



Abbildung 2.12: Schematische 3D-Struktur von Lysozym mit Sicht durch die katalytische Furche. Oberhalb dieser ist die α -Domäne mit den Helices zu sehen, unterhalb die β -Domäne mit dem β -Faltblatt und der 3_{10} -Helix (PDB ID 1HEL [32]).

Es finden sich aber auch Charakterisierungen von thermisch und chemisch induzierten, stabilen Intermediaten [37, 38, 39, 40, 41]. Einigkeit scheint darin zu bestehen, dass es die α -Domäne ist, welche zuerst bei der Faltung entsteht und welche am stabilsten ist [42, 43].

2.7 Elastin und elastin-mimetische Polypeptide

Elastin ist ein Strukturprotein, welches Fasern in Blutgefäßen, Lungen und Haut Elastizität verleiht, etwa 30 % des Trockengewichts von Arterien ausmacht und dementsprechend eine wichtige Rolle in den Blutgefäßen sowie bei der Entwicklung von Gefäßkrankheiten spielt [44, 45, 46]. Es ist ein hochmolekulares, hochgradig quervernetztes Polymer, welches im Wesentlichen aus kleinen, apolaren Aminosäuren wie Glycin, Alanin und Valin besteht; desweiteren findet sich Prolin [47]. Die Eigenheit, welche Elastin und elastin-ähnliche Polymere für die Proteinforschung so interessant macht, ist, dass diese mit steigender Temperatur einen Konformationswechsel von ungeordneter zu geordneter Konformation durchlaufen [48]. Dieses Phänomen wird als inverser Temperaturübergang (ITT, engl.: *inverse temperature transition*) bezeichnet und ist insofern erstaunlich, als üblicherweise Systeme mit steigender Temperatur aufgrund von $\Delta S_{\text{conf.}} > 0$ zu ungeordneteren Zuständen übergehen. Der ITT bietet so eine Möglichkeit, temperaturabhängig die Proteinfaltung zu untersuchen [49].

Es konnte gezeigt werden, dass für dieses ungewöhnliche Verhalten eine pentamere repetitive Un-

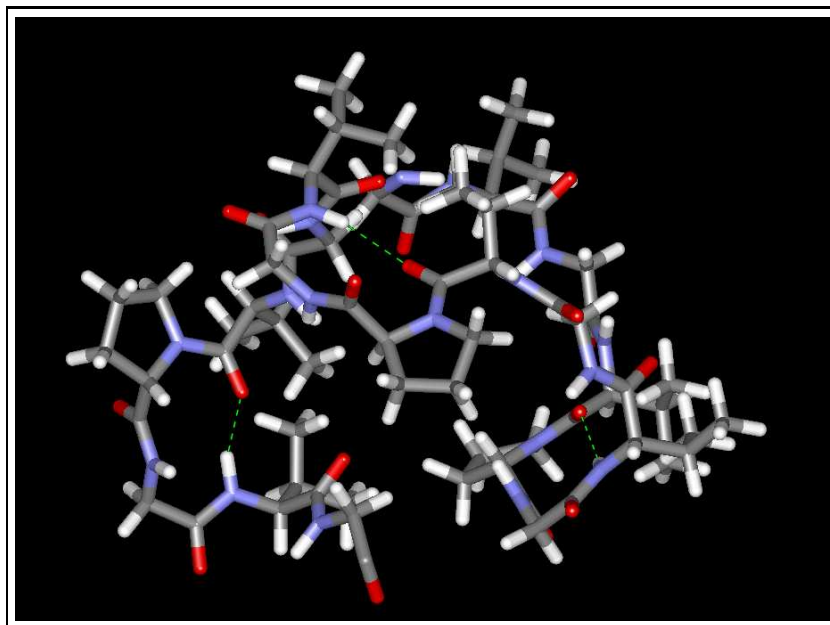


Abbildung 2.13: Dreidimensionale Darstellung von $\text{GVG}(\text{VPGVG})_3$ in der linksgängigen β -Schleifenkonfiguration. Die Wasserstoffbrücken zwischen den Valinen sind als grüne, unterbrochene Striche markiert. Die zugrundeliegende PDB-Datei wurde von Dr. Dietmar Paschek (Physikalische Chemie, Universität Dortmund) zur Verfügung gestellt.

tereinheit von Aminosäureresten verantwortlich ist, und dass dieser Konformationswechsel ein Übergang von ungeordneter Konformation zu einer Typ II- β -Helix Struktur ist (vgl. Kapitel 2.1, Abb. 2.5) [50, 51]. An einem Oktamer wurde festgestellt, dass bei sehr hohen Temperaturen (≥ 100 °C) ein weiterer Übergang stattfindet, was andeutet, dass es sich bei dem ITT wahrscheinlich um einen Kälterenaturierungsübergang bei ungewöhnlich hoher Temperatur handelt [52]. Molekular dynamische Simulationen konnten den ITT reproduzieren und durch starke Peptid-Wasser-Wechselwirkungen bei niedrigen, aber starken Peptid-Peptid-Wechselwirkungen bei hohen Temperaturen erklären [53]. Kleine, elastin-mimetische Peptide können also als Modelle für Elastin und für die Untersuchung von Hydratisierung bei der Proteinfaltung dienen und bringen dabei den Vorteil mit, kleine und damit gut charakterisierbare Systeme zu sein.

Abb. 2.13 zeigt eine dreidimensionale Darstellung des in dieser Arbeit untersuchten Polypeptids $\text{GVG}(\text{VPGVG})_3$, wenn sich alle pentameren Untereinheiten in der β -Schleifenkonfiguration befinden. Dieses Molekül besitzt drei dieser pentameren Einheiten und kann dementsprechend drei β -Schleifen des Typs II ausbilden.

Kapitel 3

Methoden

3.1 NMR: Grundlagen

Verglichen mit anderen Spektroskopiemethoden wie FT-IR, UV/VIS oder CD bietet die NMR-Spektroskopie eine weit größere Anzahl von Experimenten mit einer dementsprechend breiteren Palette von Informationen, die erhalten werden können. Dies liegt einerseits daran, dass verschiedene Kerne angeregt und detektiert werden können, andererseits kann diese Anregung gemäß bestimmter Pulsfolgen geschehen, bei denen Anregungspulse und Relaxationsintervalle so gewählt werden können, dass eine bestimmte Information erhalten werden kann.

Grundlage eines jeden NMR-Experiments ist eine Probe, die sich in einem statischen Magnetfeld \vec{B}_0 befindet. Kerne mit einer Kernspinnquantenzahl $I = 1/2$ wie z.B. ^1H oder ^{13}C können zwei mögliche Orientierungen einnehmen: in Richtung oder in Gegenrichtung des Feldes \vec{B}_0 . Da der α -Zustand, bei dem die Spins in Richtung des Feldes weisen, im thermodynamischen Gleichgewicht etwas höher populierte ist als der β -Zustand, besteht eine makroskopische Magnetisierung \vec{M}_0 in z -Richtung d.h. in Richtung des Feldes \vec{B}_0 (vgl. Abb. 3.1).

Durch einen Störpuls \vec{B}_1 kann das System aus seiner Gleichgewichtslage ausgelenkt werden. Dadurch kann das Besetzungsverhältnis zwischen N_α und N_β verändert werden, was eine Änderung der Magnetisierung entlang der z -Achse, also in longitudinaler Richtung, bewirkt. Weiterhin führt der Puls zu einer Kohärenz zwischen den Spins, welche im Gleichgewicht zufällig auf der Oberfläche eines Kegelmantels verteilt sind. Dies bewirkt eine transversale Magnetisierung in der x - y -Ebene. Wechselt man von einem unbewegten in ein um die z -Achse rotierendes Koordinatensystem x' - y' - z , so wird durch ein Puls aus x' -Richtung die makroskopische Magnetisierung in die y' - z -Ebene gedreht. Bei konstanter Pulsstärke kann durch Variierung der Pulslängen \vec{M} um definierte Winkel

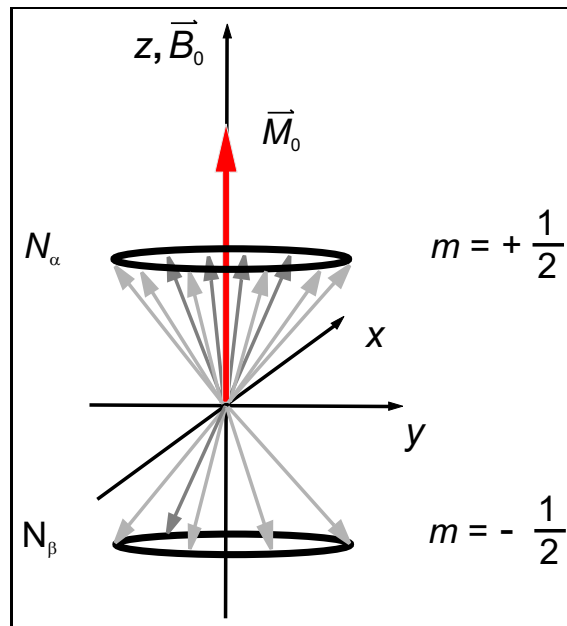


Abbildung 3.1: Vektormodell für ein Ensemble von Spins mit der Kernspinquantenzahl $I = 1/2$ im thermodynamischen Gleichgewicht. Es bestehen zwei Ausrichtungsmöglichkeiten, eine in Richtung des angelegten Magnetfeldes \vec{B}_0 ($m = +1/2$) und eine entgegen \vec{B}_0 ($m = -1/2$). Da die Anzahl der Kerne im α -Zustand (N_α) größer ist als im β -Zustand, resultiert hieraus eine makroskopische Magnetisierung \vec{M}_0 .

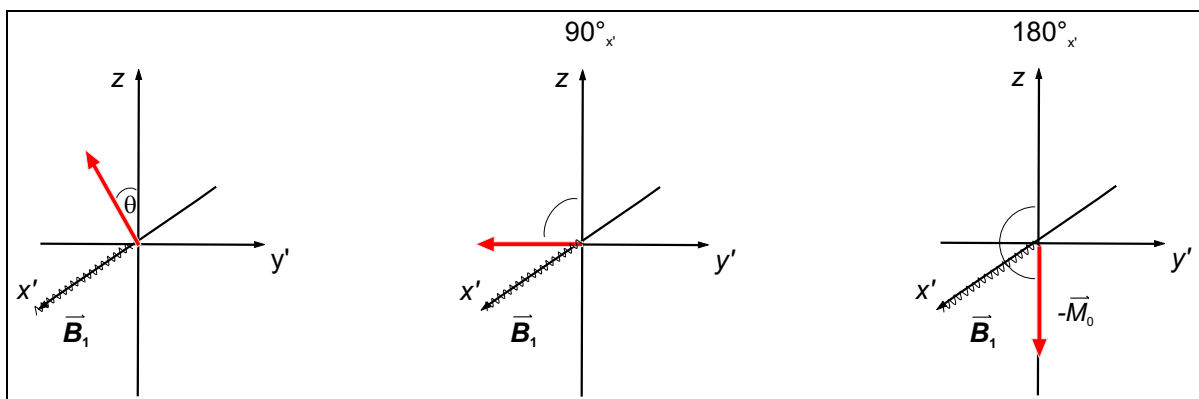


Abbildung 3.2: Betrachtung der Auslenkung der makroskopischen Magnetisierung \vec{M} im rotierenden Koordinatensystem $x'-y'-z$. Durch einen Puls \vec{B}_1 , welcher senkrecht zu \vec{B}_0 angelegt wird, kann die Magnetisierung \vec{M} in die $y'-z$ -Ebene ausgelenkt werden. Der Auslenkungswinkel θ ist eine Funktion der Pulsstärke von \vec{B}_1 und der Pulsdauer τ_P . Bei konstanter Pulsstärke kann τ_P so gewählt werden, dass \vec{M} z.B. um 90 oder 180° ausgelenkt wird.

ausgelenkt werden (vgl. Abb. 3.2).

Nach dem Abschalten des Anregungspulses, kehrt das System wieder in das thermodynamische Gleichgewicht zurück. Dies kann über zwei Wege geschehen: Durch Spin-Spin-Wechselwirkungen, welche rein entropisch sind und keinen Energieumsatz leisten, kann die transversale Magnetisierung mit einer charakteristischen Relaxationszeit T_2 wieder ins Gleichgewicht zurückkehren. Spin-Gitter-Wechselwirkungen, d.h. Interaktionen des Spins mit der Umgebung, ermöglichen die longitudinale Relaxation mit der Relaxationszeit T_1 . Betrachtet man die Situation in einem mit der Larmorfrequenz $\omega_0 = \gamma B_0$ rotierenden Koordinatensystem unmittelbar nach Abschalten des Pulses, so wird jede Spinsorte mit einer charakteristischen relativen Frequenz Ω beginnen, um die z-Achse zu präzedieren. Im ruhenden System kann dies durch eine Spule als zeitabhängiges Signal, den sog. FID (engl.: *free induction decay*), gemessen werden.

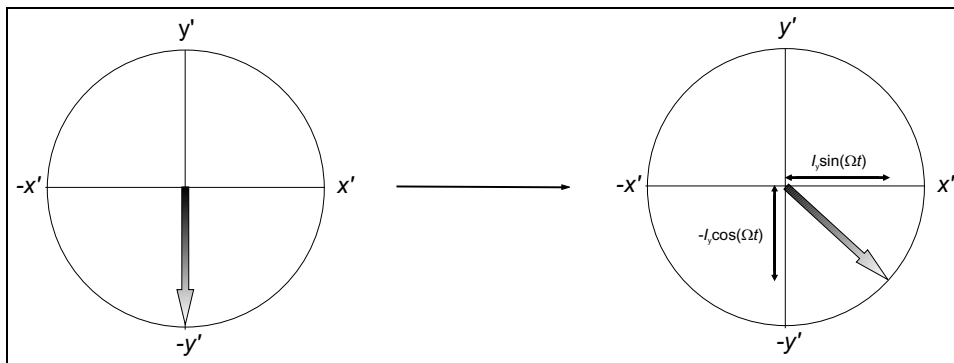


Abbildung 3.3: Nach Applikation eines 90°_x -Pulses wird die Magnetisierung im rotierenden Koordinatensystem in die y' - z -Ebene ausgelenkt. Betrachtet man nur eine Sorte Spins, so wird die Magnetisierung nach Abschalten des Pulses um die z -Achse mit der Frequenz Ω präzedieren. Dies kann von einem phasempfindlichen Detektor als zwei Komponenten $I_y \cos(\Omega t)$ und $I_x \sin(\Omega t)$ detektiert werden. (Ansicht aus Richtung der $+z$ -Achse; Ω ist die relative Rotationsfrequenz $\omega - \omega_0$).

Das Gesamtsignal $S(t)$, das gemessen wird, ist die Summe dieser Beiträge aller Spinsorten i multipliziert mit den jeweiligen Amplituden a_i sowie dem Zerfallsterm $e^{-t/T_{2,i}}$:

$$\begin{aligned} S(t) &= \sum_i a_i (\cos(\Omega_i t) + i \sin(\Omega_i t)) e^{-t/T_{2,i}} \\ &= e^{i\Omega_i t} e^{-t/T_{2,i}} \end{aligned} \quad (3.1)$$

Durch Fouriertransformation von $S(t)$ kann das Frequenzspektrum $S(\omega)$ erhalten werden:

$$S(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} S(t) \cos(\omega t) dt \quad (3.2)$$

3.1.1 2D-Spektren

Bei 2D-NMR-Spektren wird die Intensität eines Signals als Funktion zweier Frequenzen gemessen, d.h. bei der Messung müssen zwei Zeitdomänen detektiert werden, mit denen über eine Fourier-Transformation die Frequenzen erhalten werden können. Dies wird durch eine Erweiterung der Pulsfrequenz erreicht: Es wird eine variable Evolutionszeit t_1 eingeführt, in der die Spins untereinander wechselwirken können. Das grundlegende 2D-Experiment besteht demnach aus Präparationsphase, Evolutionsphase, Mischphase und Detektionsphase. In der Präparationsphase werden die Spins nach erfolgter thermischer Relaxation durch einen oder mehrere Puls(-e) angeregt. In der folgenden Evolutionsphase können sich die Spins durch Wechselwirkung mit dem statischen Magnetfeld B_0 oder untereinander entwickeln. Die Mischzeit ist so beschaffen, dass die gewünschte Korrelation in der Detektionsphase in Form von transversaler Magnetisierung vorliegt. Ein 2D-Experiment ist also eine Abfolge von 1D-Experimenten, in denen t_1 inkrementiert wird, aus denen man ein Array von FIDs erhält, die durch Fourier-Transformation nach t_2 und t_1 das 2D-Spektrum ergeben. Im Folgenden sollen die Pulsfolgen der 2D-NMR-Methoden besprochen werden, welche in dieser Arbeit eingesetzt werden.

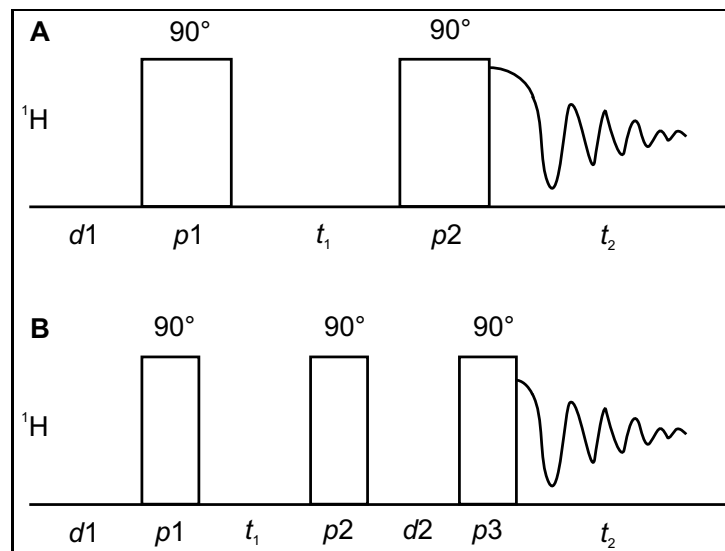


Abbildung 3.4: Pulssequenzen der homonuklearen COSY- (A) und NOESY (B)-Methode.

Die homonukleare 2D-COSY-Methode erlaubt die Bestimmung skalarer Kopplungen zwischen den Protonen einer Probe. Betrachtet man z.B. zwei skalar koppelnde Kerne A und X, so werden nach Applikation eines 90°-Pulses (Abb. 3.4) die makroskopischen Magnetisierungsvektoren \vec{M}_A und \vec{M}_X in die x - y -Ebene gedreht. Da die beiden Spezies jedoch skalar miteinander koppeln, wer-

den die entsprechenden Vektoren in der x - y -Ebene mit den vier Frequenzen $\omega_A \pm J(A,X)/2$ und $\omega_X \pm J(A,X)/2$ rotieren. Durch diese Unterschiede werden die vier Vektoren sich in der x - y -Ebene auffächern. Der zweite 90° -Puls dreht die y -Komponenten in die $+z$ - bzw. $-z$ -Richtung. Wieviel Magnetisierung dabei transferiert wird, hängt von t_1 ab. Die verbliebene Magnetisierung der x -Komponente, welche ebenfalls von t_1 , ω_A , ω_B und $J(A,X)$ abhängt, kann als FID detektiert werden.

Um räumliche Nähe zwischen zwei Protonen nachzuweisen und zu quantifizieren, wird die homonukleare 2D-NOESY-Methode verwendet. Wie oben bereits angedeutet, verläuft die Relaxation eines Spins in z -Richtung über Wechselwirkungen mit seiner Umgebung. Um diesen Anteil herauszufiltern, wird zunächst die makroskopische Magnetisierung mit einem 90° -Puls in die x - y -Ebene ausgelenkt (Abb. 3.4 B). Innerhalb der Evolutionszeit t_1 können die Spins wechselwirken. Durch einen 90° -Puls werden die Spins in die $-z$ -Richtung gedreht und können während der sog. Mischzeit $d2$ Magnetisierung mit der Umgebung austauschen. Ein letzter 90° -Puls dreht die verbliebenen Spins zurück in die x - y -Ebene, wo sie als FID gemessen werden können.

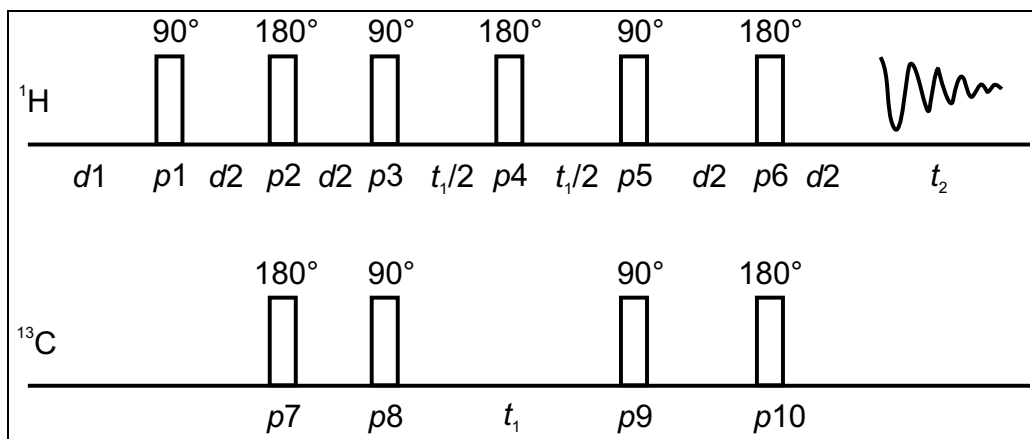


Abbildung 3.5: Grundlegende Pulssequenz der HSQC-Methode.

Neben homonuklearen sind aber auch heteronukleare Wechselwirkungen detektierbar. Derlei Spektren sind insbesondere bei der Zuordnung von Signalen von großem Wert. Eine grundlegende Methode ist hier das sog. HSQC-Experiment, welches auf der INEPT-Sequenz basiert (siehe Abb. 3.5). Hiermit ist es möglich, skalare Konnektivitäten zwischen Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen nachzuweisen, mit der HMBC-Pulssequenz können sogar Konnektivitäten über mehrere Bindungen hinweg bestimmt werden. Durch einen 90° -Puls wird die Magnetisierung der Wasserstoffe \vec{M}_H in die x - y -Ebene ausgelenkt. Falls jedoch eine Kopplung mit ^{13}C -Kernen im α - bzw. β -Zustand besteht, werden aber zwei Magnetisierungen $\vec{M}_H^{C\alpha}$ und $\vec{M}_H^{C\beta}$ vorhanden sein, deren Frequenzen um $J(C,H)$ voneinander abweichen. Nach einer Pause von $d2 = 1/(4J(C,H))$ wird die Phasendifferenz zwischen

diesen beiden Vektoren 90° sein und ein 180° -Puls wird auf beiden Kanälen appliziert. Dies lenkt die Magnetisierung der Kohlenstoffkerne in die $-z$ -Richtung aus, d.h. ^{13}C -Kerne im α -Zustand wechseln zum β -Zustand und umgekehrt. Dementsprechend wird $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\alpha}$ zu $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\beta}$ und $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\beta}$ zu $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\alpha}$. Nach einer weiteren Pause von $d2 = 1/(4J(\text{C}, \text{H}))$ beträgt die Phasendifferenz zwischen beiden Vektoren 180° und ein 90° -Puls rotiert $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\alpha}$ in die $+z$ - und $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\beta}$ in die $-z$ -Richtung. Die Magnetisierungen der Kohlenstoffkerne $\vec{M}_\text{C}^{\text{H}\alpha}$ und $\vec{M}_\text{C}^{\text{H}\beta}$ liegen ebenfalls um 180° phasenverschoben vor, allerdings in der transversalen Ebene. Nun können sich \vec{M}_C -Vektoren während einer variierenden Zeit t_1 entwickeln, während ein 180° -Puls dafür sorgt, dass die beiden Vektoren $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\alpha}$ und $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\beta}$ am Ende von t_1 antiparallel vorliegen. Ein 90° -Puls lenkt die \vec{M}_C -Vektoren in z -Richtung aus und invertiert so die Populationen N_α und N_β der Kohlenstoffkerne, was dazu führt, dass die Magnetisierungen $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\alpha}$ und $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\beta}$ wechseln. Ähnlich wie oben die Polarisation von den Wasserstoffen zu den Kohlenstoffen übertragen wurde, wird nun in einer umgekehrten INEPT-Operation die Polarisation auf die Wasserstoffe übertragen. Nun liegen die zwei \vec{M}_H -Vektoren in Antiphase vor und sind durch die ^{13}C -Resonanzen moduliert. Nach einer Dauer von $2 \cdot d2$ liegen $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\alpha}$ und $\vec{M}_\text{H}^{\text{C}\beta}$ refokussiert vor und können als FID gemessen werden (der abschließende 180° -Puls dient nur zur Signalverbesserung).

3.1.2 Das NMR-Spektrum von Proteinen

Prinzipiell ist die NMR-Spektroskopie in der Lage, jeden Atomkern mit einer Kernspinquanzenzahl ungleich Null bzw. im Falle der ^1H -NMR jedes Proton in einem Protein zu detektieren. Da diese jedoch sehr komplexe, große Moleküle sind, limitieren diese Randbedingungen durch Überlagerungen von Signalen die Informationen, die man einem NMR-Spektrum entnehmen kann. Die Peptidbindung und die Natur der Aminosäureseitenketten bestimmen im Wesentlichen das Aussehen eines Protein-Spektrums: Abb. 3.6 zeigt das Konturdiagramm eines 2D-COSY-Spektrums von HEL. Die Bereiche, in denen typischerweise bestimmte skalare Kopplungen vorzufinden sind, sind mit Rechtecken markiert. Diese Verteilung ist nicht nur für Proteine, sondern auch für Polypeptide wie GVG(VPGVG)₃, gültig.

Im Tiefeldbereich liegen hauptsächlich die Kreuzkorrelationssignale aliphatischer Protonen unpolarer Seitenketten. Mit ansteigendem Feld finden sich zunehmend die Signale entschirmter Protonen und im Bereich 3-6 ppm, wo sich auch das Signal der Wasserprotonen befindet, liegen zumeist die Signale der entschirmten α -Protonen. Im Hochfeldbereich befinden sich die Signale aromatischer Protonen im Bereich um 7 ppm und die Signale der Amidprotonen im selbigen Bereich und höher. Daher sind die Kreuzkorrelationssignale der Amid- und α -Protonen in dem Bereich zu finden, der im 2D-Spektrum durch die Frequenzbereiche von 3-6 ppm und 6-10 ppm definiert ist. Diese sind

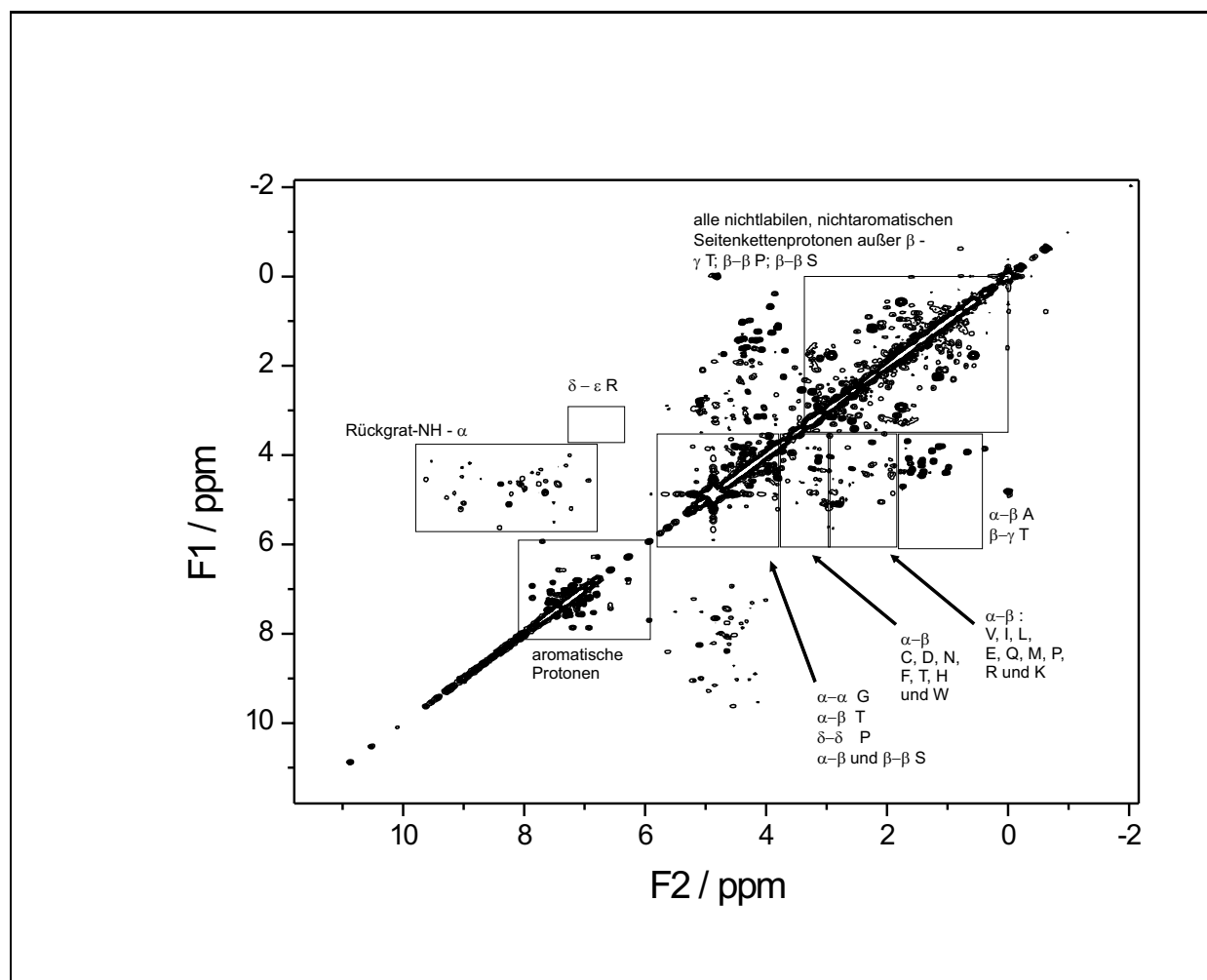


Abbildung 3.6: 2D-COSY-Spektrum von HEL. Rechtecke markieren die Bereiche, in denen die angegebenen Kopplungen typischerweise zu finden sind.

von speziellem Interesse, da sie es sind, welche die Protonenaustausch- ^1H -NMR ermöglichen: der Austausch von Amidprotonen durch Deuteronen macht sich im oben genannten Bereich durch eine Abnahme der Signalintensität bemerkbar.

3.2 Protonen-Austausch ^1H -NMR

Die Protonen-Austausch- ^1H -NMR ermöglicht auf relativ einfache Weise, Strukturänderungen in Proteinen nachzuweisen. Grundlegendes Prinzip ist, dass das gewünschte Protein in Deuteriumoxid-Puffer gelöst und den zu untersuchenden Bedingungen (z.B. Hitze, Chemikalien) ausgesetzt wird. Labile Protonen, welche an der Oberfläche des Proteins dem Deuteriumoxid ausgesetzt und auch nicht über Wasserstoffbrücken stabilisiert sind, werden sehr schnell durch Deuteronen ersetzt, wäh-

rend Protonen, welche sich im Innern bzw. in strukturierten Bereichen des Proteins befinden oder durch Wasserstoffbrücken stabilisiert sind, wesentlich langsamer austauschen. Die Austauschrate k_{obs} eines Amidprotons enthält also Informationen über den Grad an nativer Struktur in seiner Umgebung. Um diese quantitativ abzuschätzen, muss die Austauschrate k_{rc} desselben Amidprotons in der Zufallsknäuelkonformation bekannt sein; d.h. für dasselbe Amidproton muss die Austauschrate als Funktion des pHs, der Temperatur und der flankierenden Seitenreste berechenbar sein. Zunächst einmal wird die Gesamtaustauschrate k_{ex} die Summe der einzelnen Austauschraten k_{A} , k_{B} und k_{W} der am Austausch beteiligten Katalysatoren sein, hier der Säure A (D^+), der Base B (OD^-) und dem wasservermittelten Austausch W (D_2O) [54]:

$$\begin{aligned} k_{\text{ex}} &= k_{\text{A}}10^{-\text{pD}} + k_{\text{B}}10^{\text{pD}-\text{pK}_{\text{D}}} + k_{\text{W}} \\ &= k_{\text{Säure}} + k_{\text{Base}} + k_{\text{Wasser}} \end{aligned} \quad (3.3)$$

wobei K_{D} die Dissoziationskonstante von D_2O ist. Der Einfluss benachbarte Seitenketten wird durch empirisch ermittelte Werte A_{L} , A_{R} , B_{L} und B_{R} berücksichtigt, wobei die Indices R und L andeuten, dass der Rest in Richtung des Amino-Terminus bzw. des Carboxyl-Terminus des betrachteten Amids liegt und A_i und B_i für die flankierenden Aminosäurereste spezifische Konstanten sind. Die zu erwartende Austauschrate eines Amidprotons in einer Zufallsknäuel-Umgebung ergibt sich damit zu:

$$k_{\text{rc}} = k_{\text{A,ref}}(A_{\text{L}} \times A_{\text{R}})[\text{D}^+] + k_{\text{B,ref}}(B_{\text{L}} \times B_{\text{R}})[\text{OD}^-] + k_{\text{W,ref}}(B_{\text{L}} \times B_{\text{R}}) \quad (3.4)$$

Wobei $k_{i,\text{ref}}$ eine empirisch ermittelte Austausch-Referenzkonstante einer Referenzsubstanz ist (hier: Poly-D/L-Alanin). So können dann die einzelnen Austauschraten, z.B. $k_{\text{Säure}}$, berechnet werden:

$$\log(k_{\text{Säure}}) = \log(k_{\text{A,ref}}) + \log(A_{\text{L}}) + \log(A_{\text{R}}) - \text{pD} \quad (3.5)$$

Der Einfluss von Temperatur und Druck kann bei bekannter Aktivierungsenergie und bekannten Aktivierungssvolumen berücksichtigt werden [55]:

$$k_i(T) = k_i(293\text{K})e^{-\frac{E_{\text{a},i}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{293}\right)} \quad (3.6)$$

$$k_i(p) = k_i(p_0)e^{-\frac{\Delta V_i^\ddagger}{RT}(p-p_0)} \quad (3.7)$$

Mit bekanntem k_{rc} und gemessenem k_{obs} kann der sog. Schutzfaktor P , d.h. der Grad der Abschirmung eines gegebenen Amidprotons verglichen mit demselben Proton in einer Zufallsknäuel-Umgebung, berechnet werden:

$$P = \frac{k_{rc}}{k_{obs}} \quad (3.8)$$

Das bedeutet, je größer P , desto strukturierter ist die Umgebung des betreffenden Amid-Protons; Werte um 1 deuten an, dass die Umgebung des Protons einer Zufalls-Knäuel-Konformation gleicht. Für den Schutz gegen Austausch sind hauptsächlich Wasserstoffbrücken und im geringeren Maße auch das „Verborgensein“ des Amidprotons im Innern des Proteins verantwortlich [56]. Abb. 3.7 zeigt ein Schema des Ablaufs eines typischen Protonen-Austausch-Experiments: zunächst wird die Probe den denaturierenden Bedingungen ausgesetzt (Abb. 3.7 A); in der nativen Form ist der Austausch für die meisten Protonen vernachlässigbar klein, in ungefalteter oder teilweise entfalteter Form wird er aber signifikant. Nach einer definierten Zeit t wird die Probe entnommen und das Protein faltet sich zurück in die native Form, in der der Austausch vernachlässigbar langsam ist. Nun kann diese Probe im Gefrierschrank aufbewahrt und zu einer beliebigen Zeit das 2D-COSY-Spektrum gemessen werden (Abb. 3.7 B). Die C- α -Amid-Kreuzkorrelationssignale können integriert und gegen die jeweilige Expositionszeit unter den denaturierenden Bedingungen aufgetragen werden. Es ergibt sich ein logarithmischer Abfall. Je länger die Probe (teil-)entfaltet war, desto mehr Protonen wurden ausgetauscht. Durch die Punkte kann ein logarithmischer Fit der Form

$$I_i(t) = I_{back,i} + I_{0,i} \cdot e^{-k_{obs,i} \cdot t} \quad (3.9)$$

gelegt werden (Abb. 3.7 C), der die gemessene Austauschrate k_{obs} des Restes i ergibt (wobei $I(t)$ die Intensität des Kreuzkorrelationssignals zur Zeit t , I_0 die Intensität zur Zeit $t = 0$ und I_{back} die zeitunabhängige Hintergrundintensität ist). Die berechnete Austauschrate k_{rc} wird durch die gemessene Austauschrate dividiert und ergibt damit den Schutzfaktor P (Abb. 3.7 D). Der Schutzfaktor kann gegen die Sequenz eines Proteins aufgetragen werden und erlaubt damit eine Übersicht über die strukturierten (hohes P) und unstrukturierten Bereiche (niedriges P) eines Proteins unter den untersuchten Bedingungen. Im Rahmen des einfachsten Modells interpretiert, korreliert ein Schutzfaktor von 5 mit einer Besetzung von 80 % mit der Population, welche vollen Schutz bietet; Amidprotonen in nativer Umgebung hingegen können Schutzfaktoren von größer als 10^6 aufweisen [57].

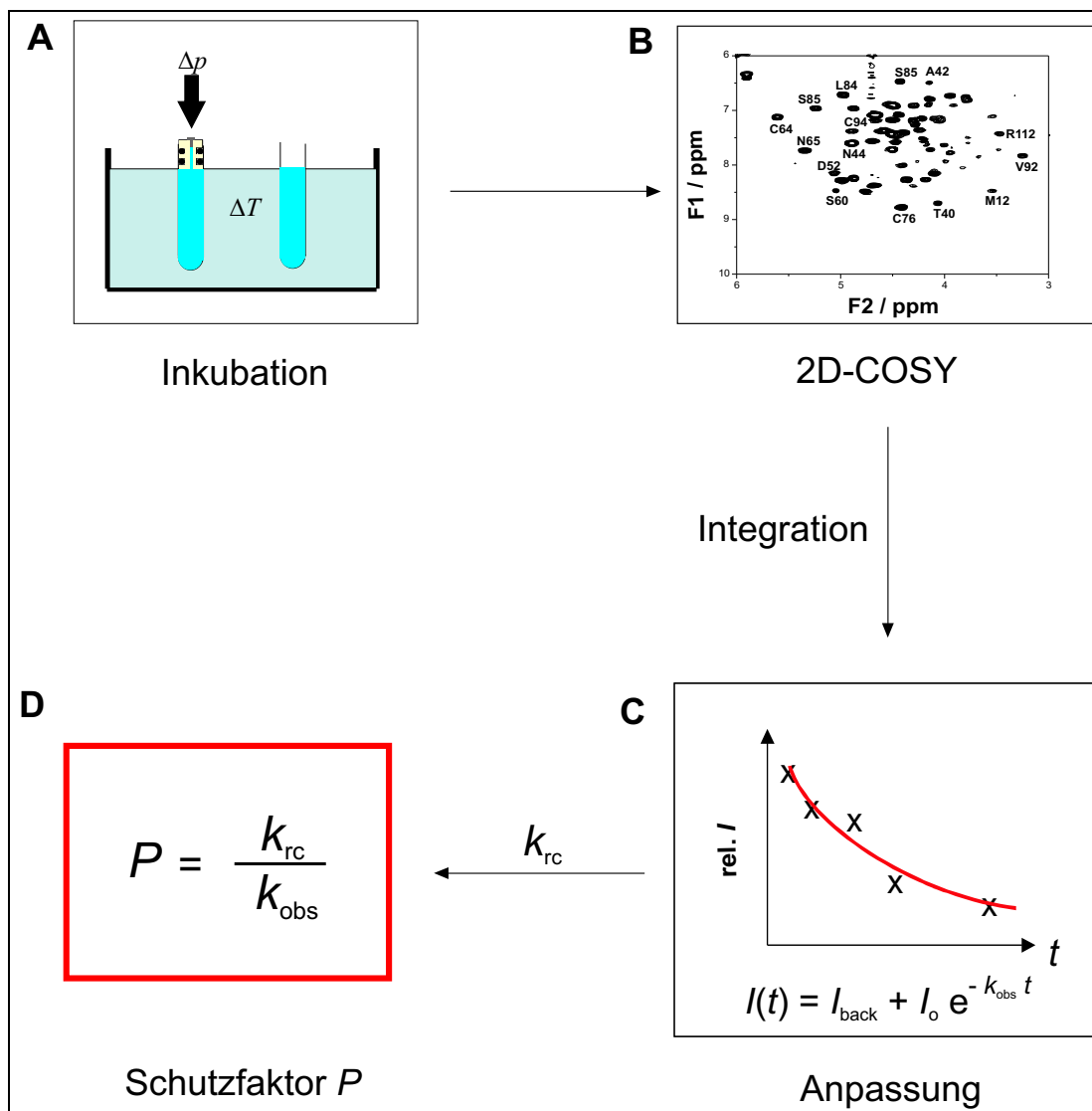


Abbildung 3.7: Prozess der Schutzfaktorenbestimmung; die Probe wird unter denaturierenden Bedingungen inkubiert (z.B. Δp : Druckänderung oder ΔT : Temperaturänderung) (A) und das 2D-COSY-Spektrum bestimmt (B). Integration der Amid- $C\alpha$ -Korrelations-Signale, deren Werte gegen die Inkubationszeit t aufgetragen werden, liefern einen annähernd logarithmischen Verlauf (C), aus dessen logarithmischer Anpassung die beobachtete Austauschrate k_{obs} berechnet werden kann. Zusammen mit k_{rc} ergibt sich der Schutzfaktor P (D).

3.3 ^{13}C - T_1 -Relaxationszeiten

Wie im Kapitel 3.1 bereits erwähnt, ist die longitudinale Relaxation auf Spin-Gitter-Wechselwirkungen zurückzuführen. Die Relaxationszeit T_1 enthält jedoch nicht nur Informationen über die Umgebung eines Spins, sondern auch über die Dynamik, der der Spin unterliegt. Betrachtet man den einfachsten Fall, dass ein ^{13}C -Kern mit einem ^1H -Kern dipolar magnetisch koppelt, so ergeben sich die in Abb. 3.8 dargestellten Zustände:

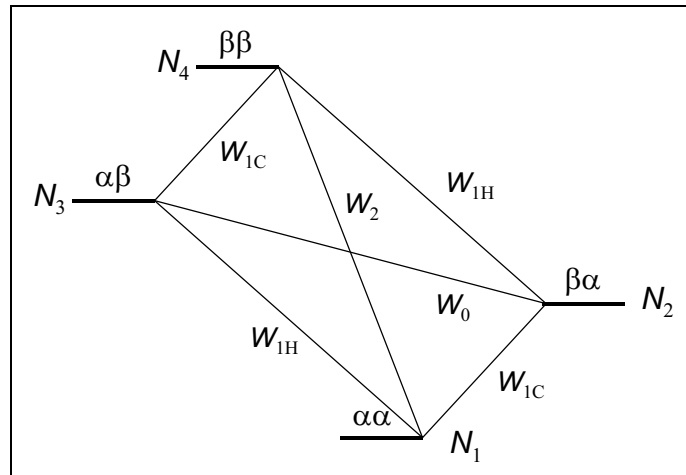


Abbildung 3.8: Energieschema der Kopplung eines ^{13}C -Kerns mit einem ^1H -Kern. Im Grundniveau zeigen beide Spins in Richtung von \vec{B}_0 ($\alpha\alpha$), im energetisch ungünstigsten Fall zeigen beide in Gegenrichtung ($\beta\beta$). Die möglichen Übergänge zwischen den einzelnen Zuständen sind durch W_0 , W_2 , $W_{1\text{C}}$ und $W_{1\text{H}}$ gekennzeichnet.

Änderungen der Besetzungsniveaus N_i werden durch folgende Differentialgleichungen beschrieben:

$$\frac{dN_1}{dt} = -(W_{1\text{H}} + W_{1\text{C}} + W_2)N_1 + W_{1\text{C}}N_2 + W_{1\text{H}}N_3 + W_2N_4 \quad (3.10)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = W_{1\text{C}}N_1 - (W_0 + W_{1\text{C}} + W_{1\text{H}})N_2 + W_0N_3 + W_{1\text{H}}N_4 \quad (3.11)$$

$$\frac{dN_3}{dt} = W_{1\text{H}}N_1 + W_0N_2 - (W_0 + W_{1\text{C}} + W_{1\text{H}})N_3 + W_{1\text{C}}N_4 \quad (3.12)$$

$$\frac{dN_4}{dt} = W_2N_1 + W_{1\text{H}}N_2 + W_{1\text{C}}N_3 - (W_2 + W_{1\text{H}} + W_{1\text{C}})N_4 \quad (3.13)$$

Durch Definition der Besetzungszahlen für die ^1H - und ^{13}C -Kernniveaus

$$n_{\text{C}} = N_1 - N_2 + N_3 - N_4 \quad (3.14)$$

$$n_{\text{H}} = N_1 + N_2 - N_3 - N_4 \quad (3.15)$$

und den Übergangswahrscheinlichkeiten ρ_{H} , ρ_{C} und σ

$$\rho_{\text{H}} = W_2 + 2W_{1\text{H}} + W_0 \quad (3.16)$$

$$\rho_{\text{C}} = W_2 + 2W_{1\text{C}} + W_0 \quad (3.17)$$

$$\sigma = W_2 - W_0 \quad (3.18)$$

lassen sich die Änderung der Besetzungszahlen für ^1H und ^{13}C separat darstellen:

$$\frac{dn_{\text{H}}}{dt} = -\rho_{\text{H}}(n_{\text{H}} - n_{\text{H}}^0) - \sigma(n_{\text{C}} - n_{\text{C}}^0) \quad (3.19)$$

$$\frac{dn_{\text{C}}}{dt} = -\rho_{\text{C}}(n_{\text{C}} - n_{\text{C}}^0) - \sigma(n_{\text{H}} - n_{\text{H}}^0) \quad (3.20)$$

wobei n_{H}^0 und n_{C}^0 die jeweiligen Besetzungszahlen im thermodynamischen Gleichgewicht sind. Werden bei der Messung die Protonen entkoppelt, so wird n_{H} zu Null und die zeitliche Änderung von n_{C} ist nur noch eine Funktion des ersten Terms ρ_{C} . Der reziproke Wert von ρ_{C} bestimmt die longitudinale Relaxationszeit T_1 :

$$\frac{1}{\rho_{\text{C}}} = T_1 \quad (3.21)$$

Mit Hilfe der Störungstheorie können auch die Übergangswahrscheinlichkeiten W_i berechnet werden [58]:

$$W_0 = \frac{1}{10} K^2 \frac{\tau_{\text{c}}}{1 + (\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{C}})^2 \tau_{\text{c}}^2} \quad (3.22)$$

$$W_{1\text{C}} = \frac{3}{20} K^2 \frac{\tau_{\text{c}}}{1 + \omega_{\text{C}}^2 \tau_{\text{c}}^2} \quad (3.23)$$

$$W_{1\text{H}} = \frac{3}{20} K^2 \frac{\tau_{\text{c}}}{1 + \omega_{\text{H}}^2 \tau_{\text{c}}^2} \quad (3.24)$$

$$W_2 = \frac{3}{5} K^2 \frac{\tau_c}{1 + (\omega_H + \omega_C)^2 \tau_c^2} \quad (3.25)$$

$$\text{mit } K = \frac{\gamma_H \gamma_C \hbar}{r^3} \quad (3.26)$$

wobei γ_C und γ_H die gyromagnetischen Verhältnisse von Kohlenstoff bzw. Wasserstoff und r der Abstand zwischen den beiden Kernen ist. τ_c ist die Rotationskorrelationszeit, welche als die Zeit definiert ist, die ein Teilchen benötigt, um sich um einen Radian zu drehen. Aus den Gleichungen 3.22 bis 3.25 und 3.17 lässt sich für reine dipolare Relaxation unter ^1H -Entkopplung im *extreme narrowing limit* folgende Relation für T_1 finden:

$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{4\pi}{\mu_0} \right)^2 \frac{n \gamma_H^2 \gamma_C^2 \hbar^2}{r^6} \tau_c \quad (3.27)$$

wobei n die Anzahl der an dem Kohlenstoffatom gebundenen Wasserstoffe und μ_0 die Permeabilitätskonstante im Vakuum ist. Diese Formel stellt eine gute Näherung für die dipolare Relaxation zwischen direkt verbundenen Kohlenstoff- und Wasserstoffkernen dar, für nicht direkt verbundene Kerne ist sie nur eine grobe Näherung.

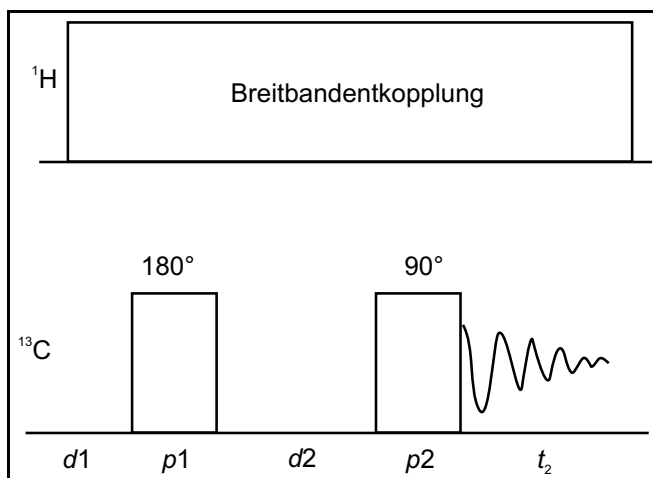


Abbildung 3.9: Pulsschema des *inversion recovery*-Experiments zur Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit T_1 der ^{13}C -Kerne unter Breitbandentkopplung der Protonen.

T_1 ist also invers proportional zur Rotationskorrelationszeit τ_c und damit ein direktes Maß für die Beweglichkeit eines Kerns bzw. seiner direkten Umgebung. Aufgrund der inversen Proportionalität zu τ_c ist T_1 proportional zur Rate der Drehbewegung der Teilchen, sodass für T_1 die Arrhenius-Gleichung gilt [59]:

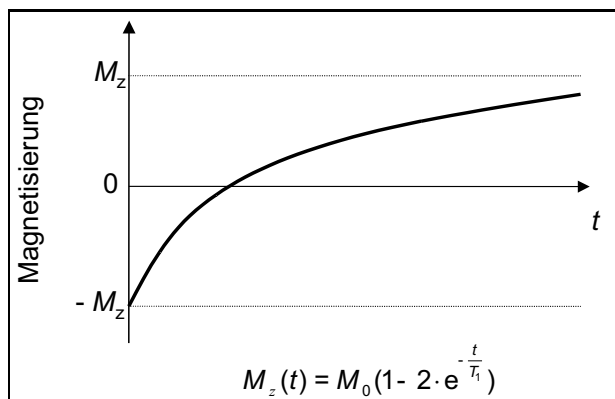


Abbildung 3.10: Zeitlicher Verlauf der Magnetisierung in z -Richtung nach Applikation von $p1$.

$$\ln(T_1) = \left(-\frac{E_a}{R}\right) \frac{1}{T} + \ln A \quad (3.28)$$

Experimentell wird T_1 über die sog. *inversion recovery*-Pulssequenz bestimmt. Abb. 3.9 zeigt die Pulssequenz dieser Methode: nach einer Wartezeit $d1$, die mindestens $5 \times T_1$ betragen sollte, damit die z -Magnetisierung wieder in das thermodynamische Gleichgewicht relaxieren kann, wird ein 180° -Puls auf die ^{13}C -Spins appliziert; die ^1H -Kerne werden während der ganzen Messung entkoppelt. In der Pause $d2$ können die Spins aus der $-z$ -Richtung in die $+z$ -Richtung relaxieren. Ein 90° -Puls kippt die verbliebenen Spins in die x - y -Ebene, wo sie als FID registriert werden. Das Intervall $d2$ wird inkrementiert, so dass man 1D-Spektren als Funktion dieser Intervalldauer erhält: direkt nach Applikation des Pulses $p1$ - d.h. bei kleinen $d2$ -Werten - wird die Magnetisierung in $-z$ -Richtung liegen und mit wachsendem $d2$ wird sie zurück zur $+z$ -Richtung, ins thermodynamische Gleichgewicht, relaxieren (vgl. Abb. 3.10). Die Höhe der Signale im Spektrum kann ausgemessen und gegen die Zeit t aufgetragen werden. Durch eine Anpassung gemäß der Formel

$$M_z(t) = M_0(1 - 2e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (3.29)$$

kann dann T_1 bestimmt werden (wobei M_0 die Gleichgewichtsmagnetisierung ist).

3.4 DSC und PPC

DSC (eng.: *differential scanning calorimetry*) und PPC (engl.: *pressure perturbation calorimetry*) sind zwei mikrokalorimetrische Verfahren, um die Wärmekapazität bzw. den thermischen Ausdehnungskoeffizienten α eines Biomoleküls in Abhängigkeit der Temperatur T zu bestimmen. Bei der DSC wird eine Probe und eine Referenzprobe langsam im Quasigleichgewicht erhitzt und durch Abgleich

mit der Referenzprobe der reversible Nettowärmefluss ΔQ_{rev} in Abhängigkeit der Temperatur T bestimmt [60].

Das Integral des DSC-Signals ergibt die kalorimetrische Enthalpie ΔH_{cal} des Übergangs [61]:

$$\Delta H_{\text{cal}} = \int_{T < T_m}^{T > T_m} C_p dT \quad (3.30)$$

Hierbei ist T_m die mittlere Temperatur des Übergangs. Neben der kalorimetrischen Enthalpie ΔH_{cal} kann eine effektive, sog. van't-Hoff-Enthalpie ΔH_{H} auf Basis eines Zwei-Zustands-Modells berechnet werden. Bei T_m gilt [62]:

$$\Delta H_{\text{H}} = 4RT_m^2 \frac{\Delta C_{p,m}(T_m)}{Q_m} \quad (3.31)$$

wobei ΔC_p die Differenz der Wärmekapazitäten nach und vor dem Übergang ist. Übereinstimmende ΔH_{H} - und ΔH_{cal} -Werte deuten auf einen hochkooperativen Zwei-Zustands-Übergang hin.

Bei der PPC wird ΔQ_{rev} gemessen, welche nach einem Drucksprung Δp umgesetzt wird. Dies erlaubt nicht nur die Berechnung von α , sondern hierdurch auch die Bestimmung der relativen Volumenänderung $\Delta V/V$ [63]:

$$\alpha = \frac{\Delta Q_{\text{rev.}}}{TV\Delta p} \quad (3.32)$$

$$\frac{\Delta V}{V} = \int_{T < T_m}^{T > T_m} \alpha dT \quad (3.33)$$

Auf diese Art und Weise kann die relative Volumenänderung $\Delta V/V$ bei der Entfaltung eines Proteins sehr genau bestimmt werden. α von Proteinen oder Peptiden stellt auch ein Maß für die Unterscheidung zwischen hydrophiler sowie hydrophober Hydratisierung dar: während α für hydrophile Seitenketten in wässriger Lösung mit steigender Temperatur sinkt, nimmt α für hydrophobe Seitenketten zu [64].

Kapitel 4

Experimente

4.1 Materialien

HEL, Sorbitol, Harnstoff, Oktan und Zitronensäure wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) erworben. Maleinsäure und Dinatriumcitrat stammen von Merck (Darmstadt), Natriumphosphat und Natriummaleat von Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Die Reinheit des HEL wurde über SDS-Gelelektrophorese überprüft und das Material ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Das Polypeptid GVG(VPGVG)₃ wurde analog wie unter [52] beschrieben mit der Fmoc-Festphasensynthese hergestellt und von Professor Waldmann (Universität/MPI Dortmund) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.2 Software

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Daten mithilfe des Programmes Origin (Version 6.0, MicroCal, Northampton, MA, England) ausgewertet und dargestellt. Für Moleküldarstellungen wurde das Programm WebLab Viewer (Version 2.01, Molecular Simulations Inc., San Diego, USA) verwendet. Komplexere Grafiken und Abbildungen wurden mit Hilfe des Programms CorelDraw (Version 11, Corel Cooperation, Ottawa, Kanada) hergestellt.

4.3 Protonen-Austauschexperimente an HEL

Alle NMR-Messungen wurden an einem Bruker DRX 400 Spektrometer (Bruker, Rheinstetten) durchgeführt. Austauschexperimente wurden mit HEL-Lösungen unter hitzedenaturierenden (5 % und 10 % HEL (w/v), 80 °C, 20 mM Citrat pD 3,4) und kältedenaturierenden Bedingungen (5 %

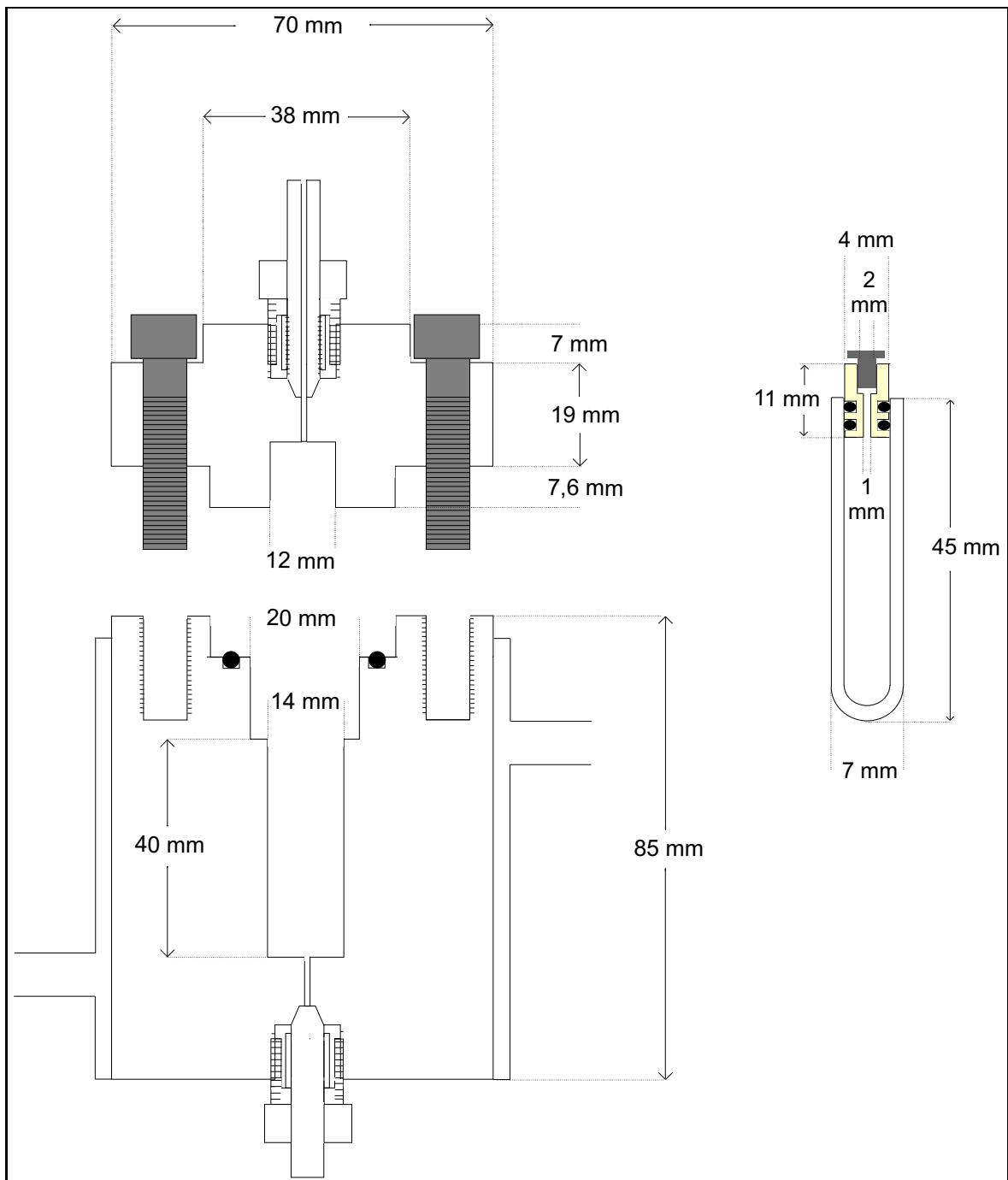


Abbildung 4.1: Skizze des für die Hochdruckexperimente verwendeten Autoklavs. Zur Abdichtung wurde ein 24×3 O-Ring (Viton Shore 80; Röttcher GmbH & Co KG, Dortmund) verwendet. Der Autoklav wurde mit 8 Schrauben (Imbus DIN916, \varnothing 8 mm, 8.8) verschlossen. Die Proben wurden in ein Glasröhrchen (\varnothing 4 mm) gefüllt und mit einem Hochdruckstopfen (Tekapeek GF30, Ensinger GmbH & Co, Nufringen) verschlossen. Die Dichtung erfolgte mit zwei 2×1 O-Ringen (VI563, C. Otto Gehrckens GmbH & Co KG, Pinneberg).

HEL (w/v), -13 °C, 20 mM Maleat pD 2.4, 3,75 kbar [55]) durchgeführt. Der etwas höhere pD bei den Hitzdenaturierungsexperimenten sorgte für eine langsamere Austauschgeschwindigkeit, welche auch eine Funktion des pHs ist, so dass der bei hoher Temperatur stark beschleunigte Austausch immer noch beobachtbar war. Der niedrigere pD bei der Kältedenaturierung sorgte für die nötige Destabilisierung von HEL [55]. Der Einfluss von Cosolventien wurde in Form von 500 mM Sorbitol bei den Hitzdenaturierungsexperimenten sowie von 500 mM Sorbitol und 2 M Harnstoff bei der Kältedenaturierung untersucht.

Zur Bestimmung der Schutzfaktoren bei der Hitzdenaturierung wurden die Lösungen in ein NMR-Röhrchen gefüllt, für definierte Zeiten in ein Wärmebad (80 °C) gehalten und anschließend schnell in einem Eisbad abgekühlt.

Zur Kältedenaturierung wurden die betreffenden Lösungen in ein etwa 4,5 cm langes Glasröhrchen mit 4 mm Innendurchmesser (7 mm Außendurchmesser) gefüllt, welches mit einem beweglichen Stopfen verschlossen werden konnte (vgl. Abb 4.1). Der Stopfen wiederum konnte mit einer Schraube geöffnet und verschlossen werden, so dass die Proben blasenfrei ins Röhrchen gefüllt werden konnten. Das so präparierte Röhrchen wurde in einen vorgekühlten Autoklaven gegeben, in dem frisches Druckmedium Oktan, temperiert auf Raumtemperatur, gefüllt wurde. Der Autoklav wurde verschlossen und mit einer Spindelpresse (HIP Technology, Frankfurt) ein Druck von 3,75 kbar eingestellt (siehe Abb. 4.1). Da der Autoklav auf -13 °C temperiert wurde, wurde er zum Schutz gegen Luftfeuchtigkeit und zur Isolierung in einem Plastiksäckchen luftdicht verschlossen und dann in ein passend zurechtgeschnittenes Styroporgefäß gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Druck langsam abgelassen, wodurch die Probe gefror. Nach Öffnen des Autoklavs konnte die Probe entnommen und die HEL-Lösung in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und im Gefrierschrank aufbewahrt werden. Das COSY-Spektrum der Probe wurde vermessen und die Intensität der Signale wurde mittels der XWINNMR-Software von Bruker, mit der eine Integrationsmaske erstellt werden kann, ermittelt. Als Referenzwerte wurden die Signale aromatischer, nicht austauschbarer Protonen verwendet. Die Zuordnung der Signale erfolgte gemäß [3]. Die Intensität der Signale wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen und die gemessene Austauschrate k_{obs} durch Anpassung gemäß Formel 3.9 bestimmt. Die entsprechende Austauschrate k_{rc} wurde nach [54, 55] berechnet und der Schutzfaktor P nach Gleichung 3.8 ermittelt. Der Einfluss der Cosolventien auf k_{rc} wurde ignoriert, da dieser bei niedrigem pH vernachlässigt werden kann [39, 56].

4.4 NMR-Messungen an GVG(VPGVG)₃

Die ^1H , ^1H -2D-NOESY-, die ^{13}C , ^1H -HSQC-, die ^{13}C , ^1H -HMBC- und T_1 -aufgelösten Spektren wurden an einem Varian 600 MHz Spektrometer an einer 10% igen (w/v) Lösung von GVG(VPGVG)₃ in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0; 20 % (v/v) D₂O) gemessen, wobei die NOESY-, HSQC- und HMBC-Messungen mit angelegtem z-Gradienten erfolgten. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Varian-eigenen Software VNMR mit Ausnahme der NOESY-Spektren, welche mit dem Programm MestReC (Version 4.5.2.0, Mestrec Research, Santiago de la Compestela, Spanien) prozessiert wurde. Vor den T_1 -Messungen wurde die Lösung 20 Minuten lang mit Argon begast. Die Messungen erfolgten bei Temperaturen von 278, 300, 333 und 248 K in einen Frequenzbereich von 30.000 Hz, auf dem 65536 Datenpunkte zu d_2 -Zeiten zwischen 0,0125 und 25,6 s in 12 Inkrementen gemäß der *inversion recovery*-Pulssequenz bestimmt wurden.

Das NOESY-Spektrum wurde über einen Frequenzbereich von jeweils 6000 Hz gemessen und bestand aus 2048×512 Datenpunkten. Die Apodisation erfolgte mit einer *sine bell*-Funktion in der t_2 - und einer *sine square*-Funktion in der t_1 -Domäne. In beiden Dimensionen wurde eine exponentielle Multiplikation von 1 Hz durchgeführt und in der F1-Domäne wurde *zero filling* auf 2048 Punkte benutzt. Die Mischzeit betrug 1,2 s.

Das HSQC-Spektrum hatte eine Frequenzbreite von 9612 Hz (^1H -Domäne) und 25641 Hz (^{13}C -Domäne) mit jeweils 128 Punkten. Die Daten wurden mit Gauss-Apodisation zu einem Spektrum von 2048×2048 Punkten prozessiert. Das HMBC-Spektrum wurde zu 2×512 Datenpunkten auf einer Frequenzbreite von 9612 Hz (^1H -Domäne) bzw. 36199 Hz (^{13}C -Domäne) vermessen, welche mit *sine bell*-Apodisation zu einem 2048×1024 Spektrum transformiert wurden.

Alle 1D-Spektren und ^1H -2D-COSY-Spektren wurden auf einem Bruker DRX 400 Spektrometer mit Standardpulssequenzen gemessen und mit Standardparametern prozessiert. Die Zuordnung der Signale erfolgte auf Basis von [65] und dem Programm ShiftX [66]. Die Numerierung der Aminosäurereste in dieser Arbeit folgt hierbei der Literaturstelle [65] gemäß $G_1V_1G_2V_2P$ und nicht nach dem Schema VPGVG. Dies führt jedoch nur zu einer Änderung der Nummern der Valine.

Die Rotationskorrelationszeiten τ_{est} wurden für primäre, sekundäre und tertiäre Kohlenstoffe gemäß Formel 3.27 abgeschätzt. Für die quartären Carbonylkohlenstoffe wurde angenommen, dass sie über dipolare Wechselwirkungen mit den nächsten Wasserstoffen relaxieren. Dies sind das Amidproton der betreffenden Peptidgruppe (Abstand $r = 202$ pm - für V_2 , dessen benachbartes Prolin kein Amidproton aufweist, wurde dieser Wert dennoch verwendet, da das P- δ -Wasserstoff diesem Kohlenstoff ebenfalls sehr nahe kommen kann) und das α -Wasserstoff ($r = 209$ pm bzw. $r = 201$

pm für Prolin) des entsprechenden Restes. Die Relaxationsrate $\frac{1}{T_1}$ wurde dann als lineare Summe der einzelnen Anteile der Relaxation über r_α und r_{Amid} angesetzt:

$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \hbar^2 \gamma_{\text{H}}^2 \gamma_{\text{C}}^2 \tau_{\text{est}} \left(\frac{n}{r_\alpha^6} + \frac{1}{r_{\text{Amid}}^6}\right) \quad (4.1)$$

Die so für die Carbonylkerne abgeschätzten Korrelationszeiten τ_{est} stellen eher grobe Schätzwerte dar, sind aber bei Betrachtung der relativen Änderungen bei Erhöhung der Temperatur, die hier gemacht werden soll, durchaus sinnvoll.

4.5 DSC- und PPC-Messungen

Die DSC- und PPC-Messungen wurden von Dr. Revanur Ravindra an einem VP DSC-Kalorimeter von MicroCal (Northampton, MA, England) durchgeführt. Für die PPC-Messungen wurde mit einem Druckaufsatz von Microcal gearbeitet. Als Pufferlösung wurde 20 mM Citrat pD 3,4 verwendet, um eine Vergleichbarkeit mit den Protonenaustauschexperimenten der Hitzedenaturierung zu gewährleisten.

Bei den DSC-Messungen wurden jeweils ca. 0.5 ml Probe mit 5-8 mg/ml HEL in die Messzelle und ca. 0.5 ml Puffer in die Referenzzelle gefüllt. Für die PPC-Messungen wurde die Konzentration auf 8-10 mg/ml HEL erhöht.

Jede Messung wurde mindestens einmal mit steigender und absteigender Temperatur durchgeführt, um die Reversibilität des Übergangs zu überprüfen. Die Daten wurden mittels eines Erweiterungsprogrammes für das Programm Origin von MicroCal ausgewertet [60].

4.6 ^1H -NMR-Messungen der Hitzedenaturierung von HEL

Für die Vermessung der Hitzedenaturierung mittels ^1H -NMR wurden die eindimensionalen ^1H -Spektren einer 5 %igen (w/v) HEL-Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen in einem Bruker DRX 400-Spektrometer bestimmt (Einstrahlfrequenz 4,65 ppm, Spektrale Breite 12 ppm, 32k Datenpunkte). Die Spektren wurden mit dem Programm MestreC (MestreC23, Mestrec Research, Santiago de la Compestela, Spanien) ausgewertet, indem die Intensität der Signale auf das Wassersignal skaliert und die Signalintensitäten des Histidin 15, welches zwei diskrete, unterschiedliche Signale im nativen und denaturierten Zustand aufweist [55], bestimmt wurde. Unter Annahme eines Zweizustands-Überganges entspricht der Quotient dieser beiden Signalintensitäten der Gleichgewichtskonstante K , mit der ΔG_{unf} als Funktion der Temperatur berechnet werden kann. Durch

die erhaltenen Werte kann eine Ausgleichsgerade gelegt werden, aus deren Achsenabschnitt ΔH_{unf} und aus deren Steigung ΔS_{unf} bestimmt werden kann:

$$\Delta G_{\text{unf}} = \Delta H_{\text{unf}} - T\Delta S_{\text{unf}}. \quad (4.2)$$

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 Hitze- und Kälte destabilisierung von HEL

5.1.1 DSC-, PPC- und ^1H -NMR-Messungen der Hitzedenaturierung

Abb. 5.1 zeigt den Verlauf von C_p mit der Temperatur T für eine HEL-Lösung bei Hitzedenaturierung. Für die hier gewählten Bedingungen ergibt sich eine Übergangstemperatur T_m von etwa 70 °C und eine Entfaltungsenthalpie ΔH_{cal} von 465 kJ/mol. Es ist ersichtlich, wie erwartet, dass die Wärmekapazität C_p für den entfalteten Zustand höher ist, da das entfaltete Protein eine höhere ASA hat und demgemäß stärker hydratisiert ist. Die Differenz ΔC_p beträgt 6,2 kJ/(K·mol). Das Signal ist symmetrisch, was auf einen Zweizustands-Übergang hindeutet. Dies wird durch den Vergleich von ΔH_{cal} und ΔH_{H} bestätigt:

$$\frac{\Delta H_{\text{cal}}}{\Delta H_{\text{H}}} = \frac{465}{470} \approx 0,99$$

Aus mikrokalorimetrischer Sicht spricht also alles für einen Übergang ohne Intermediate, d.h. für eine hochkooperative Entfaltung im Rahmen eines Zweizustandmodells.

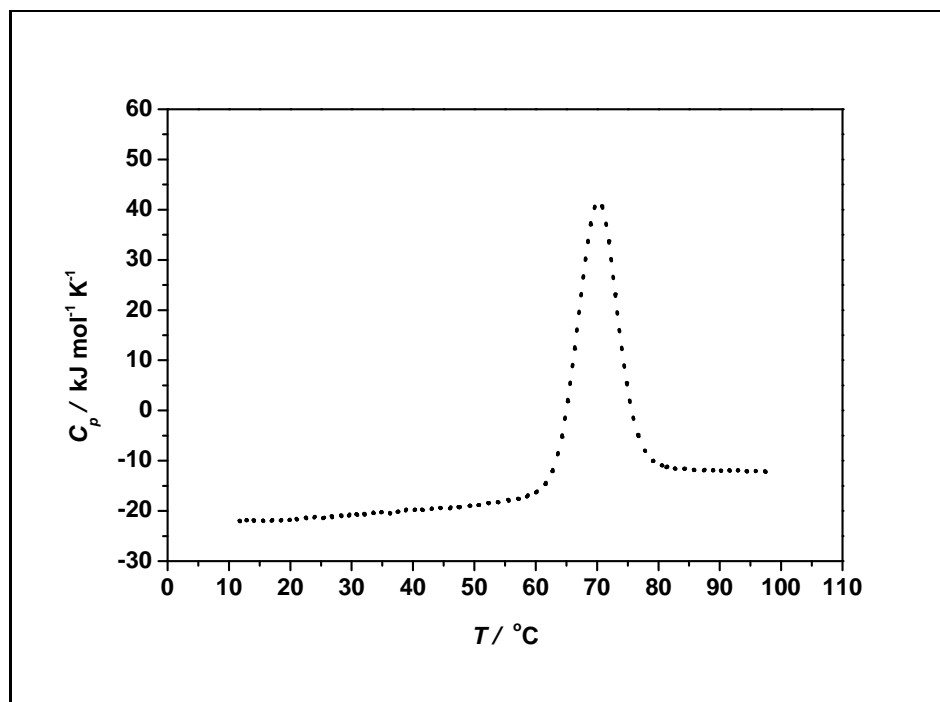


Abbildung 5.1: DSC-Kurve einer HEL-Lösung (5 mg/ml; 20 mM Citrat pD 3,4). Die Übergangstemperatur T_m beträgt 70 $^\circ\text{C}$ und die durch Integration errechnete Enthalpieänderung ΔH_{cal} ist gleich 465 kJ/mol.

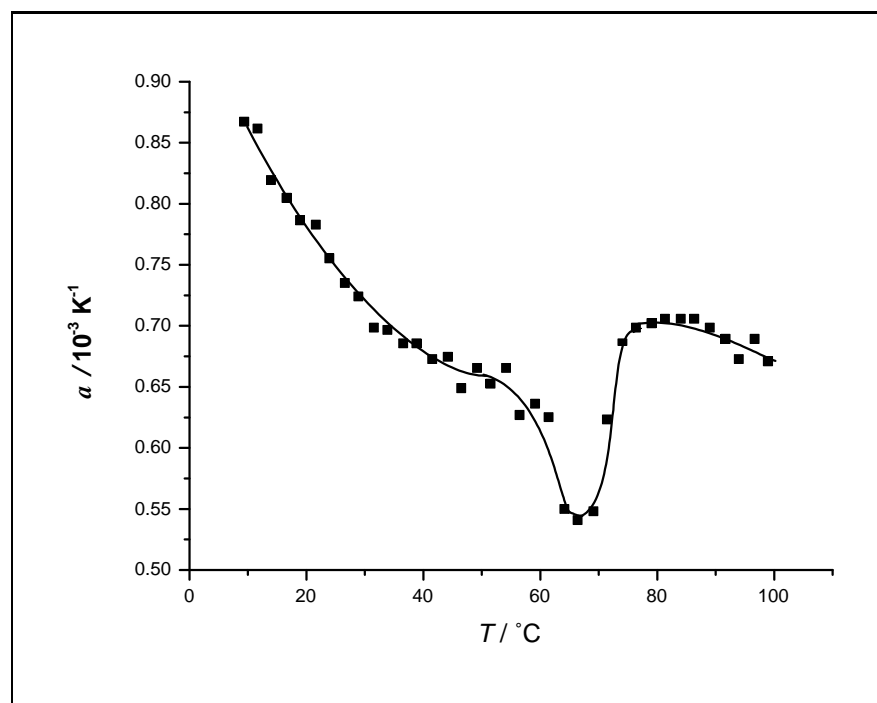


Abbildung 5.2: PPC-Kurve der Hitzedenaturierung von HEL.

In der PPC-Kurve (Abb. 5.2) fällt α im Bereich von 10 bis 50 °C stark ab, was man auf die Abnahme hydrophiler Hydratisierung des nativen Proteins sowie eine abnehmende Expansivität des *void*-Volumens des Proteins zurückführen kann [64]. Die Entfaltung findet hier übereinstimmend mit den DSC-Daten bei etwa 70 °C statt mit netto leicht erhöhtem α im *D*-Zustand. Man berechnet ein $\Delta V/V$ von $-1,1 \cdot 10^{-3}$. Am Profil der PPC-Kurve läßt sich ebenfalls kein Intermediat belegen. Im Rahmen der Genauigkeit ist nur ein Übergang sichtbar. Zunächst zeugt der Abfall von α von einer Abnahme der hydrophilen Hydratisierung, dann erfolgt eine abrupte Änderung von α im Bereich um 70 °C durch die Entfaltung des Proteins, bei dem sich die ASA stark erhöht und hydrophile als auch hydrophobe Aminosäurereste, welche zuvor im Inneren des Proteins verborgen waren, exponiert und hydratisiert werden.

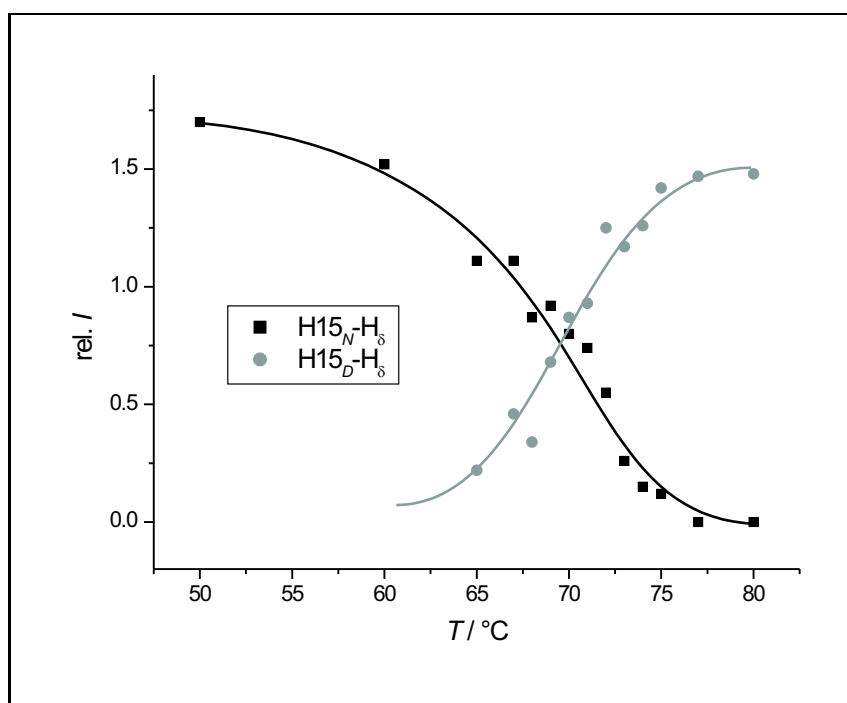


Abbildung 5.3: Relative Intensität des Histidin 15-Signals im ^1H -1D-NMR-Spektrum im nativen (*N*) und entfaltenen Zustand (*D*) als Funktion der Temperatur.

Die Bestimmung der Hitzdenaturierung mittels ^1H -NMR bestätigen im Wesentlichen die Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen. Abb. 5.3 zeigt die relative Intensität des Histidin 15 im nativen und im denaturierten Zustand bei unterschiedlichen Temperaturen. Aus diesen Daten wurde ΔG_{unf} berechnet und gegen die jeweilige Temperatur aufgetragen, wie es Abb 5.4 zu entnehmen ist. Auch hier ergibt sich das Bild eines kooperativen Überganges mit zwei Zuständen. Die hier ermittelte Entfaltungsenthalpie ΔH_{unf} von 410 kJ mol^{-1} deckt sich zwar nicht mit der mittels

DSC ermittelten, doch beträgt die Abweichung nur ca. 13 %, was angesichts der unterschiedlichen verwendeten Methoden als zufriedenstellend zu bezeichnen ist. Die Übergangstemperatur T_m von etwa 70 °C stimmt mit der über DSC bestimmten Temperatur der Entfaltung überein.

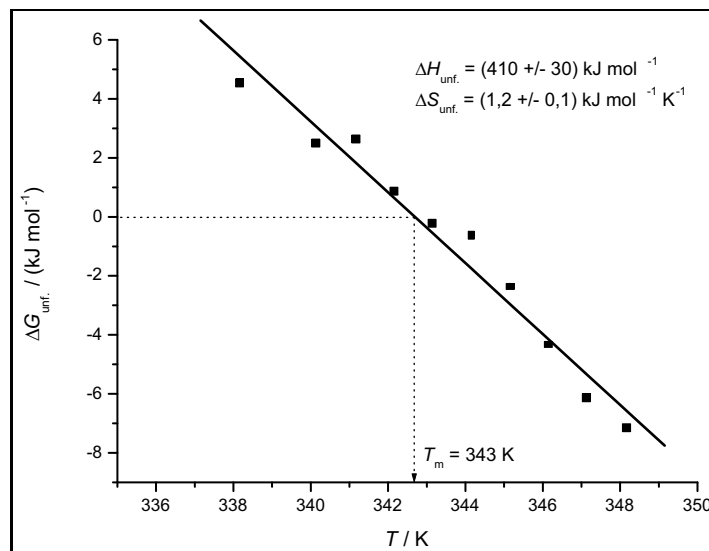


Abbildung 5.4: $\Delta G_{\text{unf.}}$ als Funktion der Temperatur (5 % HEL; 20 mM Citrat pD 3,4). Durch die Werte wurde mittels linearer Regression eine Ausgleichsgerade gelegt, aus deren Achsenabschnitt und Steigung $\Delta H_{\text{unf.}}$ und $\Delta S_{\text{unf.}}$ berechnet wurden.

5.1.2 P-Faktoren der Hitzdenaturierung

Abb. 5.5 zeigt die relative Intensität einiger C_{α} -Amid-Kreuzkorrelationssignale als Funktion der Exponierzeit der Probe unter hitzedenaturierenden Bedingungen. Die Abnahme der Intensität kann in drei Phasen unterteilt werden: Zuerst findet sich eine langsame, annähernd lineare Änderung, welche man als Äquilibrierphase, in der die Probe die Wärme des Hitzebades aufnimmt, interpretieren kann. Es folgt eine im Rahmen der Genauigkeit logarithmische Abnahme, auf der eine abschließende zweite, wesentlich schnellere folgt. Diese beiden letzten kinetischen Komponenten repräsentieren strukturelle Änderungen im HEL-Molekül, wobei der langsameren Komponente ein höherer Grad an Struktur als der schnelleren entspricht. In der Tat errechnen sich für die erste kinetische Komponente eine größere Anzahl von P -Faktoren, welche größer als 5 sind (siehe Abb. 5.6), während für die letzte, abschließende kinetische Komponente alle P -Faktoren kleiner als 1 sind. Das Vorkommen von Werten unterhalb von 1 liegt wohl darin begründet, dass im Experiment die Probe nach der Hitzeexponierung in einem Eisbad gekühlt wurden, was keine sofortige Abkühlung auf tiefere Temperaturen gewährleistete, sondern wenige Sekunden in Anspruch nahm, in

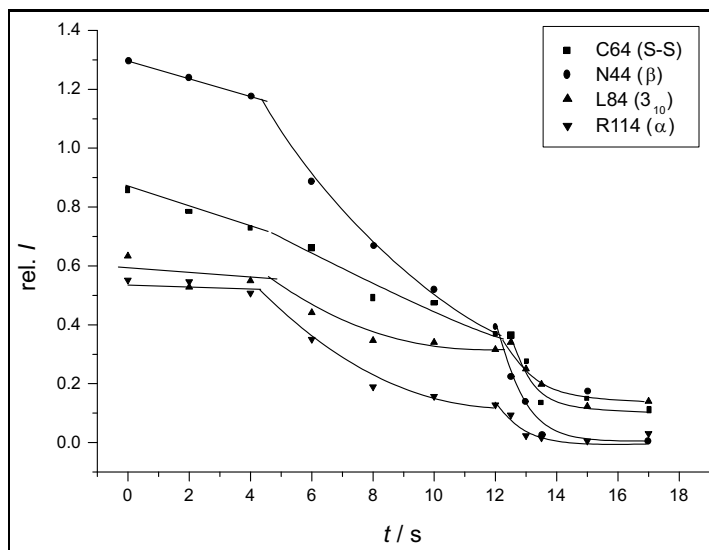


Abbildung 5.5: Auftragung der relativen Intensität der C α -Amid-Korrelations-Signale gegen die Verweilzeit unter hitzedenaturierenden Bedingungen (5 % HEL; 20 mM Citrat pH 3,4; 80 °C). Der Rest Cystein 64 ist über eine Disulfidbrücke mit dem Cystein 80 verknüpft (S-S), das Asparagin 44 befindet sich in dem dreifaltigen β -Faltblatt (β), Leucin 84 befindet sich in einer 3_{10} -Helix (3_{10}) und Arginin 114 in einer α -Helix (α).

denen ein weiterer Austausch erfolgte. Die Rate dieser zusätzlichen Protonensubstitution ist dabei von der Austauschrate des einzelnen Amids abhängig - je schneller, desto größer die Abweichung - und lässt sich schwer quantifizieren. Insgesamt führt dies jedoch zu etwas überhöhten $k_{\text{obs.}}$ -Werten, was wiederum in zu niedrigen P -Faktoren resultiert. Es lässt sich für die letzte Phase des Austausches unter hitzedenaturierenden Bedingungen zusammenfassend sagen, dass die P -Faktoren sehr niedrig sind und auf eine Konformation deuten, die der Zufallsknäuel-Konformation entspricht und dementsprechend mit der vollständig entfaltete Form D identifiziert werden kann.

Der mittleren kinetischen Komponente entspricht offensichtlich ein Intermediat, welches noch ein Rest an nativer Struktur besitzt: Hoher Schutz gegen Protonenaustausch findet sich bei bzw. nahe den disulfidverbrückten Cysteinen 64 und 94, aber auch entlang dem β -Faltblatt finden sich nennenswert hohe P -Faktoren um 7. Im Gegensatz zu den DSC- und PPC-Messungen, welche kein Intermediat bei der Hitzedenaturierung aufzeigten, lässt sich über die Protonen-Austausch-NMR auf ein Intermediat schließen. Da letztere Experimente kinetisch durchgeführt wurden, d.h. nicht im thermodynamischen Gleichgewicht, könnte eine Erklärung für diesen Befund sein, dass das Intermediat nicht thermodynamisch stabil, sondern transient und so für die mikrokalorimetrische Methode „unsichtbar“ ist.

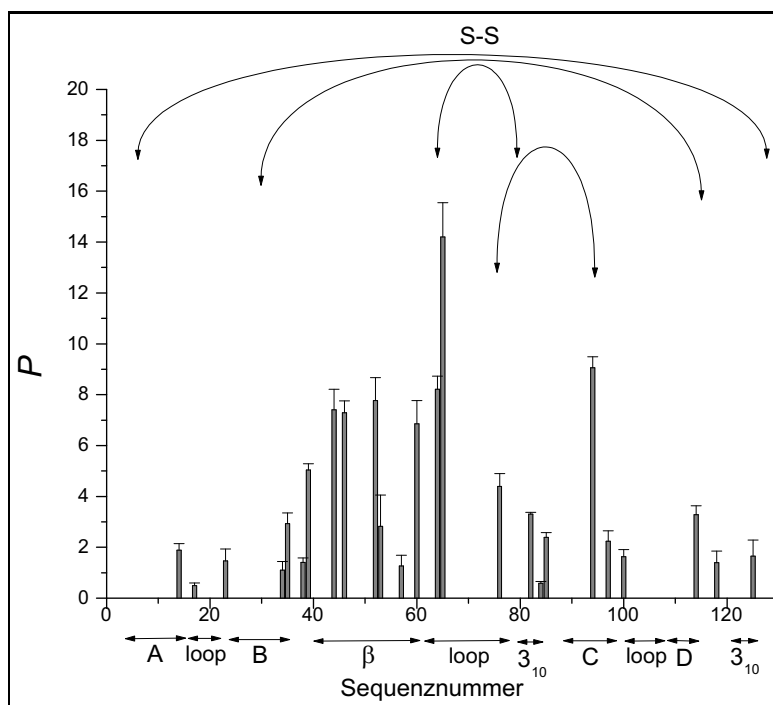


Abbildung 5.6: Auftragung der P -Faktoren gegen die Sequenz von HEL, welche auf Basis des k_{obs} der intermediären Phase berechnet wurden. Unterhalb der Sequenznummern befinden sich Pfeile, welche die Bereiche der einzelnen Sekundärstrukturelemente markieren: A, B, C und D markieren die Bereiche der vier Haupt- α -Helices, β das β -Faltblatt, 3_{10} die 3_{10} -Helices und „loop“ Bereiche mit Schleifenmotiven. Die Doppelpfeile im oberen Teils des Diagramms zeigen die Verknüpfung der Sequenzen über Disulfidbrücken (S-S) an.

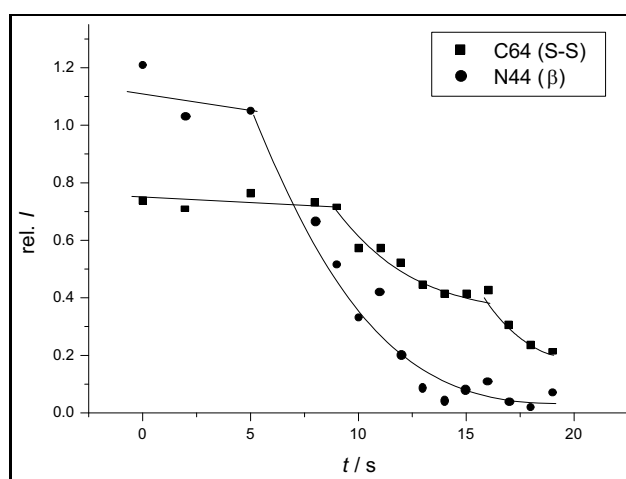


Abbildung 5.7: Änderung der relativen C_{α} -Amid-Kreuzsignalintensität von HEL gegen die Zeit unter hitzedenaturierenden Bedingungen bei Anwesenheit von Sorbitol für die Aminosäurereste Cystein 64 und Asparagin 44 (5 % HEL; 20 mM Citrat pH 3,4; 500 mM Sorbitol; 80 °C).

Die Protonenaustausch-Experimente wurden bei Anwesenheit von 500 mM Sorbitol wiederholt, Abb. 5.7 zeigt das Voranschreiten des Protonenaustausches mit der Verweilzeit im Hitzebad. Der Zusatz von Sorbitol verschlechterte die Spektrenqualität, weshalb die Werte mehr streuen als in Abb. 5.5 und weshalb der Übersicht halber nur Daten von zwei Aminosäureresten dargestellt sind. Auch konnten weniger COSY-Kreuzkorrelationssignale aufgelöst werden, so dass insgesamt weniger P -Faktoren berechnet werden konnten. Verglichen mit dem Verlauf des Austausches ohne Sorbitol konnte hier nur für einzelne Amidprotonen nach der Äquilibrierungsphase zwei distinkte Abnahmen mit annähernd logarithmischem Verlauf gefunden werden, die meisten Kurven fallen, ähnlich wie es in Abb. 5.7 die Werte des Asparagin 44 beschreiben, gemäß einer einzelnen logarithmischen Kinetik ab. Die abschließende, schnelle kinetische Phase, welche oben als die endgültige Entfaltung von HEL interpretiert wurde, fehlt bzw. ist nicht auflösbar. Dies ist wahrscheinlich auf die niedrigere Spektrenqualität zurückzuführen, weshalb für die Daten jeweils nur ein k_{obs} berechnet wurde, das der Bildung des intermediären Zustandes zugeordnet wird. Die entsprechenden P -Faktoren wurden berechnet und, um die Werte mit den Schutzfaktoren bei Abwesenheit von Sorbitol zu vergleichen, von den P -Faktoren der Hitzdenaturierung im reinen Puffer subtrahiert.

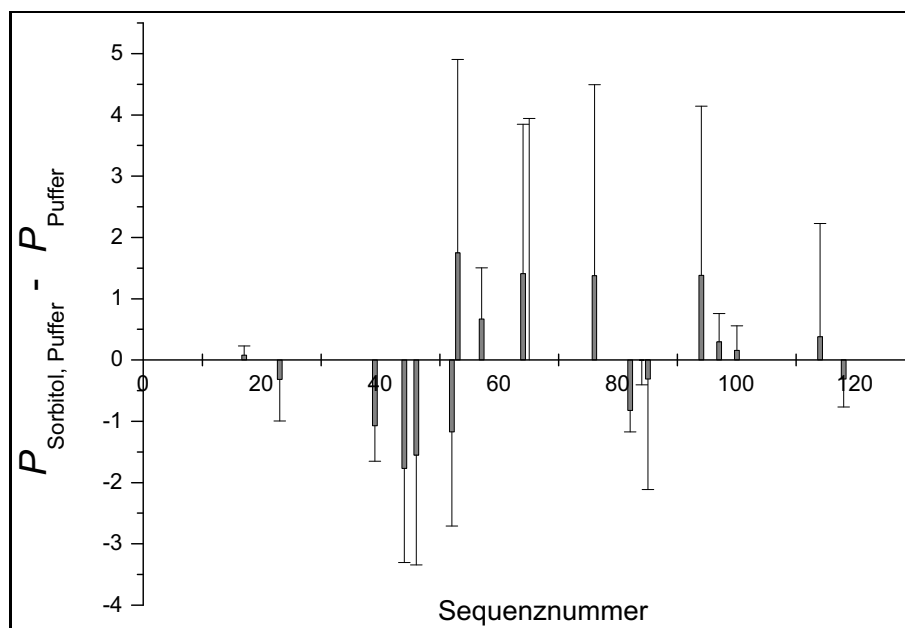


Abbildung 5.8: Differenz der P -Faktoren des kinetischen Intermediates von HEL im reinen Puffer (P_{Puffer}) und bei Anwesenheit von 500 mM Sorbitol ($P_{\text{Sorbitol, Puffer}}$). Im Rahmen der Messgenauigkeit ergeben sich keine relevanten Differenzen.

Abb. 5.8 zeigt die so erhaltenen Differenzen in Abhängigkeit der Aminosäureposition von HEL. Es ist ersichtlich, dass im Rahmen der Messgenauigkeit kaum Unterschiede bestehen, d.h. das Sorbitol

die strukturelle Rigidität des Intermediates kaum - wenn überhaupt - beeinflusst. Dies steht im Einklang mit der Vorstellung, dass bei thermisch induzierter Entfaltung die Konfigurationsentropie ΔS_{conf} die treibende Kraft darstellt und eine Stabilisierung der Hydratation, welche von Sorbitol vermittelt wird, kaum Auswirkungen hat. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hitzeinduzierte Entfaltung von HEL über einen Zwischenzustand verläuft, welcher einen Rest nativer Struktur besitzt und insbesondere an bzw. bei den verknüpften Cysteinen 64 und 94 einen höheren Schutz gegenüber einem Protonenaustausch aufweist. Dieser Zwischenzustand zeigt bei Zugabe von 500 mM Sorbitol keine messbare strukturelle Stabilisierung. Endzustand ist die vollständig entfaltete Form *D* bzw. ein Ensemble entfalteter Konformere, welche *P*-Faktoren im Bereich typischer Zufallsknäuel-Konformationen aufweist.

5.1.3 *P*-Faktoren der druckunterstützten Kältedenaturierung

Abb. 5.9 zeigt die Änderung der ^1H -COSY-Signalintensität von HEL für einige Aminosäurereste in Abhängigkeit der Zeit unter druckunterstützten Kältedenaturierungsbedingungen ($T = 13\text{ °C}$, $p = 3,75\text{ kbar}$, pD 2,0). Es ist ersichtlich, dass die absoluten Austauschraten hier wesentlich langsamer sind als unter Hitzebehandlung. Um signifikante Intensitätsabnahmen zu erreichen, mussten Proben bis zu fast einer Woche im Autoklav unter Hochdruck und tiefen Temperaturen behalten werden. Dies ist auf den Einfluss der tiefen Temperatur zurückzuführen, die den Protonenaustausch, welcher ein mehrstufiger Prozess ist und eine Öffnung der Proteinloci und den eigentlichen Austausch beinhaltet, stark verlangsamt. Durch Berechnung der *P*-Faktoren und Einbeziehung der Referenzwerte der Zufallsknäuel-Konformation wird dieser Effekt jedoch herausgefiltert. Die Daten konnten mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst und die entsprechenden *P*-Faktoren ermittelt werden.

Abb. 5.10 zeigt eine Auftragung der so erhaltenen *P*-Faktoren gegen die Position der entsprechenden Aminosäure innerhalb der Sequenz. Die *P*-Faktoren der Kältedenaturierung sind größer als diejenigen, welche für das Intermediat der Hitzedestabilisierung gefunden wurden, und sind im Mittel etwa vier mal größer, weisen von ihrer Größe jedoch auf eine starke Destabilisierung der nativen Struktur hin. Betrachtet man die Verteilung der *P*-Faktoren, zeigt sich, dass die höchsten Schutzfaktoren mit Werten zwischen 40 und 70 bei oder in der Nähe von disulfid-verknüpften Cysteinen gefunden werden; für die meisten anderen Amidprotonen liegen die *P*-Faktoren zwischen 5 und 20. Der Vergleich von helicalen und β -Faltblattbereichen weist keine signifikanten Unterschiede auf, jedoch zeigt die Schleifenregion zwischen Rest 60 und 79, bis auf Loci bei oder um die Cysteine 64 und 76, erwartungsgemäß keinerlei messbaren Schutz vor der Substitution der Amidprotonen.

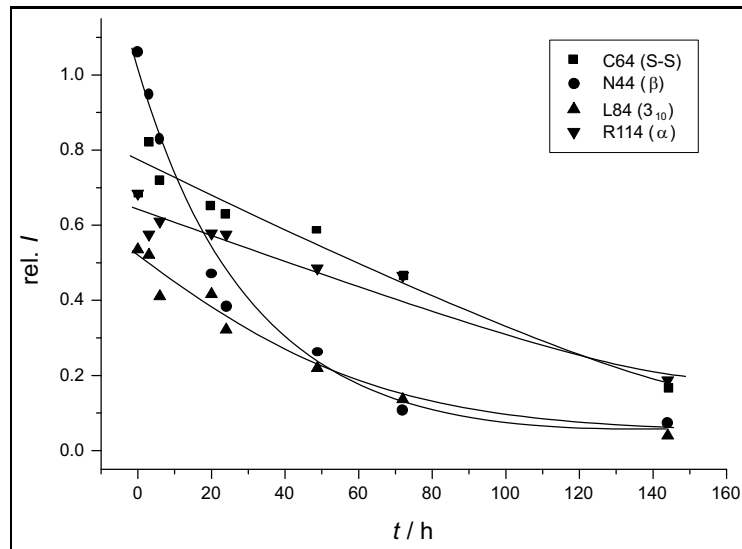


Abbildung 5.9: Änderung der relativen Intensität der C_{α} -Amid-Kreuzkorrelationssignale mit der Expositionszeit unter kältedenaturierenden Bedingungen (20 mM Maleat pD 2,0; -13°C ; 3,75 kbar) für ausgesuchte Aminosäurereste (vgl. Abb. 5.5).

Es bleibt festzuhalten, dass es sich bei der druckunterstützt-kältegestabilisierten Form von HEL um einen teilentfalteten Zustand handelt, in dem der höchste Schutz von Disulfidbrücken vermittelt wird. Das β -Faltblatt-Motiv sowie die helicalen Regionen schirmen gleichermaßen vor Austausch ab, während die große Schleifenregion zwischen Serin 60 und Prolin 79, bis auf die Einflüsse von verbrückten Cysteinen, keinen messbaren Schutz gegen einen Protonenaustausch bietet.

Auch für den kältegestabilisierten Zustand von HEL wurde der Einfluss von 500 mM Sorbitol auf die Konformation des Proteins untersucht. Wie schon bei den Experimenten unter Hitzedenaturierung, führte die Zugabe von Sorbitol zu einer Verschlechterung der Spektrenqualität, wodurch die Anzahl sinnvoll auswertbarer Signale abnahm. Abb. 5.11 zeigt die Differenz der P -Faktoren bei An- und Abwesenheit des Zusatzes. Es ist deutlich erkennbar, dass die P -Faktoren erheblich zunehmen. Dies bestätigt, dass für dieses Destabilisierungs- bzw. Entfaltungsszenario die Hydratation eine entscheidende Rolle spielt. Sorbitol, welches zu einer preferentiellen Hydratisierung führt, erhöht durch die Verstärkung der Hydratation die strukturelle Rigidität von HEL, wie aus der Erhöhung der Schutzfaktoren eindeutig hervorgeht. Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, ob der stabilisierende Einfluss von Cosolventien den kältedenaturierten, teilentfalteten Zustand als Ganzes betrifft, oder ob es bestimmte Regionen bzw. Sekundärstrukturelemente gibt, welche durch Zunahme der Hydratation weniger leicht entfalten. Die Identifizierung solcher Bereiche würde auf eine erhöhte lokale strukturelle Stabilität mit Erniedrigung des chemischen Potentials der Hydrathülle hindeuten.

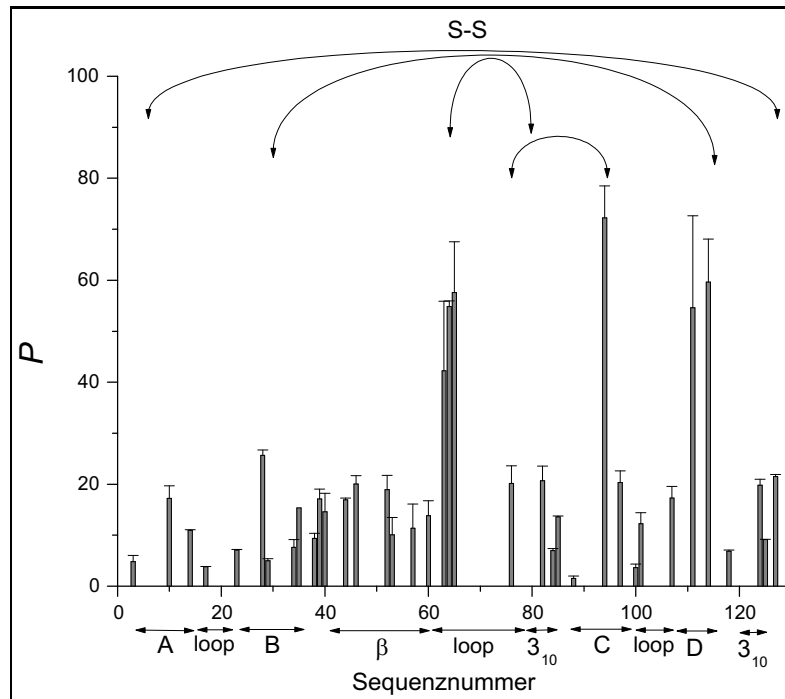


Abbildung 5.10: Auftragung der P -Faktoren gegen die Aminosäureposition in der Sequenz von HEL unter Kältedenaturierung. Wie unter Abb. 5.6 sind Sekundärstrukturelemente und Disulfidverbrückungen durch Doppelpfeile markiert.

Gemäß der Theorie des hydrophoben Kollaps sollte es zumindestens möglich sein, dass es bestimmte Regionen bzw. „hydrophobe Kerne“ gibt, welche - verglichen mit dem Rest des teilentfalteten Proteins - überverhältnismäßig stabilisiert werden. Ein Blick auf Abb. 5.11 zeigt jedoch, dass für HEL kein solcher Bereich identifiziert werden kann, der durch außerordentlichen Zugewinn an Schutzfaktoren hervorsticht. Lediglich das Cystein 64, welches auch in den vorhergehenden Experimenten durch überdurchschnittlich hohe Schutzfaktoren auffiel, zeigt hier eine abweichende Erhöhung.

Es erscheint allerdings sinnvoller, bei der Suche nach Bereichen mit überdurchschnittlicher Stabilität auf die *relative* Änderung der P -Faktoren zu schauen. Abb. 5.12 zeigt eine entsprechende Auftragung, bei der der Quotient aus der Differenz der P -Faktoren und dem P -Faktor im reinen Puffer gegen die Sequenzposition aufgetragen ist. Auch hier zeigt sich, dass die relativen Änderungen im Rahmen der Messgenauigkeit sehr gleichmäßig über die Sequenz verteilt sind und im Schnitt etwa 60 % betragen. Falls es lokale Bereiche geben sollte, die durch die stabilisierende Wirkung des Sorbitols überdurchschnittlich beeinflusst werden, so ist der strukturelle Effekt, der hieraus resultiert, zumindestens wenn man ihn mit der Methode des Protonenaustauschs bewertet, nicht sonderlich ausgeprägt. Es ergibt sich damit das Bild, dass die über das Sorbitol vermittelte Stabilisierung das

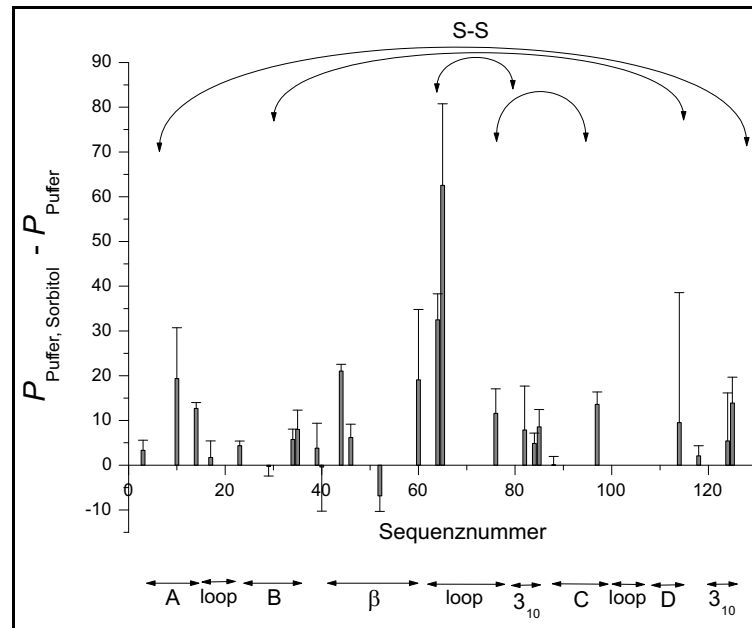


Abbildung 5.11: Auftragung der Differenz der P -Faktoren des kälte-denaturierten Zustandes im reinen Puffer (P_{Puffer}) und bei Anwesenheit von 500 mM Sorbitol ($P_{\text{Sorbitol, Puffer}}$) gegen die Sequenz. Der Zusatz dieses Cosolvens führt zu einer starken Erhöhung der Schutzfaktoren.

gesamte Protein gleichermaßen beeinflusst, d.h., dass die Stabilisierung und die dadurch resultierende Rigidisierung des teilentfalteten Zustands unter den vorliegenden Bedingungen kooperativ verlaufen.

In einem weiteren Ansatz wurde der umgekehrte Weg beschritten, d.h., dass das kältedestabilisierte HEL durch Zusatz von Harnstoff weiter destabilisiert wurde. Vielleicht würde der Zusatz eines chaotropen Agens zu diesem durch Hydratationseffekte teilentfalteten Zustandes Bereiche bzw. Motive innerhalb des Proteins anzeigen, welche in besonderer Weise auf eine Änderung der Hydratierung bzw. Solvation reagieren. Abb. 5.13 zeigt die Differenz der so erhaltenen P -Faktoren und der P -Faktoren, welche in reinem Puffer erhalten wurden. Die Schutzfaktoren nehmen unter Zusatz von Harnstoff stark ab, d.h. dass die Destabilisierung der Hydratation und Adsorption des Harnstoffs auf der Proteinoberfläche zu einem weniger strukturierten Molekül führt. In der Betrachtung der Differenz der Schutzfaktoren ist, wie es bei dem Zusatz von Sorbitol der Fall war, bis auf Loci bei bzw. in der Nähe von Cysteinbrücken kein ausgeprägter Bereich bzw. kein ausgewiesenes Sekundärstrukturmotiv erkennbar, welches eine stark abweichende Änderung der Schutzfaktoren aufwies. Auch bei Betrachtung der relativen Änderungen (Abb. 5.14) ergibt sich, dass der Zusatz des Harnstoffs das Protein als Ganzes betrifft und kein distinkter Bereich identifiziert werden kann, der auf die Destabilisierung der Hydratation in besonderer Weise reagierte. Der Schutz vor Protonenaustausch

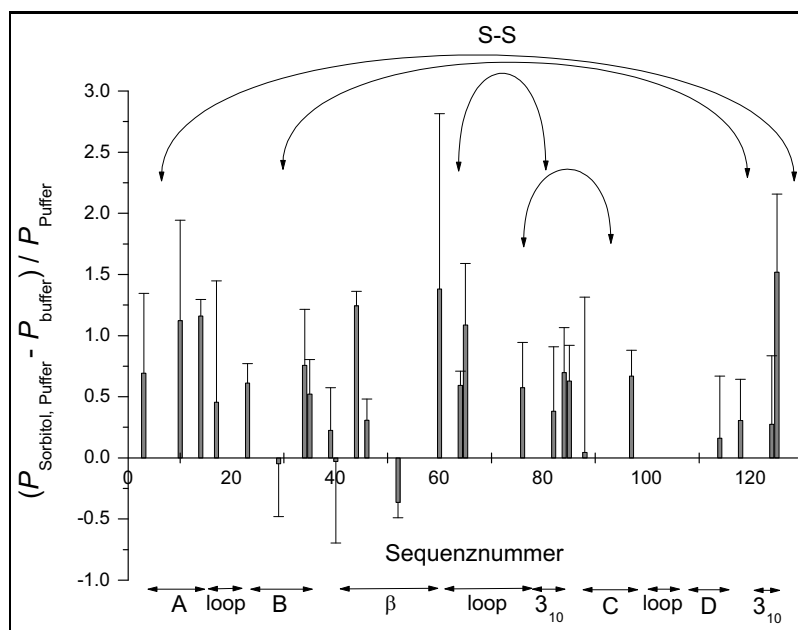


Abbildung 5.12: Auftragung der relativen Änderung der P -Faktoren $\frac{P_{\text{Sorbitol, Puffer}} - P_{\text{Puffer}}}{P_{\text{Puffer}}}$ gegen die Sequenzposition der Aminosäuren. Es kann kein Bereich identifiziert werden, der durch die Sorbitol-Stabilisierung im Rahmen der Messgenauigkeit einen überdurchschnittlichen Schutz vor Protonenaustausch zugewinnt.

und damit die strukturelle Rigidität des Moleküls betrifft die gesamte Sequenz gleichermaßen.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass das druckunterstützte-kältedestabilisierte HEL teilentfaltet ist, wobei, wie bei dem thermisch induzierten Intermediat (vgl. 5.1.2), der hauptsächliche Faktor struktureller Rigidität durch Cysteinbrücken vermittelt wird.

Der Einfluss der kosmo- bzw chaotropen Substanzen Sorbitol und Harnstoff unterstreicht, dass die Hydratation dasjenige Element ist, welches in diesem Entfaltungsszenario die hauptsächliche Rolle spielt, denn ungleich der thermischen Denaturierung, in dem der Zusatz von Sorbitol kaum Auswirkungen zeigte, erhöht bzw. erniedrigt der Zusatz von Sorbitol bzw. Harnstoff den Schutz vor Protonensubstitution in der vorhergesagten Weise. Es gilt zu unterstreichen, dass die Konformation von HEL durch die Stabilisierung bzw. Destabilisierung als Ganzes in kooperativer Weise beeinflusst wird und keine bestimmten Regionen bzw. keine bestimmten Sekundärstrukturelemente innerhalb des Proteins identifiziert werden können, welche ein signifikant abweichendes Verhalten aufweisen.

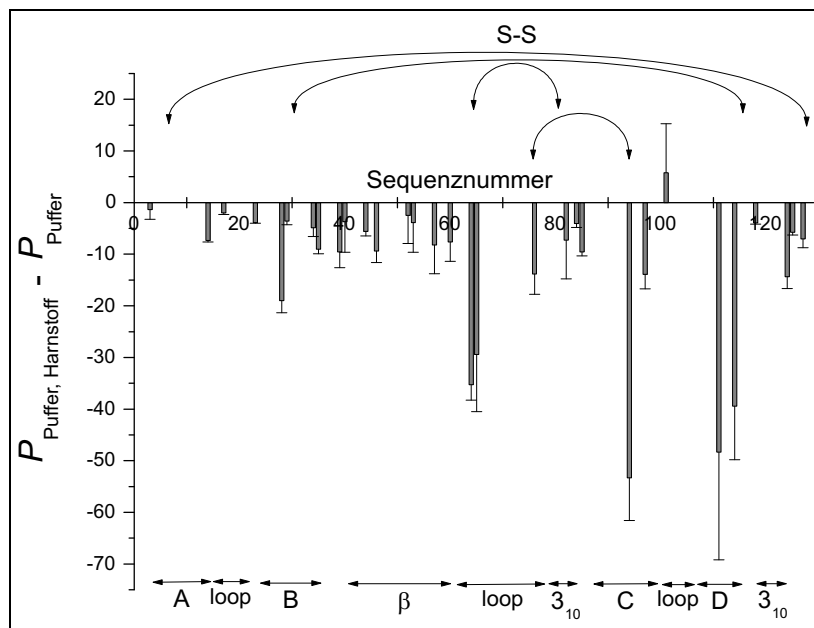


Abbildung 5.13: Differenz der P -Faktoren bei Anwesenheit und Abwesenheit von 2 M Harnstoff gegen die Sequenzposition der entsprechenden Aminosäure. Der Zusatz des Chaotrops führt insgesamt zu einer starken Abnahme des Schutzes gegen Protonenaustausch. Die größten Änderungen sind bei bzw. in der Nähe von den verbrückten Cysteinen 64, 76 und 94 zu verzeichnen, die in reinem Puffer die höchsten Schutzfaktoren aufweisen.

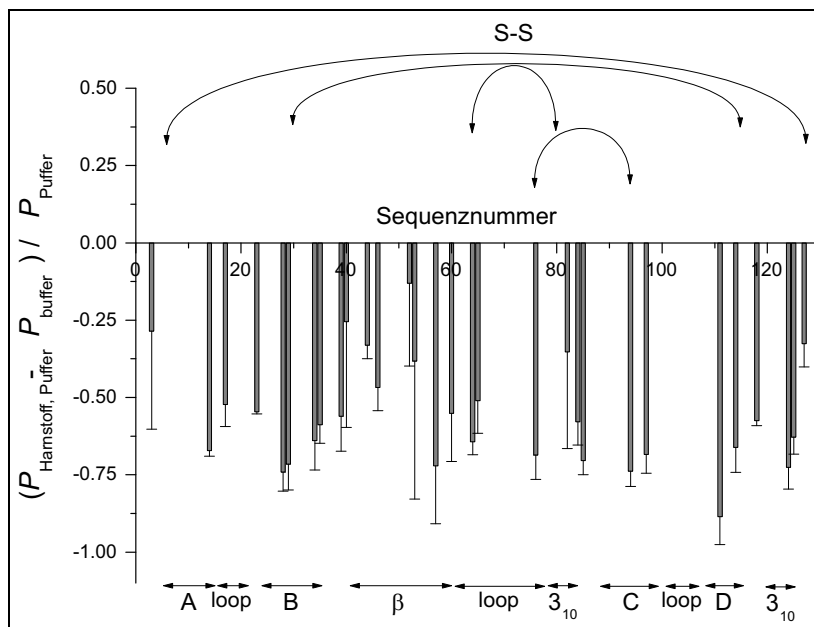


Abbildung 5.14: Die relative Änderung der P -Faktoren gegen die Sequenzposition der Aminosäuren bei Zusatz von 2 M Harnstoff. Die Änderungen sind gleichmäßig entlang der Sequenz verteilt und betragen im Schnitt 60 %. Auf Basis der Sekundärstrukturelemente kann kein Bereich erkannt werden, welcher überdurchschnittlich destabilisiert würde bzw. überdurchschnittlich starken Schutz gegen Protonenaustausch böte.

5.2 Thermisch induzierte Faltung des Polypeptids

GVG(VPGVG)₃

5.2.1 Zuordnung der ¹H- und ¹³C-Signale

Abb. 5.15 zeigt die Strukturformel der repetitiven Untereinheit G₁V₁G₂V₂P sowie das eindimensionale ¹H-NMR-Spektrum von GVG(PVGVG)₃. Die von der Sequenz bzw. Summenformel zu erwartenden Signale können in den entsprechenden Bereichen gefunden und durch Integration quantitativ nachgewiesen werden. Die skalaren Konnektivitäten können dem 2D-COSY-Spektrum entnommen werden (Abb. 5.16).

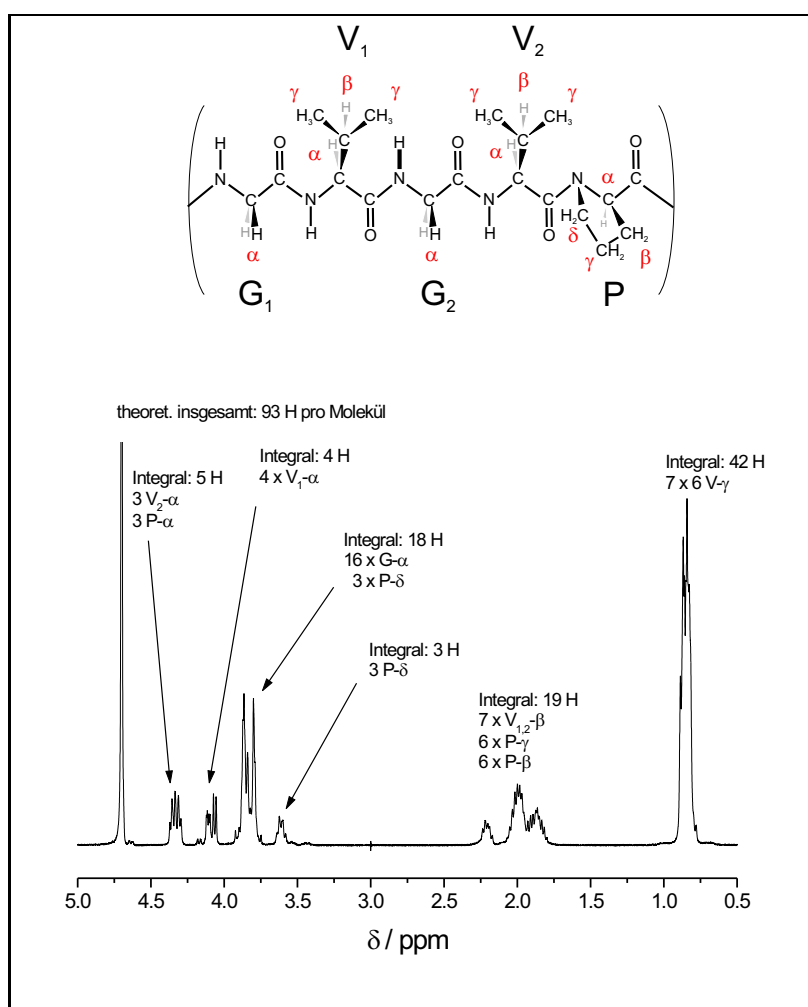


Abbildung 5.15: Strukturformel der repetitiven Untereinheit G₁V₁G₂V₂P (oben) und das ¹H-1D-NMR-Spektrum von GVG(PVGVG)₃ (unten). Von den theoretisch zu erwartenden 93 Protonen können nach Skalierung auf das Signal der Valin-γ-Protonen (≅ 42 H) durch Integration 91 nachgewiesen werden, was im Rahmen der Genauigkeit als zufriedenstellend zu bezeichnen ist.

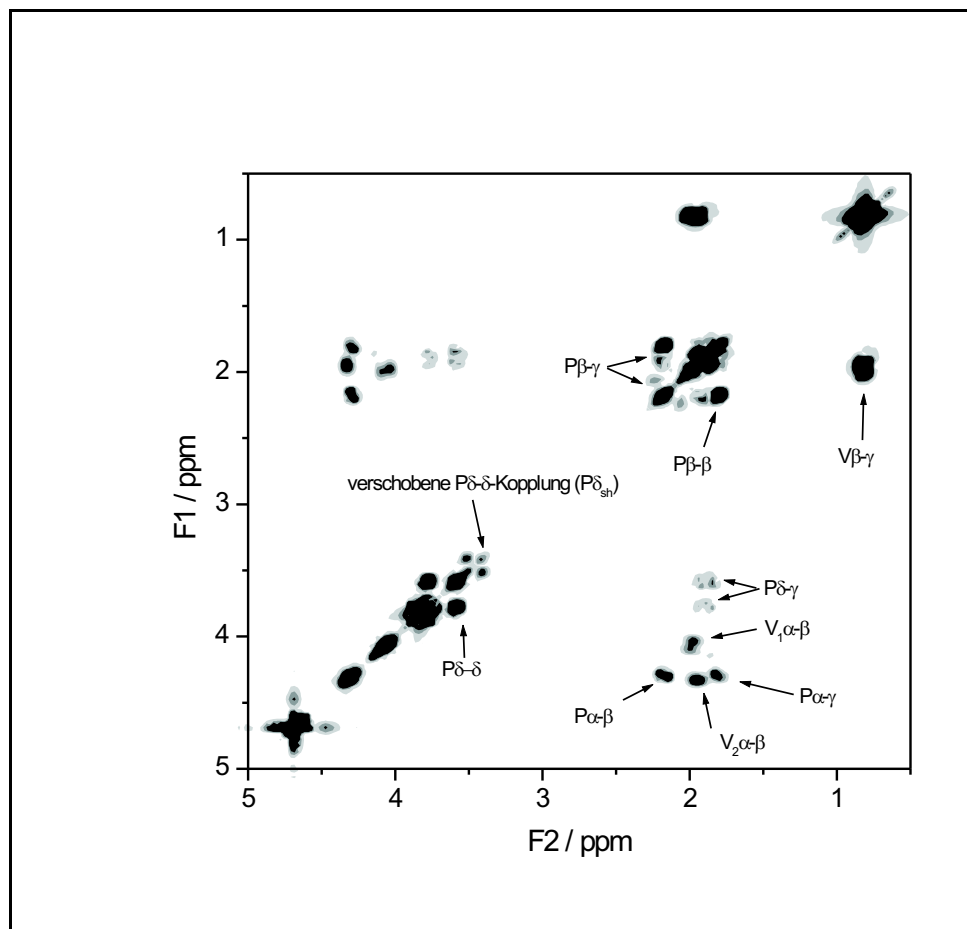


Abbildung 5.16: Konturdiagramm des ^1H -2D-COSY-Spektrums des Octadecamers $\text{GVG}(\text{PVGVG})_3$. Die jeweiligen Kreuzkorrelationssignale und ihre Zuordnung sind mit Pfeile markiert. Es wird auch eine verschobene, wahrscheinlich Prolin- δ - δ , Kopplung ($\text{P}\delta_{\text{sh}}$) gefunden.

Hier sind die skalaren Kopplungen der β - und γ -Protonen sowie der α - und β -Protonen des Valins sichtbar. Im letzteren Fall kann zwischen den Valinen 1 und 2 unterschieden werden. Für das Prolin können die geminalen Kopplungen der β - und der δ -Protonen sowie die skalaren Kopplungen zwischen α - β , β - γ und γ - δ gefunden werden. Es findet sich auch eine verschobene Kopplung ($\text{P}\delta_{\text{sh}}$), die wahrscheinlich auf eine geminale δ -Kopplung zurückzuführen ist. Dies könnte ein Hinweis auf ein Prolin mit abweichender Konformation zurückzuführen sein. Im ^1H -1D-Spektrum ergibt sich für eines der beteiligten Signale (das andere ist überlagert) eine relative Intensität von 0,2, d.h. bei ca. 20 % der Gesamtmolekülpopulation befände sich eines der drei vorhandenen Proline in dieser abweichenden Konformation. Insgesamt zeigen die Spektren, dass die Probe rein ist und in der vorausgesetzten Zusammensetzung vorliegt. Bis auf die verschobene, geminale Prolin- δ -Kopplung kann keine Feinstruktur gefunden werden, die auf signifikante Anteile von Unterpulationen mit

abweichender Konformation hinwies. Die Signale des ^1H -2D-COSY-Spektrums werden bei der Analyse des ^1H -2D-NOESY-Spektrums (siehe Kap. 5.2.3) noch von Wichtigkeit sein, um echte NOE-Wechselwirkungen von evtl. Artefakten durch Spin-Diffusion zu unterscheiden.

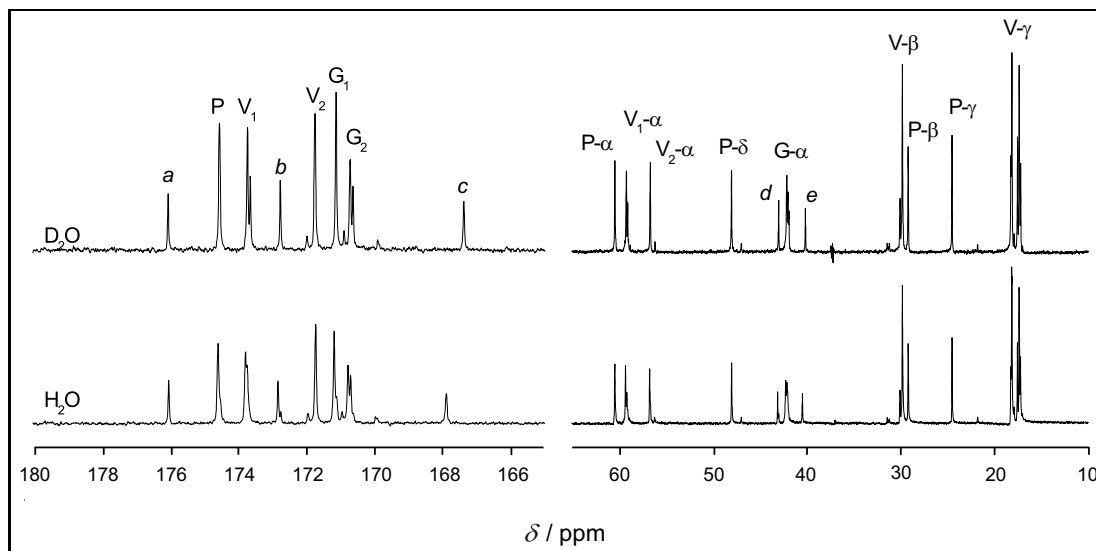


Abbildung 5.17: ^{13}C -Spektrum von GVG(PVGVG) $_3$ in D_2O (oben) und H_2O (unten). Auf der linken Seite ist der Tieffeldbereich mit den Carbonyl- ^{13}C -Signalen, auf der rechten Seite befindet sich der Hochfeldbereich mit den anderen Kohlenstoffsignalen. Die meisten Signale lassen sich gemäß des pentameren Motivs $\text{G}_1\text{V}_1\text{G}_2\text{V}_2\text{P}$ zuordnen, doch im Tieffeldbereich und um dem Glycin- α -Signal lassen sich zusätzliche Signale finden (a , b , c , d und e). Das Signal c weist einen leichten Isotopeneffekt auf und ist im D_2O -Spektrum um 0,5 ppm in Richtung Hochfeld verschoben.

Abb. 5.17 sind die ^{13}C -1D-Spektren des Octadecamers in H_2O und D_2O zu entnehmen. Die Hauptsignale lassen sich gemäß der Literatur [65] dem repetitiven Motiv $\text{G}_1\text{V}_1\text{G}_2\text{V}_2\text{P}$ zuordnen, wie man sie auch im Hochpolymer findet. Desweiteren lassen sich zusätzliche Signale im Carbonyl- und im Glycin- α -Bereich finden. Über die flankierenden Signale im Glycin- α -Bereich lässt sich sagen, dass diese ebenfalls auf Glycin- α -Kohlenstoffe zurückzuführen sein müssen, welche sich in einer unterschiedlichen konformellen Umgebung befinden, da es höchst unwahrscheinlich ist, dass Signale anderer Kohlenstoffe sich über einen so großen Bereich verschieben. Die Signale a , b und c lassen sich nicht ohne weiteres zuordnen, da alle ^{13}C -Carbonyl-Signale in einem relativ engen Bereich liegen und diese je nach struktureller Umgebung über relativ weite Bereiche variieren können. Eingedenk der Tatsache, dass das GVG(PVGVG) $_3$ drei der pentameren Einheiten $\text{G}_1\text{V}_1\text{G}_2\text{V}_2\text{P}$ besitzt, weist das Spektrum also recht wenig Feinstruktur auf, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass die strukturelle Umgebung der jeweiligen Kohlenstoffe recht einheitlich ist oder dass das Molekül eine hohe Dynamik aufweist - oder beides.

Es gilt festzustellen, woher die zusätzlichen Signale stammen. Denkbar ist, dass sich die entsprechenden Kohlenstoffe innerhalb der Sequenz in einer unterschiedlichen sterischen Umgebung befinden und so eine bzw. mehrere Subpopulation(-en) von Konformeren bilden. Weiterhin könnten die Signale von terminalen Aminosäureresten herrühren, welche eine andere und vermutlich dynamischere Umgebung als die Reste im Innern der Sequenz besitzen. Um eine eindeutige Zuordnung zu ermöglichen, wurde das HSQC- und das HMQC-Spektrum des Ocatdekamers aufgenommen. Erstere Methode erlaubt einen Rückschluss auf die Konnektivität zwischen direkt verbundenen ^{13}C - und ^1H -Kernen, letztere die Bestimmung von Konnektivitäten über einige chemische Bindungen hinweg.

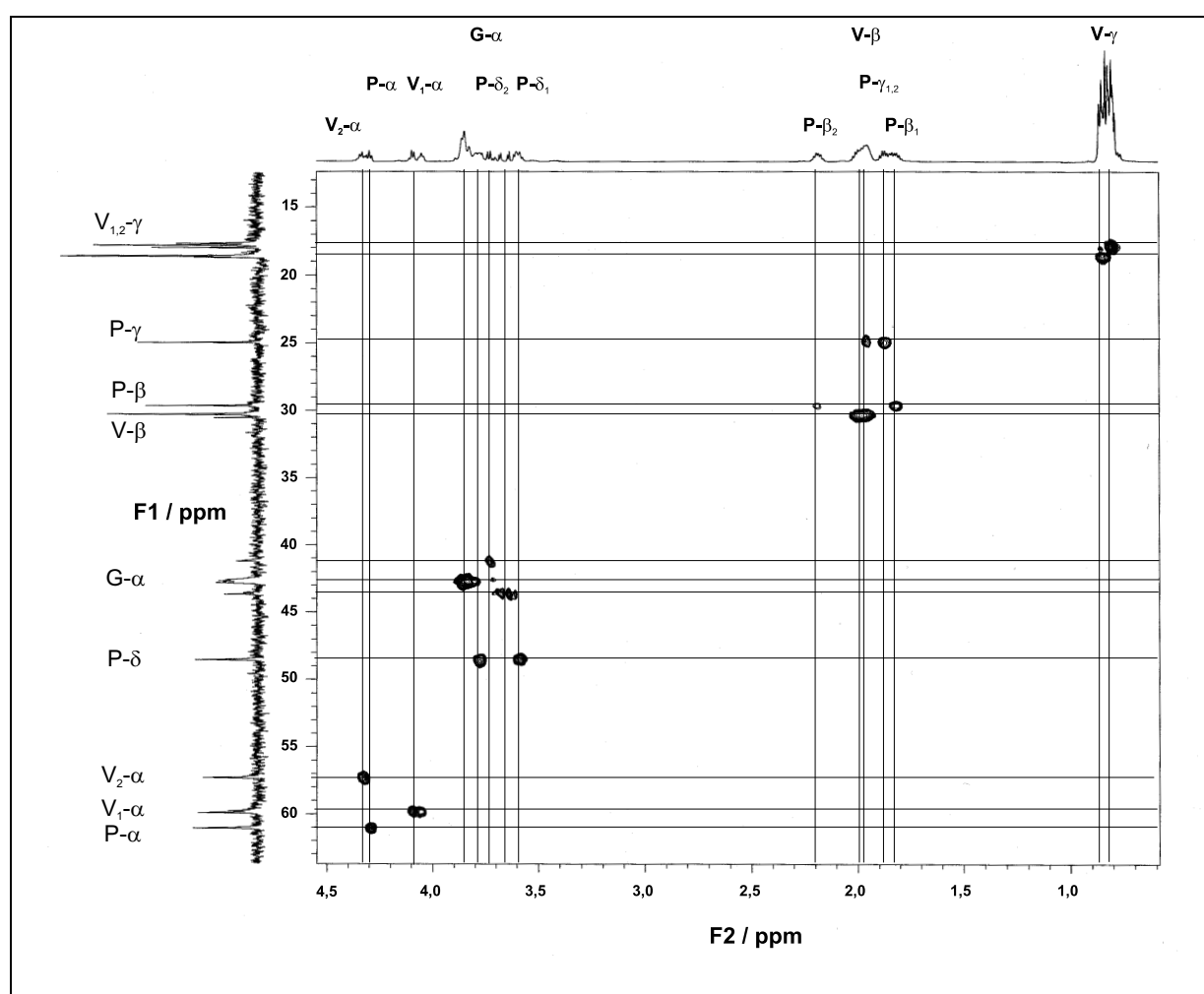


Abbildung 5.18: Konturdiagramm des HSQC-Spektrums von $\text{GVG}(\text{PVGVG})_3$. Auf der Abzisse ist die Frequenzdomäne der ^{13}C -Kerne, auf der Ordinate die der ^1H -Kerne aufgetragen. Die jeweiligen 1D-Spektren sind links neben der Achse bzw. im oberen Teil des Diagramms dargestellt. Korrelationspeaks zwischen einzelne Signale deuten auf eine direkte chemische Bindung zwischen den betreffenden Kernen hin. Um den Überblick zu erleichtern, wurden entlang der Signalfrequenzen senkrechte bzw. horizontale Hilfslinien gelegt.

Abb. 5.18 zeigt ein Konturdiagramm des ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum des Octadecamers. Es bestätigt die oben vorgenommene Zuordnung. Insbesondere zeigt es, dass die flankierenden Signale um die Glycin- α -Bande ebenfalls von Glycin- α -Kohlenstoffen stammen. Es wird weiterhin deutlich, dass der Glycin- α -Bereich eine weitere Feinstruktur besitzt, da sich bei sehr genauer Betrachtung der Korrelationssignale herausstellt, dass das tieffeldverschobene Signal sehr unsymmetrisch ist; auch ist ein kleines, weiteres Signal sichtbar. Die Glycin- α -Kohlenstoffpopulation ist also wenig einheitlich, was auf eine diesbezügliche Heterogenität innerhalb des Moleküls und/oder innerhalb des Ensembles an Molekülen hindeutet.

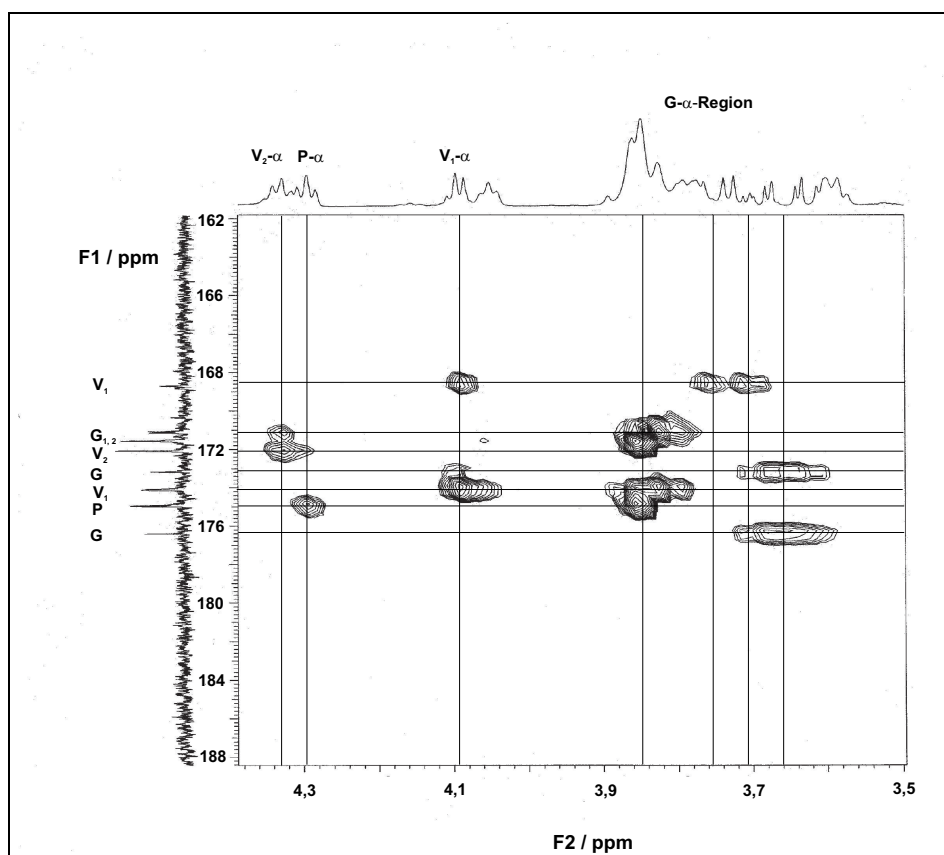


Abbildung 5.19: Konturdiagramm des HMQC-Spektrum von $\text{GVG}(\text{PVGVG})_3$. Gezeigt ist der Hochfeldbereich der ^{13}C -Frequenzdomäne gegen den ^1H -Frequenzbereich, in dem typischerweise die Signale der α -Wasserstoffe von Aminosäuren liegen. Wie in Abb. 5.18 wurden zur besseren Übersicht Hilfslinien eingezeichnet.

Da Carbonylkohlenstoffe kein direkt chemisch gebundenes Wasserstoffatom aufweisen, können ihre Konnektivitäten nicht über die HSQC-Methode aufgeklärt werden. Hierzu wurde ein HMQC-Spektrum aufgenommen, dessen Konturdiagramm Abb. 5.19 zu entnehmen ist. Wiederum bestätigt sich die Zuordnung für die Hauptsignale, wie sie oben vorgenommen wurde. Es zeigt sich, dass

Korrelationen auch über einzelne Aminosäurereste hinaus bestehen; so weisen das Prolin- sowie das Valin₁-Carbonylkohlenstoff Kreuzkorrelationen mit Glycin- α -Wasserstoffen auf. Die Signale *a* und *b* zeigen Korrelationssignale mit der Glycin- α -Region, wobei das Signal *b* noch eine sehr schwache Kreuzkorrelation mit dem Valin₁- α -Wasserstoff aufweist. Somit können diese beiden Signale also Glycinen zugewiesen werden. Das Signal *c* des ¹³C-Spektrums korreliert mit den ¹H-Frequenzen des Valin₁ und zwei Glycin- α -Wasserstoffen. In Anbetracht der Tatsache, dass in dem Spektrum Valin- bzw. Prolin-Carbonylkohlenstoffe durchaus mit Glycin- α -Wasserstoffen Kreuzkorrelationen aufweisen, umgekehrt Glycin-Carbonylkohlenstoffe mit Valin- oder Prolin- α -Wasserstoffen jedoch kaum, ist hier eine Zuordnung von *c* zu einem Valin in Position 1 berechtigt. Die zusätzlichen Signale stammen also von einem Valin₁ und zwei Glycinen. Für die ¹³C-Glycin- α -Kerne direkt lassen sich im HMQC-Spektrum überhaupt keine Korrelationssignale nachweisen (Daten nicht gezeigt). Doch der Vergleich der Lage dieser Signale im HSQC-Spektrum (*e*: $\delta(^{13}\text{C}) \approx 41$ ppm, $\delta(^1\text{H}) \approx 3,75$ ppm; *d*: $\delta(^{13}\text{C}) \approx 44$ ppm, $\delta(^1\text{H}) \approx 3,65$ ppm; siehe Abb. 5.18) mit den entsprechenden Korrelationspeaks der Carbonylkerne im HMQC-Spektrum legt nahe, dass das zusätzliche Valin₁-Carbonyl-Signal ($\delta(^{13}\text{C}_c) \approx 168,5$; $\delta(^1\text{H}) \approx 3,76$; Duplett) mit dem zusätzlichen Glycin- α -Wasserstoff *e* korreliert, während die Lage der zusätzlichen Glycin-Carbonyl-Signale ($\delta(^{13}\text{C}_a) \approx 176,3$; $\delta(^{13}\text{C}_b) \approx 173$; $\delta(^1\text{H}) \approx 3,66$) eine Kreuzkorrelation mit dem zusätzlichen Glycin- α -Wasserstoff *d* nahelegen; die anderen Hauptsignale, wie man sie auch im Hochpolymer findet, zeigen Kreuzkorrelation mit dem Glycin- α -Hauptsignal. Die Frage, ob es sich bei den zusätzlichen Signalen um andere Konformere oder terminale Aminosäurereste handelt, kann an dieser Stelle nicht eindeutig beantwortet werden: Einerseits legt die Zuordnung zu zwei Glycinen und einem Valin₁ - also einer GVG-Gruppe, welche zudem „isoliert“ zu sein scheint, da Korrelationen mit den zusätzlichen, separaten Glycin- α -Wasserstoffen bestehen - dies nahe. Andererseits besitzt das Signal *c* keine Kreuzkorrelation mit dem Signal *d*, mit dem die zusätzlichen Glycin-Carbonyl-Kohlenstoffe *a* und *b* korrelieren. Das Valin₁ *c* ist also nicht mit diesen benachbart. Weitere Informationen zu dieser Frage sollte durch die Messung der T_1 -Relaxationsraten zu erhalten sein, da über die Bestimmung der Rotationskorrelationszeit eine Aussage über die Dynamik dieser Kohlenstoffe getroffen werden kann. Sollten diese eine höhere Dynamik aufweisen, läge eine terminale Position nahe. Die Glycin-Carbonyl-Kohlenstoffe *a* und *b* zeigen beide eine Kreuzkorrelation im Bereich des Signals *d*, wobei das Signal *b* noch eine weitere, schwache Kreuzkorrelation mit der Valin₁- α -Region besitzt - es ist also nicht auszuschließen, dass die Glycine *a* und *b* also gemeinsam zu einem GVG-Terminus gehören.

Zusammengefasst gleicht das ¹³C-NMR-Spektrum demjenigen, welches man auch für die hochpolymere Form dieses Peptids findet [65]. Entsprechend lassen sich die Hauptsignale gemäß der

repetitiven Pentameren-Sequenz $G_1V_1G_2V_2P$ zuordnen. Eine abweichende Feinstruktur finden sich im Carbonylbereich und flankierend zum Glycin- α -Hauptsignal. Auf Basis des HMQC-Spektrums lassen sich die zusätzlichen Signale im Carbonylbereich zwei Glycinen und einem Valin in der Position 1 zuordnen. Durch Vergleich des HMQC- und des HSQC-Spektrums können die zusätzlichen Glycin-Carbonylkohlenstoffe a und b dem Glycin- α -Signal d zugewiesen werden. Das Valin $_{1,c}$ scheint dem Glycin bzw. den Glycinen, welche(-s) dem ^{13}C -Signal e zugrundeliegt bzw. zugrundeliegen, benachbart zu sein.

5.2.2 Temperaturabhängige Messungen

Aus dem vorhergehenden Kapitel geht hervor, dass das ^{13}C -NMR-Spektrum aufgrund einer ausreichenden Separation der Linien am geeignetsten für eine Konformationsbestimmung ist. Die Feinstruktur der Glycin- α -Signale konnte nur mit dieser Methode bestimmt sowie die zusätzlichen Carbonylsignale detektiert werden. Abb. 5.20 zeigt die Änderungen im ^{13}C -1D-Spektrum, welche mit der Erhöhung der Temperatur einhergehen. Es wird deutlich, dass die relative Höhe der Signale a , b , c , d und e mit zunehmender Temperatur abnimmt. Die Abnahme der Höhe sowie die Änderung der chemischen Verschiebung von c fällt hierbei besonders stark aus, während die anderen Signale selbst bei 80 °C nicht vollständig verschwunden sind. Der Rückgang der relativen Intensität dieser zusätzlichen Signale ist damit wohl auf die Abnahme der Population der zugrundeliegenden Kerne zurückzuführen. Die Reduktion der Signalintensität aufgrund eines Koaleszenzeffektes ist sehr unwahrscheinlich, da ausschließlich die als „zusätzlich“ klassifizierten Signale betroffen sind.

Für die Kohlenstoffkerne wurden für vier verschiedene Temperaturen (278, 300, 333 und 348 K) die jeweiligen T_1 -Relaxationszeiten bestimmt. Abb. 5.21 zeigt ein 3D-Diagramm, in dem die relative Intensität der Signale als Funktion der chemischen Verschiebung δ und der Mischzeit d_2 aufgetragen ist. Für die jeweiligen Kohlenstoffkerne konnte durch Anpassung der Signalhöhen als Funktion der Mischzeit d_2 die Relaxationsrate T_1 berechnet werden. Gemäß Formel 3.27 bzw. 4.1 wurden daraus die Rotationskorrelationszeiten $\tau_{\text{est.}}$ bestimmt. Tabelle 5.1 sind die so berechneten Werte zu entnehmen.

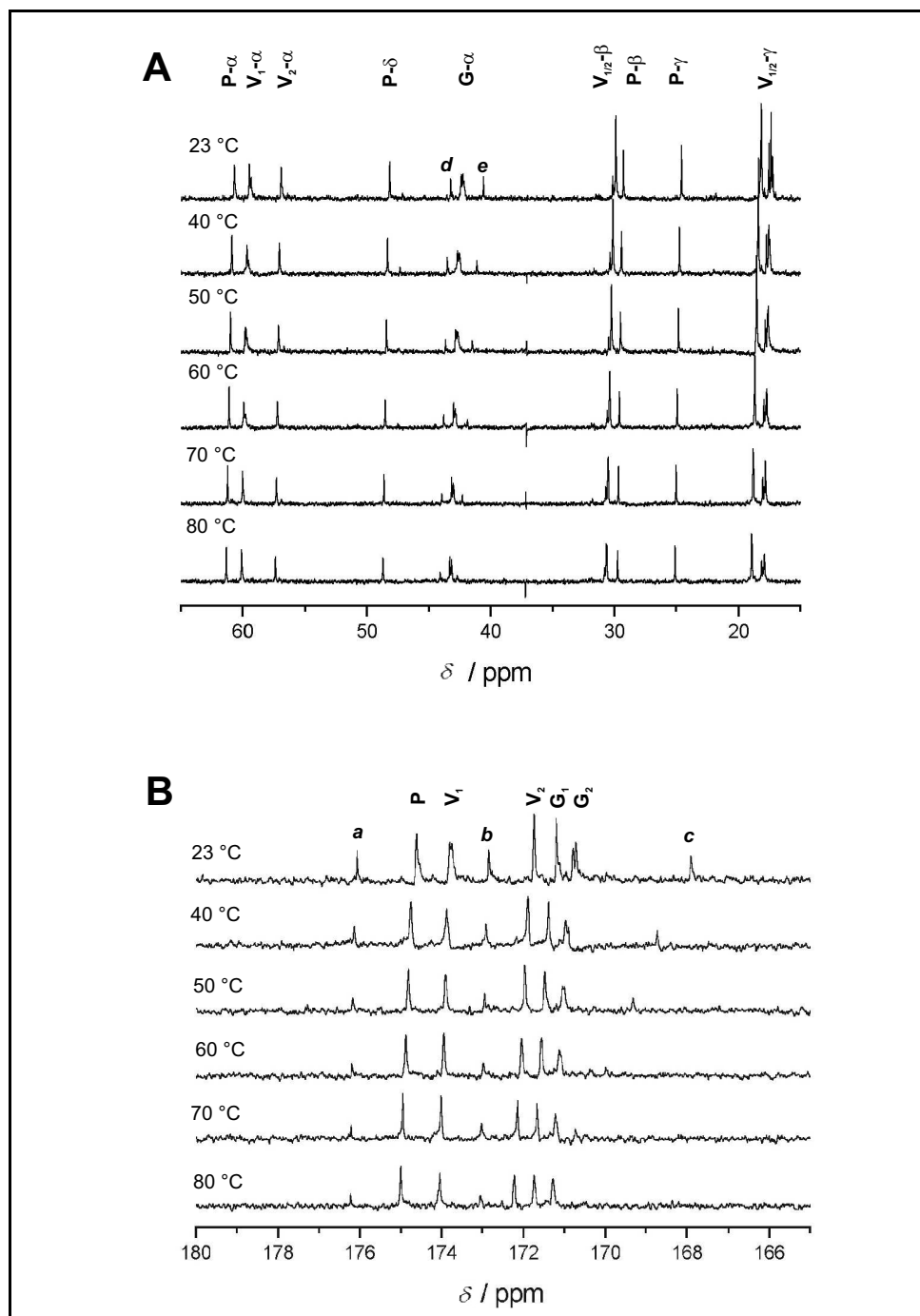


Abbildung 5.20: ^{13}C -1D-Spektren von $G_1V_1G_2V_2P$ in Abhängigkeit der Temperatur. Abschnitt A zeigt den Hochfeld-, Abschnitt B den Tieffeldbereich mit den Carbonylkohlenstoffen. Die relative Höhe der Signale a , b , c , d und e nimmt mit steigender Temperatur ab, wobei das Signal c eine wesentlich stärkere Temperaturabhängigkeit bezüglich der chemischen Verschiebung und der Signalintensität aufweist.

Tabelle 5.1: T_1 -Raten und abgeschätzte Rotationskorrelationszeiten $\tau_{\text{est.}}$ des Octadecamers bei 278, 300, 333 und 348 K.

^{13}C -Atom	$T_1(278 \text{ K}) / \text{s}$	$T_1(300 \text{ K}) / \text{s}$	$T_1(333 \text{ K}) / \text{s}$	$T_1(348 \text{ K}) / \text{s}$	$\tau_{\text{est.}}(278 \text{ K}) / \text{ns}$	$\tau_{\text{est.}}(300 \text{ K}) / \text{ns}$	$\tau_{\text{est.}}(333 \text{ K}) / \text{ns}$	$\tau_{\text{est.}}(348 \text{ K}) / \text{ns}$
P-C=O	1,0 +/- 0,1	1,7 +/- 0,3	1,7 +/- 0,2	2,5 +/- 0,2	0,93 +/- 0,09	0,6 +/- 0,1	0,55 +/- 0,06	0,37 +/- 0,03
V ₁ -C=O	1,2 +/- 0,2	1,3 +/- 0,2	2,0 +/- 0,1	2,4 +/- 0,4	0,9 +/- 0,1	0,8 +/- 0,01	0,52 +/- 0,03	0,43 +/- 0,07
V ₂ -C=O	1,02 +/- 0,07	1,3 +/- 0,1	2,1 +/- 0,2	2,6 +/- 0,3	1,02 +/- 0,07	0,79 +/- 0,06	0,49 +/- 0,05	0,40 +/- 0,05
G ₁ -C=O	1,01 +/- 0,08	1,7 +/- 0,1	2,2 +/- 0,2	2,5 +/- 0,4	0,71 +/- 0,06	0,42 +/- 0,02	0,33 +/- 0,03	0,29 +/- 0,05
G ₂ -C=O	0,9 +/- 0,1 1,0 +/- 0,2	1,5 +/- 0,4 -	2,2 +/- 0,4 -	3,8 +/- 0,7 -	0,8 +/- 0,1 0,7 +/- 0,2	0,5 +/- 0,1 -	0,33 +/- 0,06 -	0,19 +/- 0,03 -
P α	0,35 +/- 0,02 -	0,4 +/- 0,02 -	0,54 +/- 0,03 0,54 +/- 0,03	0,56 +/- 0,04 0,56 +/- 0,04	0,126 +/- 0,007 -	0,110 +/- 0,006 -	0,081 +/- 0,005 0,081 +/- 0,005	0,079 +/- 0,006 0,079 +/- 0,006
V ₁ α	0,36 +/- 0,03	0,43 +/- 0,02	0,75 +/- 0,06	0,84 +/- 0,05	0,12 +/- 0,01	0,122 +/- 0,005	0,059 +/- 0,005	0,052 +/- 0,003
V ₂ α	0,31 +/- 0,03	0,41 +/- 0,02	0,45 +/- 0,04	0,59 +/- 0,07	0,14 +/- 0,01	0,107 +/- 0,005	0,098 +/- 0,009	0,075 +/- 0,009
P δ	0,2 +/- 0,01	0,26 +/- 0,02	0,29 +/- 0,01	0,39 +/- 0,05	0,110 +/- 0,006	0,085 +/- 0,007	0,076 +/- 0,003	0,056 +/- 0,007
G α	0,17 +/- 0,02 -	0,236 +/- 0,007 -	0,3 +/- 0,02 0,3 +/- 0,02	0,36 +/- 0,03 0,41 +/- 0,05	0,13 +/- 0,02 -	0,093 +/- 0,003 -	0,073 +/- 0,005 0,073 +/- 0,005	0,061 +/- 0,005 0,054 +/- 0,007
V _{1,2} β	0,37 +/- 0,05 0,35 +/- 0,01	0,51 +/- 0,03 0,41 +/- 0,01	0,9 +/- 0,1 0,53 +/- 0,03	- 0,71 +/- 0,05	0,12 +/- 0,02 0,126 +/- 0,004	0,085 +/- 0,005 0,107 +/- 0,003	0,049 +/- 0,006 0,083 +/- 0,005	- 0,062 +/- 0,004
P β	0,28 +/- 0,01	0,34 +/- 0,01	0,42 +/- 0,03	0,46 +/- 0,05	0,079 +/- 0,003	0,065 +/- 0,002	0,052 +/- 0,004	0,048 +/- 0,005
P γ	0,32 +/- 0,02	0,40 +/- 0,02	0,51 +/- 0,02	0,63 +/- 0,09	0,069 +/- 0,004	0,055 +/- 0,003	0,043 +/- 0,002	0,035 +/- 0,005
V ₁ γ	0,32 +/- 0,02 0,340 +/- 0,007 0,297 +/- 0,008	0,6 +/- 0,03 0,52 +/- 0,01 0,429 +/- 0,008	0,76 +/- 0,02 - -	1,06 +/- 0,05 - -	0,046 +/- 0,003 0,0432 +/- 0,0009 0,049 +/- 0,001	0,024 +/- 0,001 0,0283 +/- 0,0005 0,0342 +/- 0,0006	0,0193 +/- 0,0005 - -	0,0138 +/- 0,0007 - -
V ₂ γ	0,4 +/- 0,01 0,4 +/- 0,01 0,4 +/- 0,02 0,46 +/- 0,02	0,53 +/- 0,02 0,586 +/- 0,008 0,66 +/- 0,04 -	1,02 +/- 0,05 1,2 +/- 0,1 0,93 +/- 0,05 -	- - 1,23 +/- 0,09 -	0,037 +/- 0,001 0,037 +/- 0,001 0,037 +/- 0,002 0,032 +/- 0,001	0,028 +/- 0,001 0,0251 +/- 0,0003 0,022 +/- 0,001 -	0,0144 +/- 0,0007 0,012 +/- 0,001 0,0158 +/- 0,0009 -	- - 0,0119 +/- 0,0009 -
G _a -C=O	4,2 +/- 0,8	11 +/- 5	11 +/- 2	8 +/- 3	0,17 +/- 0,03	0,07 +/- 0,04	0,07 +/- 0,01	0,09 +/- 0,04
G _b -C=O	-	2,6 +/- 0,6	-	6 +/- 3	-	0,28 +/- 0,07	-	0,12 +/- 0,08
V _{1,c} -C=O	-	1,9 +/- 0,3	-	-	-	0,55 +/- 0,09	-	-
G _d α	0,36 +/- 0,04	0,7 +/- 0,1	1,3 +/- 0,1	-	0,061 +/- 0,007	0,031 +/- 0,005	0,018 +/- 0,001	-
G _e α	-	0,25 +/- 0,03	-	-	-	0,09 +/- 0,01	-	-

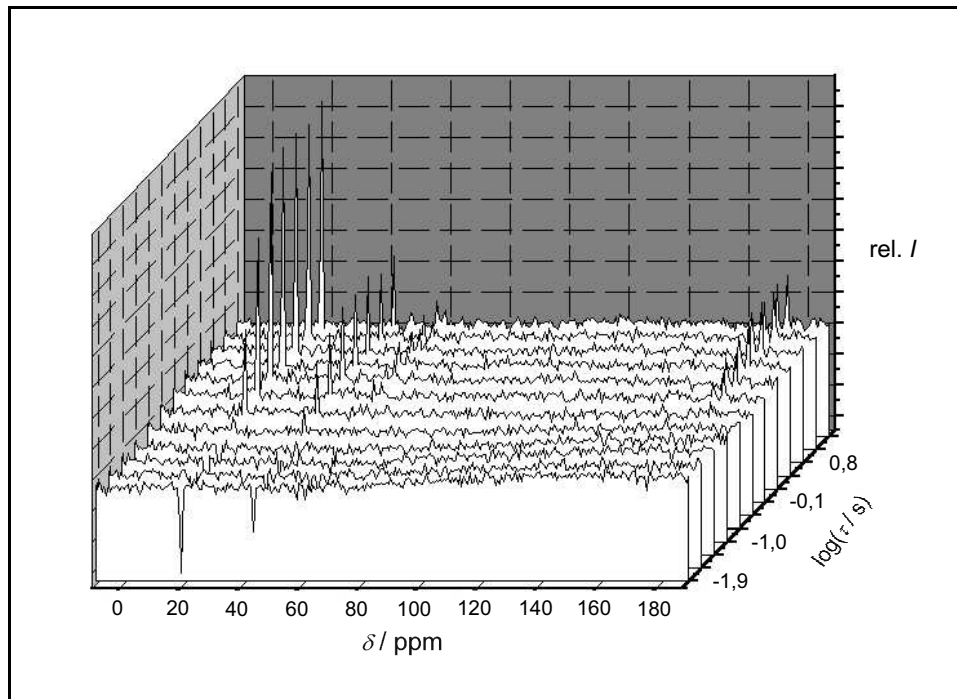


Abbildung 5.21: 3D-Diagramm eines Datensatzes zur T_1 -Bestimmung von GVG(VPGVG)₃ bei Raumtemperatur. Gezeigt sind die erhaltenen ¹³C-1D-Spektren als Funktion der Mischzeit d_2 . Durch Anpassen der Signalhöhen der jeweiligen Kerne gemäß Gleichung 3.29 kann T_1 erhalten werden.

Einige Hauptsignale des ¹³C-Spektrums sind in kleinere Einzelsignale aufgespalten; so besteht die Glycin- α - und die Glycin₂-Carbonyl-Bande aus jeweils zwei leicht verschobenen Einzelsignalen, für die teilweise beide T_1 -Zeiten ermittelt werden konnten. Für die Valin- γ -Kohlenstoffe konnten bis zu vier Einzelsignale aufgelöst werden, und neben dem Valin- β -Peak findet sich ein schwaches, gering tieffeldverschobenes Signal. Diese Einzelsignale werden den jeweiligen Hauptsignalen zugeordnet, da die Verschiebungen nur sehr gering sind und im HSQC- bzw. HMQC-Spektrum auch keine zusätzliche Information über sie gewonnen werden konnte.

Im unteren Teil der Tabelle 5.1 sind die Daten für die zusätzlichen Kohlenstoffe a , b , c , d und e aufgelistet. Diese Signale sind schwächer als die Hauptsignale und nehmen mit steigender Temperatur ab, so dass teilweise nur für einzelne Temperaturen die T_1 -Zeiten bestimmt werden konnten. Für den Glycin-Carbonylkohlenstoff a zeigt sich deutlich, dass die T_1 -Werte sehr hoch sind - so hoch, dass die Bedingung $5T_1 < d_1$ sogar nicht mehr erfüllt ist und damit die Werte auch nicht quantitativ auswertbar sind. Allerdings lässt sich feststellen, dass die Dynamik dieses Kernes außerordentlich hoch ist, was eine terminale Position des entsprechenden Glycins nahelegt. Auch das Glycin-Carbonyl b weist überdurchschnittlich hohe T_1 -Werte auf, die zwar nicht ganz so hoch wie bei

a sind, aber auch eine terminale Position wahrscheinlich machen. Für das Valin₁-Signal c konnte nur ein einziger Wert bestimmt werden. Dieser ist signifikant höher als der des entsprechenden Valin₁-Hauptsignals. Allerdings fällt der Unterschied im Rahmen der Genauigkeit nicht so hoch aus, als dass man von einer wesentlich höheren Dynamik dieser Reste sprechen könnte, und die eine Zuordnung zu einer terminalen Position rechtfertigte. Das Glycin- α -Signal d weist, verglichen mit dem Glycin- α -Hauptsignal, T_1 -Werte auf, welche doppelt bis dreifach so groß sind. Entsprechend fallen die abgeschätzten Rotationskorrelationszeiten wesentlich schneller aus. Auch hier legt die höhere Dynamik eine terminale Position nahe, was in Anbetracht des Befundes, dass dieses Glycin-Signal den Glycin-Carbonylkohlenstoffen a und b zugeordnet werden kann (vgl. Kap. 5.2.1), ein stimmiges Bild ergibt: Die Glycin-Reste, welche a , b und d zugrundeliegen, können aufgrund ihrer abweichenden Lage im ^{13}C -Spektrum und ihrer außerordentlich hohen Dynamik also mit hoher Wahrscheinlichkeit einer terminalen Gruppierung des Peptids zugeordnet werden. Für den Glycin- α -Peak e , dessen zugehöriges Glycin bzw. dessen zugehörige Glycine aufgrund von Betrachtungen im Kapitel 5.2.1 wahrscheinlich vicinal zu dem Valin₁ c ist bzw. sind, konnte wie im Falle des Valin₁ c nur bei einer Temperatur von 300 K ein T_1 -Wert bestimmt werden, der im Rahmen der Genauigkeit nicht vom entsprechenden Wert des Glycin- α -Hauptsignals abweicht. Die T_1 - bzw. $\tau_{\text{est.}}$ -Werte legen für das Valin₁ c und dem Glycin- α e keine terminale Position nahe, also ist hier wahrscheinlicher von einer anderen konformereren Struktur der zugrundeliegenden Aminosäurereste auszugehen. Wie Abb. 5.20 zu entnehmen ist, nimmt die relative Höhe der zusätzlichen Signale a , b , c , d und e mit zunehmender Temperatur ab, d.h., dass der Anteil der zusätzlichen Konformation c und e sowie der terminale „Charakter“ der Reste a und b mit steigender Temperatur abnimmt.

Im Folgenden sollen die Änderung der T_1 -Raten der Hauptsignale mit der Temperatur genauer betrachtet werden. Abb. 5.22 zeigt eine Auftragung der T_1 -Raten in Abhängigkeit der Temperatur für die Carbonylkohlenstoffe, Abb. 5.23 die entsprechende Auftragung für die C- α - und Seitenkettenkohlenstoffe. Es ist ersichtlich, dass für keinen Kern ein Rückgang der T_1 -Werte mit steigender Temperatur zu erkennen ist. Da das Octadekamer mit zunehmender Temperatur einen höheren Grad an Struktur annimmt, sollte man eigentlich erwarten, dass zumindestens Atome, welche an wichtigen Strukturelementen der β -Schleife beteiligt sind, kleinere T_1 -Zeiten aufweisen, da eine Zunahme an Struktur (erhöhter Faltungsgrad) mit rückläufiger Dynamik einhergehen sollte. Ursache für diese Abweichung vom erwarteten Verhalten könnte in der außerordentlich hohen intrinsischen Dynamik des GVG(VPGVG)₃-Moleküls liegen, bei der die temperaturabhängige Erhöhung der Dynamik durch gesteigerte Dreh- und Translationsbewegungen die gleichzeitige Einschränkung der Dynamik durch Zunahme des Faltungsgrades - wie z.B. durch starrere Bindungswinkel oder Fixierung durch

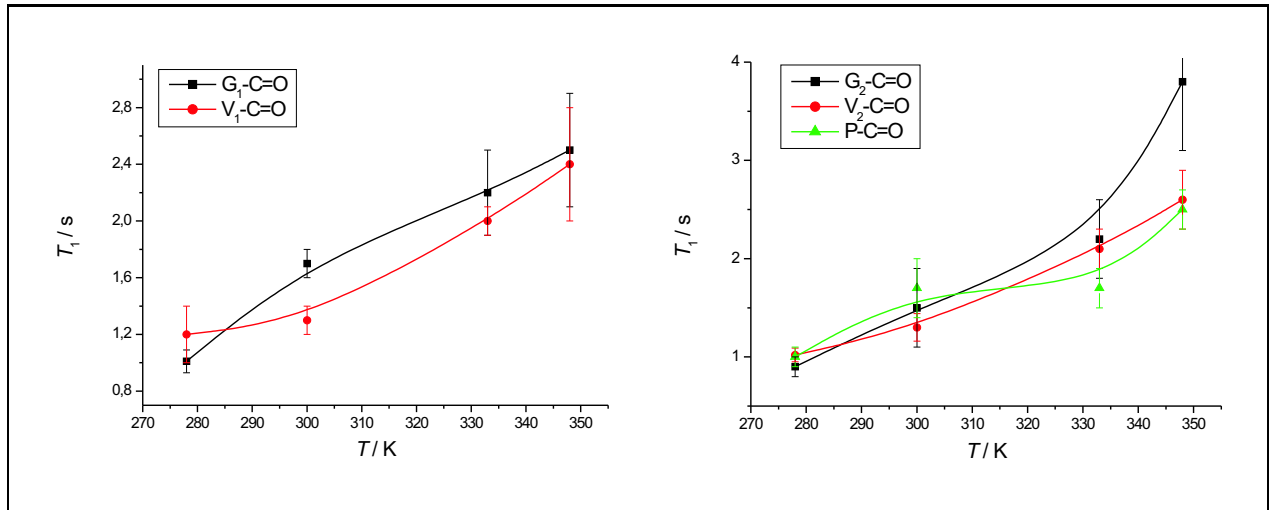


Abbildung 5.22: Änderungen der T_1 -Zeiten mit der Temperatur für die Carbonylkohlenstoffe. Durch die Werte wurden zur besseren Übersicht mit der Funktion *B-spline* eine Kurve gelegt.

Wasserstoffbrücken - teilweise oder vollständig kompensiert.

Schaut man sich den Verlauf der T_1 -Zeiten mit steigender Temperatur an, so fällt jedoch auf, dass für einige Kohlenstoffkerne die T_1 -Werte nicht mit einem exponentiellen Anstieg in Übereinstimmung gebracht werden können, wie man es gemäß der Arrhenius-Gleichung erwarten würde (siehe Gleichung 3.28). Dies kann als ein Hinweis auf eine Zunahme des Faltungsgrades gewertet werden, der die thermisch induzierte Erhöhung der Dynamik teilweise kompensiert und so zu einer Abweichung vom exponentiellen Anstieg führt.

Es wurden die relative Änderungen der abgeschätzten Rotationskorrelationszeit berechnet, d.h. die Quotienten aus der Differenz $\tau_{\text{est.}}(348\text{K}) - \tau_{\text{est.}}(278\text{K})$ und $\tau_{\text{est.}}$ bei 278 K. Bei dieser Vorgehensweise wird so der einzelnen Dynamik der Kerne, die unspezifisch durch die reine Temperaturerhöhung beschleunigt werden kann, Rechnung getragen.

Abb. 5.24 zeigt die entsprechende Auftragung der relativen Änderung von $\tau_{\text{est.}}$ gegen die Kohlenstoffkerne des pentameren Motivs G₁V₁G₂V₂P. Es wird deutlich, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen ¹³C-Kernen gering ausfallen. Die Valin-¹³C- γ -Kerne, d.h. die Methylkohlenstoffe des Valins, welche die mobilsten im Molekül sind, weisen zusammen mit dem Glycin₂-Carbonylkohlenstoff den höchsten Zuwachs an Dynamik mit steigender Temperatur auf. Die sterisch gehinderten Prolin-¹³C- α und -¹³C- β , welche sich in einem Ring befinden, zeigen den niedrigsten Zuwachs an Mobilität. Insgesamt liegen alle Werte in einem Bereich einer Abnahme von $\tau_{\text{est.}}$ von etwa 50 % +/- 20 %. Die Unterschiede zwischen den Werten sind klein, aber die Fehlerbalken überlappen nicht allesamt, was man im Rahmen des oben gewonnenen Bildes interpretieren kann: die Zunahme der Dynamik

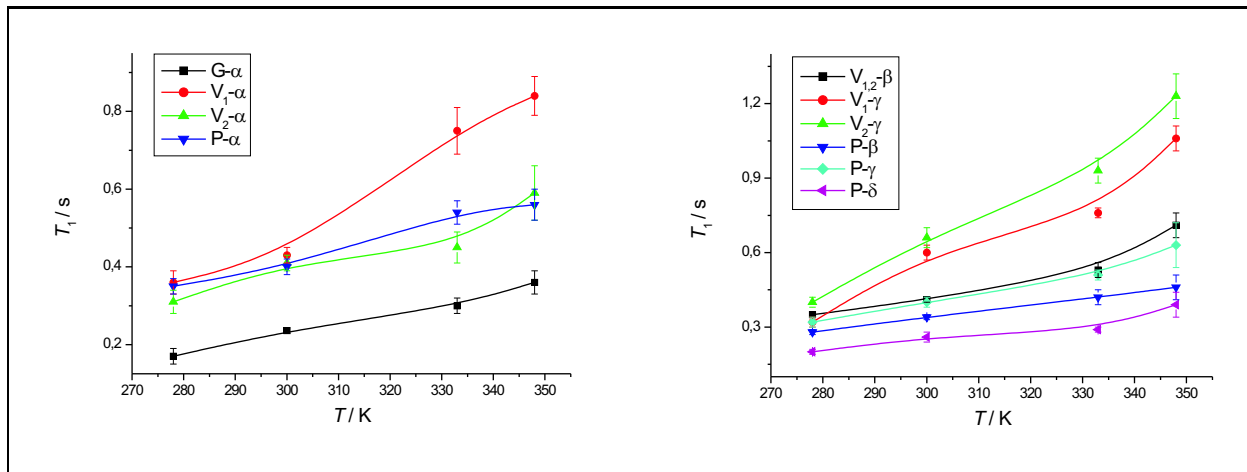


Abbildung 5.23: Änderungen der T_1 -Raten mit der Temperatur für die C- α - (links) und die Seitenkettenkohlenstoffe (rechts). Durch die Werte wurde zur besseren Übersicht mit der Funktion *B-spline* eine Kurve gelegt.

durch die Temperaturerhöhung kompensiert im Wesentlichen die Einschränkung der Dynamik, welche aus der Zunahme des Faltungsgrades resultiert. Kleine, relative Unterschiede können dennoch festgestellt werden.

Abb. 5.25 zeigt die Auftragung des Logarithmus von T_1 gegen T^{-1} gemäß der Arrheniusgleichung (vgl. Gleichung 3.28) für die Rückgratkohlenstoffe. Abb. 5.26 sind die entsprechenden Auftragungen für die Seitenkettenkohlenstoffe zu entnehmen. Der Eindruck, welcher schon bei der Betrachtung der Auftragung von T_1 gegen T gewonnen wurde, bestätigt sich hier: während sich die Werte für einige Kohlenstoffkerne gut mit einer linearen Funktion annähern lassen (z.B. P- β , P- γ , V₂ - γ), weichen die Datenpunkte für andere Kerne (z.B. P-C=O, P- δ) erheblich von einer linearen Funktion ab. Diese Abweichungen vom Arrhenius-Verhalten deuten, wie oben schon diskutiert, auf eine Zunahme des Faltungsgrades innerhalb der Molekülpopulation hin.

Betrachtet man sich die Werte der Tabelle 5.1 insgesamt, so spannen die Rotationskorrelationszeiten $\tau_{\text{est.}}$ in einem Bereich von 10^{-11} s für die Valin- γ -Kohlenstoffe bis 10^{-9} s für die Carbonylkohlenstoffe. Erwartungsgemäß weisen die Rückgratkohlenstoffe höhere Rotationskorrelationszeiten als die Seitenkettenatome auf. $\tau_{\text{est.}}$ liegt für letztere in einem Bereich, wie man ihn typischerweise für freie Aminosäuren erwartet (0,01 - 0,1 ns [67]). Die Dynamik ist für ein 18-meres Polypeptid also sehr hoch.

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse am besten innerhalb eines Modells deuten, bei dem ein Ensemble von gefalteten bzw. teilgefalteten GVG(VPGVG)₃-Molekülen neben einem mit ungefalteten Konformationen koexistiert. Die hohe Dynamik spricht einerseits für eine hohe intrinsische

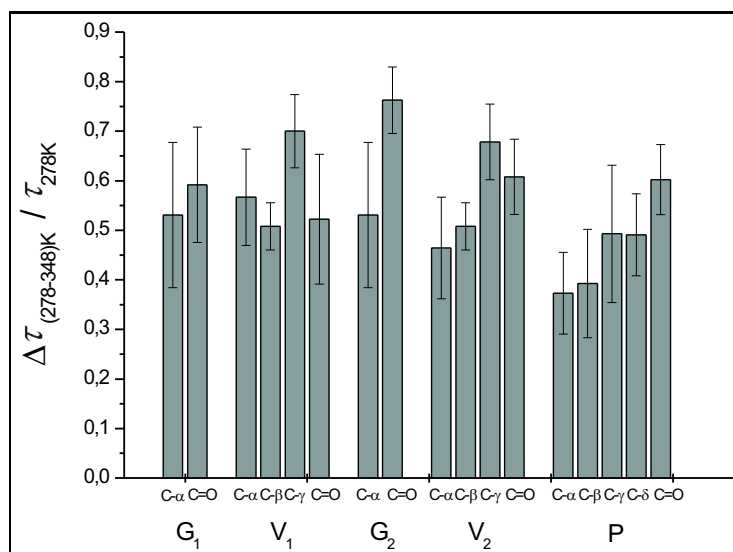


Abbildung 5.24: Auftragung der relativen Änderung von $\tau_{\text{est.}}$ im Temperaturintervall zwischen 278 und 348 K gegen die Sequenz $G_1V_1G_2V_2P$. Die einzelnen Aminosäurereste sind noch hinsichtlich der Kohlenstoffe, aus denen sie bestehen, in C- α -, C- β -, C- γ -, C- δ - und Carbonyl-Kohlenstoffe (C=O) unterteilt.

Beweglichkeit, d.h. für einen hohen Anteil von Molekülen mit ungefalteten Konformationen. Andererseits deuten die Reduktion der Population der terminalen Glycine *a* und *b* mit steigender Temperatur sowie die Abweichungen einiger T_1 -Zeiten vom Arrhenius-Verhalten auf eine Zunahme des Faltungsgrades innerhalb der Molekülpopulationen.

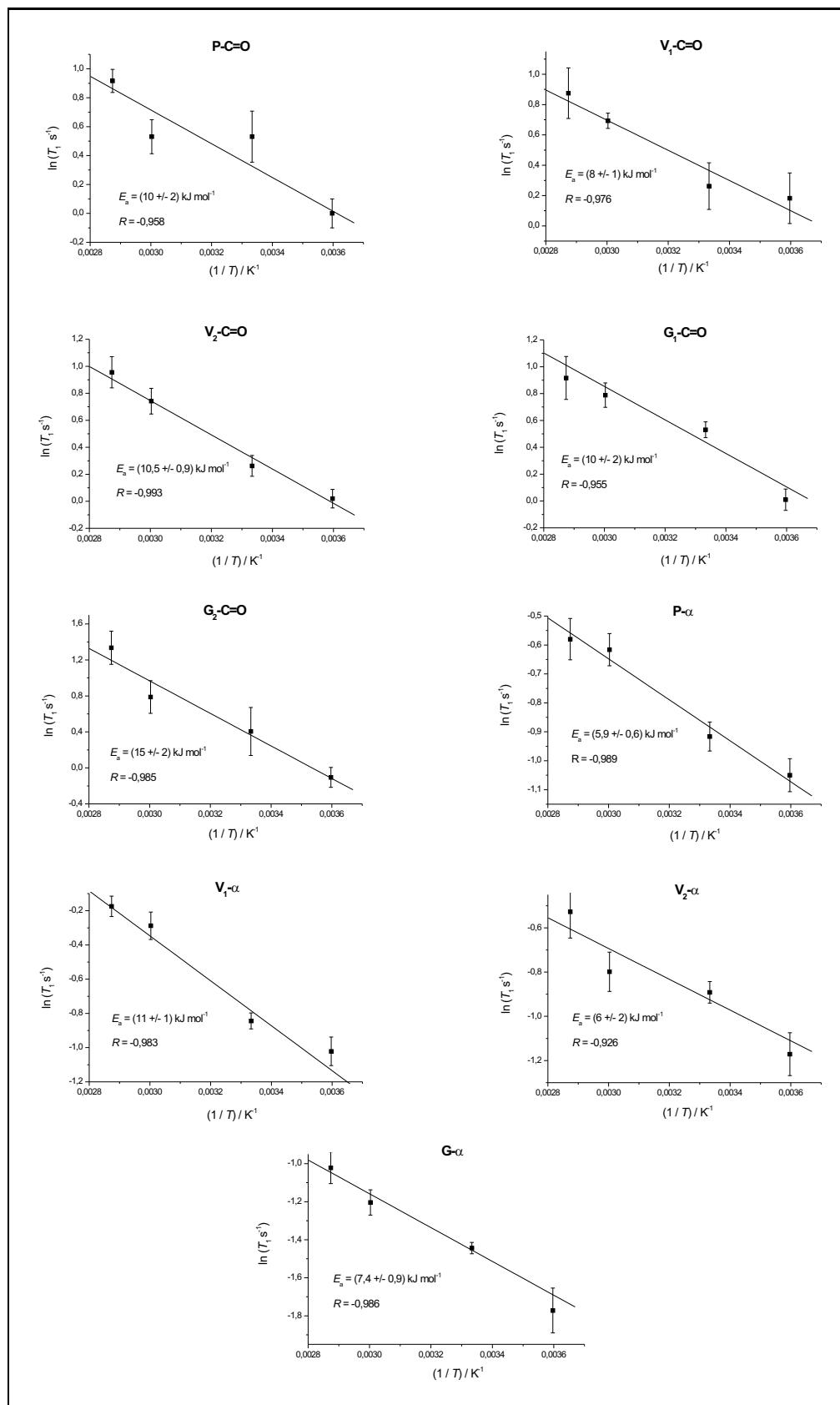


Abbildung 5.25: Auftragung von $\ln(T_1)$ gegen die reziproke Temperatur gemäß Gleichung 3.28 für die Rückgratkohlenstoffe von GVG(VPGVG)₃. Durch die Werte wurde mittels linearer Regression eine Gerade gelegt, aus deren Steigung die Aktivierungsenergie E_a berechnet werden kann. Der Korrelationskoeffizient R ist jeweils angegeben.

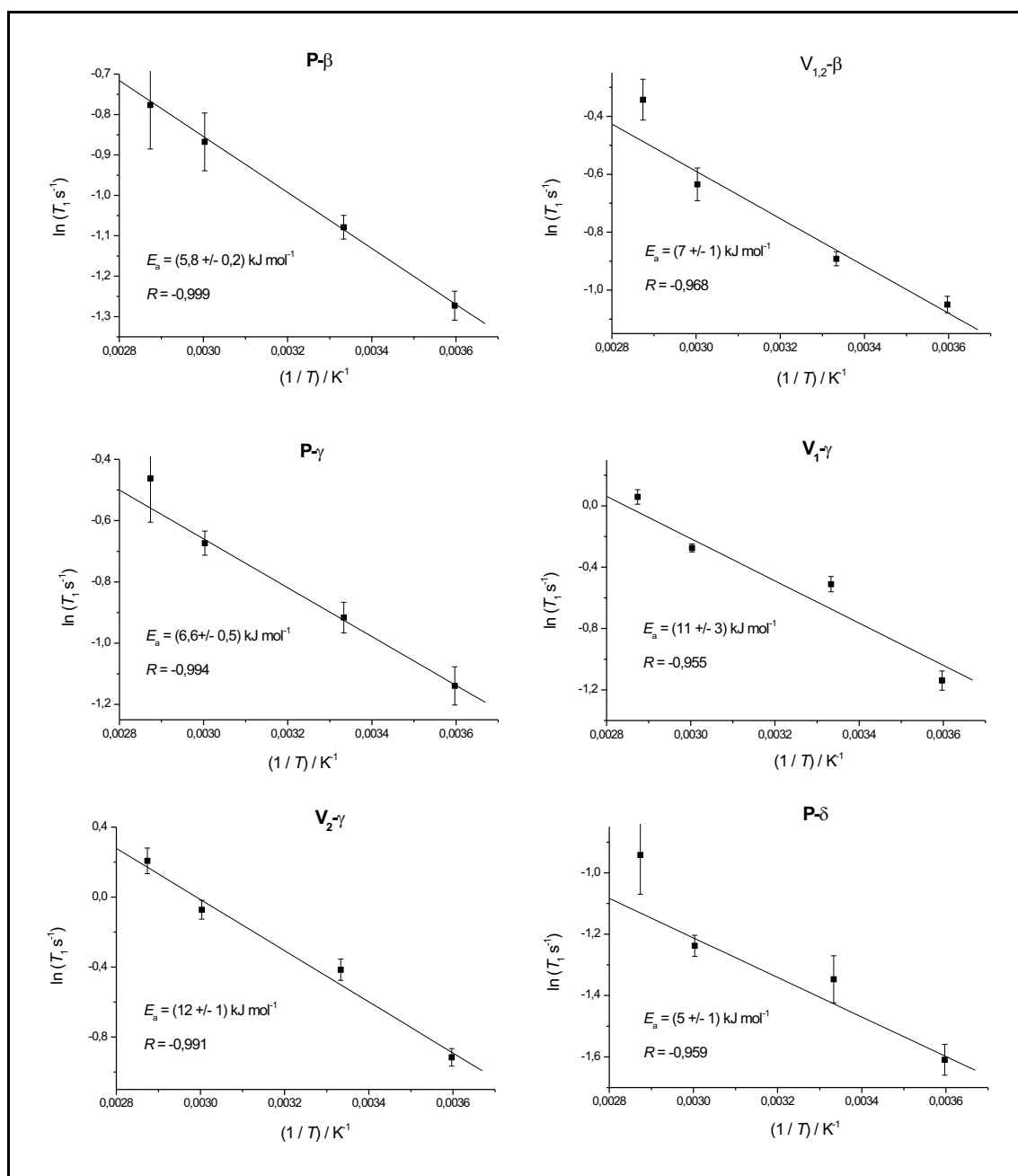


Abbildung 5.26: Auftragung von $\ln(T_1)$ gegen die reziproke Temperatur gemäß Gleichung 3.28 für die Seitenkettenkohlenstoffe von GVG(VPGVG)₃. Durch die Werte wurde mittels linearer Regression eine Gerade gelegt, aus deren Steigung die Aktivierungsenergie E_a berechnet werden kann. Der Korrelationskoeffizient R ist jeweils angegeben.

5.2.3 ^1H - ^1H -2D-NOESY

Abb. 5.27 zeigt das Konturdiagramm des ^1H - ^1H -2D-NOESY-Spektrums von GVG(PVGVG)₃ bei Raumtemperatur. Im Amidbereich konnten nur sehr schwache Signale erhalten werden, vermutlich weil bei dem verwendeten pH von 7 die Austauschzeiten zu hoch sind und so die Amidsignale nicht mehr vom Spektrometer aufgelöst werden konnten. Daher ist in Abb. 5.27 der Hochfeldbereich nicht dargestellt. Im Tieffeldbereich ist eine größere Anzahl von Kontakten innerhalb von Aminosäureresten zu erkennen. So sind Kreuzkorrelationssignale für die Paare $V\gamma$ - $V\beta$, $V\gamma$ - $V\alpha$ und $V\alpha$ - $V\beta$ der Valine sowie für $P\alpha$ - $P\beta$, $P\beta$ - $P\gamma$, $P\beta$ - $P\delta$, $P\gamma$ - $P\delta$ und $P\beta$ - $P\delta$ des Prolins sichtbar. Als NOE-Kontakte zwischen verschiedenen Aminosäurereste können deutlich die Kreuzsignale zwischen $V\gamma$ und $P\delta$ sowie zwischen $V_2\alpha$ und $P\delta$ identifiziert werden. Letztere Zuordnung ist zwar etwas kritisch, da das $P\alpha$ - und $V_2\alpha$ -Signal sehr eng beieinanderliegen, aber der Vergleich mit der $P\alpha$ - $P\delta$ -Kreuzkorrelation zeigt, dass das betreffende Signal hierzu leicht hochfeldverschoben ist, also eher dem $V_1\alpha$ zugeordnet werden kann. Die Bestimmung dieser $V\gamma$ - $P\delta$ und $V_2\alpha$ - $P\delta$ -Kontakte ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein des Typ II- β -Schleifen Motivs, da man in diesem Fall genau diese Signale erwartet [50].

Die verschobene Prolin- δ -Kopplung $P\text{-}\delta_{\text{sh}}$, welche schon im COSY-Spektrum aufgefallen ist (vgl. Abb. 5.16), ist auch im NOESY zu erkennen und zeigt Korrelationssignale mit dem $P\beta_1/P\gamma_1$ -Bereich, was die vorgenommene Zuordnung bestätigt. Darüber hinaus lassen sich jedoch keine weiteren Kontakte finden.

Unterhalb der $P\delta_2$ -Frequenz lässt sich ein weiteres Signal erkennen, welches von der Lage her ebenfalls einem Prolin- δ oder einem Glycin- α zugeordnet werden kann. Da es NOE-Kontakte mit Prolin- β - und Prolin- γ -Protonen aufweist, handelt es sich hier wohl um ein leicht verschobenes Prolin- δ -Proton ($P\delta_3$). Es koppelt wie Prolin- δ_1 und Prolin- δ_2 mit dem Valin- γ -Protonen, allerdings auch mit dem Prolin- α und interessanteweise nicht mit dem Valin₂-, sondern mit dem Valin₁- α -Wasserstoff. Neben dem Befund aus dem COSY-Spektrum besteht hiermit ein Hinweis auf eine weitere, zweite abweichende Prolin-Konformation mit signifikanter Population.

Neben den Valin- γ -Prolin- δ -Kopplungen sind auch Kreuzkorrelationssignale zwischen Valin- γ und der Prolin- β /Prolin- γ -Region erkennbar. Eine mögliche Erklärung dieser Signale könnte das Vorhandensein von Kontakten über die pentamere Untereinheit hinaus sein [50]. Dies könnte als Hinweis auf einen Grad „höherer“ Ordnung über die pentamere Untereinheit hinaus gewertet werden.

Weiterhin sind im NOESY-Spektrum Korrelationspeaks mit dem Lösungsmittel Wasser zu entnehmen, obwohl während der Experimente das Signal des Lösungsmittels unterdrückt wurde. Dement-

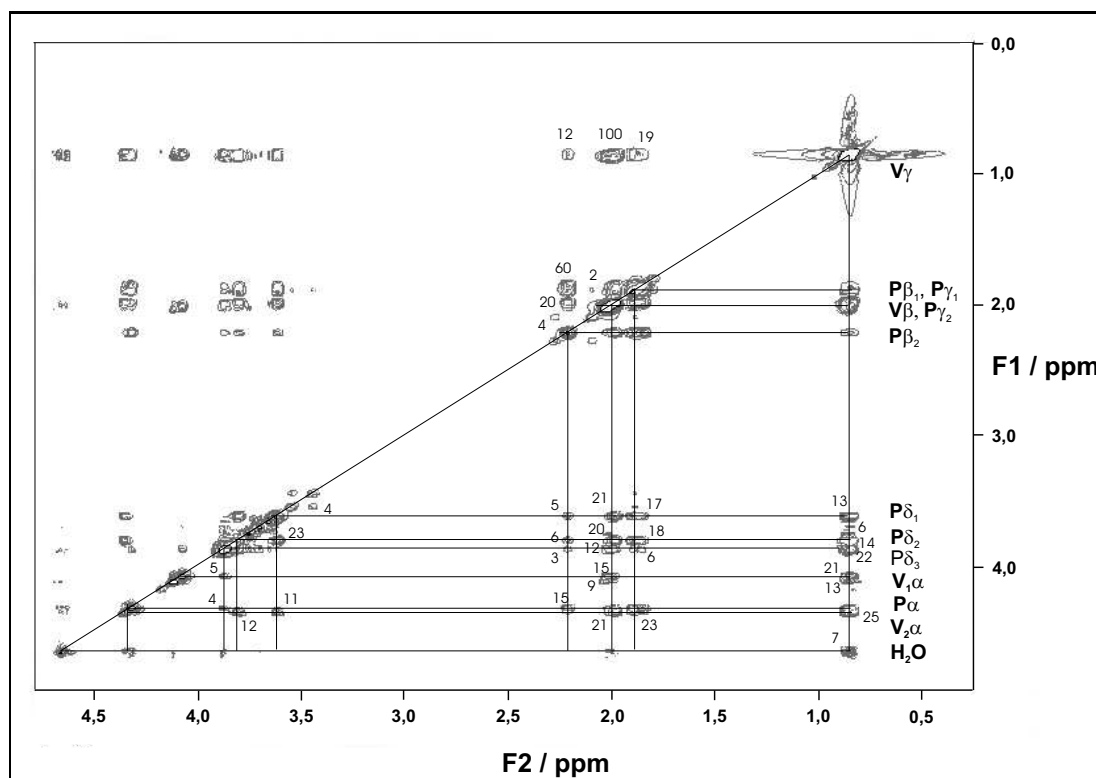


Abbildung 5.27: Konturdiagramm des homonuklearen ^1H -2D-NOESY-Spektrums des Octadecamers bei 300 K. Zur Übersicht wurden Hilfslinien entlang der Frequenzen der jeweiligen Kerne gezogen. Neben den Signalen ist die relative Höhe der jeweiligen Signale (Integrale) vermerkt.

sprechend ist die Form der Kreuzsignale verzerrt, aber das reine Vorhandensein dieser Korrelationen ist bemerkenswert, zumal es sich anscheinend nicht um vollkommen unspezifische Artefakte handelt, da das Wasser nur mit bestimmten Kernen korreliert (Valin- γ , Valin- β , Glycin $_1$ - α , Valin $_1$ - α , Prolin- α). Nichtsdestotrotz ist es unwahrscheinlich, dass es sich um echte, reine NOE-Kontakte handelt.

Insgesamt kann über das NOESY-Spektrum also das Typ II β -Schleifen-Motiv nachgewiesen werden. Daneben finden sich im Prolin- δ -Bereich abweichende Signale, welche auf zwei konformere Proline deuten.

Kapitel 6

Diskussion

6.1 Hitzedenaturierung von HEL

Verglichen mit den Entfaltungstemperaturen, welche sich in der Literatur finden (siehe [68] und die Referenzen, die dort angegeben werden), liegt der hier mittels DSC bestimmten T_m -Wert von 70 °C bei einem pD von 3,4 um ca. 6 °C niedriger. Diese Abweichung kann einerseits daran liegen, dass in dieser Arbeit ein anderes Puffersystem verwendet wurde, welches die Stabilität von HEL beeinflussen kann. Andererseits weist die pH-abhängige Stabilitätskurve von HEL im Bereich zwischen pH 4 und 2 einen starken Abfall auf, so dass geringe pH-Änderungen hier zu einer drastischen Verschiebung von T_m führen können. So finden sich bei [68] für einen pH von 3,8 Werte für T_m , ΔH_{cal} und ΔH_H von etwa 76 °C, 430 kJ/mol und 490 kJ/mol. Die Enthalpieänderungen ΔH_{cal} weichen also um knapp 10, die van't-Hoff-Enthalpien um knapp 5 % voneinander ab. In Anbetracht des unterschiedlichen pHs und der Tatsache, dass die Enthalpie-Werte je nach verwendeten Basislinien-Modell variieren können, sind diese Abweichungen akzeptabel. Die Motivation zur Durchführung der mikrokalorimetrischen Messungen innerhalb dieser Arbeit lag auch weniger in der Bestimmung thermodynamischer Kenndaten, als in der Charakterisierung des Übergangs, welcher sich auf Basis der DSC-Daten innerhalb eines Zweizustandsmodells interpretieren lässt. Die PPC-Kurve lässt sich ebenfalls in diesem Rahmen interpretieren. Die Änderungen von $\alpha(T)$ fallen in dieser Arbeit größer aus, als in der Literatur berichtet [64], allerdings lässt sich dies auch auf unterschiedliche pHs sowie der Tatsache zurückführen, dass hier, um eine Vergleichbarkeit mit den NMR-Daten zu gewährleisten, mit D₂O-Puffer gearbeitet wurde. Dieses ist strukturierter als normales, leichtes Wasser und führt so zu größeren temperaturabhängigen Änderungen von α . Die Charakterisierung des Entfaltungsübergangs durch die ¹H-NMR-spektroskopische Bestimmung des Histidin 15- δ -Signals

bestätigt die Zuordnung zu einem Zweizustands-Modell. Dies ist etwas verwunderlich, da in den kinetischen Protonen-Austauschexperimenten ein Zwischenzustand gefunden wird.

Klassischerweise wird die Hitzedenaturierung von Lysozym, anders als beim homologen α -Lactalbumin, im Gleichgewicht als Zweizustandsübergang beschrieben, welches nur ein transientes Intermediat aufweist [34]. Ausnahmen sind hier das Lysozym aus Pferde- und Hundemilch, welche einen stabilen *Molten Globule*-Zustand ausbilden [23, 69, 70]. Allerdings wird in neueren Arbeiten von teilweise entfalteten Gleichgewichts-Zwischenzuständen unter Einfluss von Guanidiniumhydrochlorid und niedrigem pH (pH 0,9; [71, 72]) sowie Hitze [40, 41, 38] berichtet. In einer theoretischen Arbeit mittels Computersimulationen wurde ein initiales, „quasi-stabiles“ Intermediat bei der thermischen Entfaltung gefunden, in welchem sich die Sekundärstruktur umlagert [73].

Vor diesem Hintergrund gilt es, das auf Basis der Protonen-Austausch-NMR gefundene Intermediat einzuordnen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten legen aufgrund der Abwesenheit eines Hinweises für diesen Zwischenzustand in den DSC-Messungen nahe, dass es sich tatsächlich um ein rein transientes, kinetisches Phänomen handelt. Die Diskussionen über Gleichgewichts- und transiente Zustände des Lysozyms in der Literatur zeigen jedoch, dass hier nicht voreilig geschlossen werden darf: Möglicherweise fällt dieses Intermediat bei der Verwendung von Standardmethoden wie CD-Spektroskopie oder DSC nicht auf, und erst der Einsatz kombinierter Methoden wie DSC und SAXS [40, 41], Protonenaustauschbestimmung mittels FTIR [38] oder die direkte Suche nach diesem Intermediat [71, 72] führen zu Anhaltspunkten, die auf das Vorhandensein dieses Zwischenzustands schließen lassen. Es könnte sein, dass dieses Intermediat mittels DSC nicht detektierbar ist und nur über struktursensitive Methoden wie z.B. der Protonen-Austausch- ^1H -NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden kann. Interessanterweise wurde in [38] das Intermediat ebenfalls über Protonen-Deuteronen-Substitution, die aber über FTIR-Spektroskopie vermessen wurde, gefunden. Allerdings tritt dort der Zwischenzustand schon bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen (≈ 46 °C) auf.

Es gibt also genügend Hinweise, das gefundene Intermediat diesem bereits in der Literatur diskutierten Zwischenzustand zuzuordnen. Ob es sich um einen stabilen oder transienten handelt, kann auf Grundlage der ermittelten Daten nicht entschieden werden, aber die in dieser Arbeit vorgenommene Charakterisierung über P -Faktoren ist in der Lage, den Strukturgrad dieses Intermediates einzuordnen und ihn mit P -Faktoren bekannter *Molten Globule*-Zustände anderer Proteine zu vergleichen. So sollte eine Einordnung dieses Intermediates zum bekannten *Molten Globule* oder, falls die P -Faktoren niedriger sind, zu einem Zustand, der einer vollständig entfalteten Konformation D näher steht, möglich sein. Sollte Letzteres der Fall sein, gäbe es eine Erklärung für die Abwesenheit eines Hinweises auf diesem Zustand im DSC: da das Intermediat mehr D ähnelt als N , wäre der

Übergang vom Intermediat zu D kaum bemerkbar, da nur wenn der Übergang vom Intermediat zu D mit einer signifikanten Enthalpieänderung verbunden ist, dies mittels DSC detektiert werden kann.

Ein Vergleich mit P -Faktoren aus der Literatur ist jedoch insofern schwierig, als die Darstellungen der Zwischenzustände von der Destabilisierung durch chemische Denaturantien über thermische Einwirkung bis zu Rückfaltungsexperimenten reichen, bei der das Protein ausgehend von der entfalteten Form D renaturiert wird. Weiterhin muss zwischen kinetischen und Gleichgewichtsexperimenten unterschieden werden. Darüber hinaus kann auch die Zuordnung zu einem *Molten Globule* kritisch sein: die Bindung von 1-Anilinonaphthalin-8-sulfonsäure, welche früher ein Kriterium hierfür war, erscheint zweifelhaft [74]. Für ein pH-induziertes, teilweise entfaltetes Intermediat von Apomyoglobin werden P -Faktoren bis 200 angegeben [75]; die harnstoffdenaturierte Form des T4-Lysozyms weist Schutzfaktoren bis knapp 4, das Rückfaltungsintermediat P -Faktoren bis zu 200 auf [76]. Für das kinetische Intermediat der P117G-Mutante der Staphylococcal Nuklease werden Schutzfaktoren bis zu 63 gefunden [77]. Durch chemische Agentien kann bei HEL ein teilentfalteter Zustand induziert werden. Hierfür wird in einer 25 % wässrigen Hexafluoracetonlösung von P -Faktoren bis zu 70 berichtet ([39], die Autoren bezeichnen diesen Zustand als „*molten globule like*“). Die durch 25 % Trifluorethanol induzierte Form weist Schutzfaktoren bis 200 auf [78]. Verglichen mit diesen Werten erscheinen die hier für HEL Ermittelten sehr klein und es liegt nahe, dass es sich bei dem thermisch induzierten Intermediat von HEL weniger um ein „klassisches“ *Molten Globule* handelt, sondern dass dessen Konformation eher dem des vollständig entfalteten Zustands D ähnelt. Dies würde auch die Schwierigkeit erklären, diesen Zustand zu detektieren: Da beim Übergang der denaturierten Form zum Intermediat nur geringe (energetische) Änderungen auftraten und der Hauptteil sich beim Übergang vom Intermediat zur nativen Form ergäbe, wirkt die Entfaltung insgesamt wie ein Quasi-Zwei-Stufen-Prozess. Dieses Bild stünde im Einklang mit unseren Messergebnissen und den Literaturdaten, bestätigt wird es weiterhin durch die Größe der P -Faktoren für das Intermediat, welche niedriger als diejenigen sind, welche sich in der Literatur finden.

In dieser Arbeit wurde, nach Wissen des Autors, zum ersten Mal das thermisch induzierte Intermediat von HEL über P -Faktoren identifiziert und charakterisiert. Zwar wurden Schutzfaktoren für die Hitzedenaturierung von HEL bereits veröffentlicht [57, 79], doch berichten diese nicht über ein Intermediat und ordnen nicht die gemessenen P -Faktoren explizit einem Zwischenzustand zu. Außerdem wurden diese Messungen bei einem anderen pH und nahe der mittleren Entfaltungstemperatur T_m vermessen, während in dieser Arbeit der Protonenaustausch bei 80 °C und damit bei einer Temperatur durchgeführt wurde, bei dem HEL im thermodynamischen Gleichgewicht voll-

ständig denaturiert vorliegt. Dennoch sollen an dieser Stelle die hier gemessenen Werte mit der Literatur verglichen werden, bietet sich doch hier eine Möglichkeit eines direkten Vergleichs, da beide Datensätze unter thermischer Einwirkung gemessen wurden. Abb. 6.1 zeigt einen Vergleich der P -Faktoren in Abhängigkeit der Sequenzposition, wie sie nach [57] bei einer Temperatur von 69 °C und in dieser Arbeit bei 80 °C bestimmt wurden. Es fällt auf, dass die Werte in der Größenordnung übereinstimmen, im Detail sich allerdings teilweise erhebliche Differenzen zeigen. Im Mittel weichen die Werte um 40 % voneinander ab, insbesondere im β -Faltblattbereich zwischen den Resten 41 und 60 findet man starke Unterschiede. Bei den Experimenten in dieser Arbeit scheint also die β -Domäne strukturierter zu sein. Übereinstimmend jedoch finden sich die höchsten Schutzfaktoren an bzw. nahe bei verbrückten Cysteinen (Cystein 64 und 97; das Cystein 115 konnte in der vorliegenden Arbeit leider nicht aufgelöst werden). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Temperaturen und der Tatsache, dass bei der Berechnung von k_{rc} die Aktivierungsenergien als temperaturunabhängig angenommen werden, stimmen die Werte, bis auf diejenigen im β -Faltblattbereich, recht gut überein.

Buck *et al.* beschreiben den thermisch induzierten denaturierten Zustand auf Basis der niedrigen P -Faktoren als einen im Wesentlichen Entfalteten, dessen Reststruktur starken Fluktuationen unterliegt. Dies steht im Einklang mit den obigen Betrachtungen, die das Intermediat weniger als *Molten Globule* als einen Zustand, der einem vollständig Entfalteten entspricht, charakterisieren.

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Sorbitol die Aktivierungsenergie der Entfaltung von HEL kaum beeinflusst [68] und dies wurde dahingehend gedeutet, dass hier die Stabilisierung der nativen Form N über die Destabilisierung der entfalteten Form D erreicht wird. Wie auf Basis des preferentiellen-Ausschluss-Mechanismus' zu erwarten (siehe Kap. 2.5), interagiert Sorbitol nicht mit der nativen Form N , sondern hauptsächlich mit dem Lösungsmittel Wasser, wodurch sich das chemische Potential des hydratisierten Proteins erniedrigt. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass für das thermisch induzierte Intermediat von HEL kaum Änderungen der P -Faktoren bei Anwesenheit von Sorbitol verzeichnen lassen: Das Sorbitol sorgt im Wesentlichen für eine Destabilisierung der vollständig entfalteten Form, die Konformation des nativen Zustands N oder evtl. Intermediate wird hingegen kaum beeinflusst [80]. Bei erhöhten Temperaturen, bei der die Konfigurationsentropie ΔS_{conf} , die treibende Kraft der Hitzdenaturierung ist, fällt der Einfluss des Sorbitols also kaum ins Gewicht.

Insgesamt gesehen legen die Daten also das Vorhandensein eines kinetischen, möglicherweise auch thermodynamisch stabilen, Intermediates nahe, welches nur noch einen geringen Rest an nativer Struktur besitzt, welches aber von den P -Faktoren her weniger als *Molten Globule* zu bezeichnen

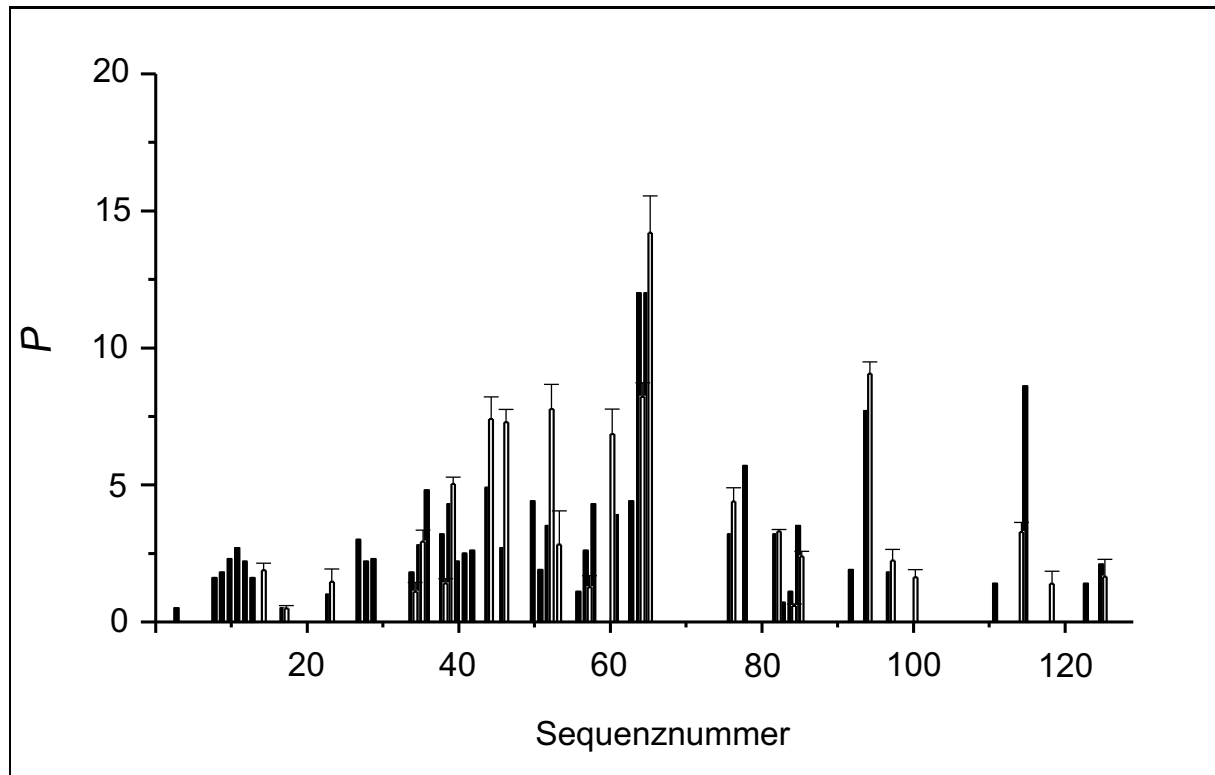


Abbildung 6.1: Vergleich der P -Faktoren für das thermisch induzierte Intermediat (weiße Balken) und nach Buck *et al.* ([57]; schwarze Balken). Große Abweichungen finden sich im β -Faltblattbereich zwischen Aminosäurerest 41 und 60; übereinstimmend finden sich die höchsten P -Faktoren bei oder nahe bei den disulfidverbrückten Cysteinen 64 und 97.

ist. Die Werte legen einen niedrigeren Strukturgrad nahe, bei dem der höchste Schutz durch Cysteinbrücken vermittelt wird.

6.2 Kältedenaturierung von HEL

Vergleicht man die P -Faktoren der Kältedenaturierung mit denen, welche bei thermischer Destabilisierung von HEL erhalten wurden, so ist ersichtlich, dass sie wesentlich größer sind. Bei der Kältedenaturierung handelt es sich offensichtlich um eine mildere Art der Entfaltung, bei der ein höherer Grad an Reststruktur erhalten bleibt. Die Höhe der Schutzfaktoren passt eher zu den Werten, wie sie für stabile Intermediate bzw. *Molten Globules* berichtet werden (vgl. Kap. 6.1). Vergleicht man die hier erhaltenen P -Faktoren mit denen, wie sie von Nash *et al.* [55] berichtet werden, so fällt auf, dass die hier bestimmten Werte etwas größer sind; das Cystein 97 zeigt einen starken Unterschied. Dies könnte darin begründet sein, dass Nash *et al.* 1,5 mM 3-(Trimethylsilyl)-2, 2, 3, 3- d_4 -Propionsäure als Referenzsubstanz verwendeten. In dieser Arbeit fiel bei Vorexperimenten auf,

dass 3-(Trimethylsilyl)-1-Propansulfonsäure, welches zur Kalibrierung der chemischen Verschiebung dient, ein deteregenzähnliches Verhalten aufwies und zur Schaumbildung führte, weshalb bei den Experimenten auf derlei Referenzsubstanz verzichtet wurde. Insbesondere bei der Kältedenaturierung, bei der Hydratisierungsphänomene vermutlich eine dominierende Rolle spielen, könnten Detergenzien einen unerwünschten Einfluss nehmen. Dies könnte die Unterschiede, welche gefunden wurden, erklären. Insgesamt jedoch stimmen die Werte qualitativ überein und bestätigen, dass es sich bei dem druckunterstützten, kältedenaturierten Zustand um eine teilentfaltete Struktur handelt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es auch, den Einfluss chaotroper bzw. kosmotroper Substanzen auf die Struktur eines stabilen, teilentfalteten Zustands zu untersuchen. Die meisten Studien bisher charakterisierten stabilisierende bzw. destabilisierende Einflüsse über die Bestimmung makroskopischer Parameter wie T_m oder thermodynamischer Größen wie ΔG_{unf} ; Einflüsse auf molekularem Niveau konnten darüber hinaus nicht erhalten werden. Eine interessante Frage ist diejenige, ob Cosolventien einen schrittweisen Einfluss haben, d.h. ob sie nach und nach diskrete Elemente innerhalb des Proteins stabilisieren bzw. destabilisieren, oder ob der Einfluss hochkooperativ verläuft, d.h. das Protein konzertiert, quasi im Sinne eines „Alles-oder-nichts“-Phasenübergangs betrifft. Dies ist auch hinsichtlich der Frage wichtig, was unter einer „teilentfalteten“ Struktur genau zu verstehen ist: Handelt es sich um eine Struktur, bei der bestimmte Strukturelemente persistent vorhanden sind, während andere dauerhaft entfaltet sind, oder eher um ein Ensemble von Strukturen, die mehr oder minder Fluktuationen unterliegen.

Im Lichte der erhobenen Daten scheint für die druckunterstützte Kältedenaturierung von HEL letzteres der Fall zu sein. Es konnten keine Abschnitte innerhalb der Sequenz gefunden werden, welche Hinweise auf eine abweichenden Grad an Stabilisierung bzw. Destabilisierung aufwiesen. Der Einfluss der Cosolventien ist sehr einheitlich, d.h. verläuft hochkooperativ.

Daher bedeutet „teilentfaltete Struktur“ also weniger, dass bestimmte Bereiche von HEL gefaltet sind, während andere vollkommen entfaltet sind, sondern dass alle Bereiche des Proteins zu einem gewissen Grad fluktuieren, d.h. teilentfaltet sind.

6.3 Thermisch induzierte Faltung des Polypeptids

GVG(VPGVG)₃

Bei der Bestimmung der T_1 -Zeiten konnte für keinen ^{13}C -Kern eine Abnahme der Werte mit Erhöhung der Temperatur festgestellt werden. Lediglich die Abweichungen vom Arrhenius-Verhalten können als ein Indiz für eine Zunahme des Strukturgrades, d.h. der Bildung der β -Schleifen-Konformation

gewertet werden. Die Anwesenheit dieses Strukturmotivs konnte durch die Valin- γ -Prolin- δ - und Valin₂- α -Prolin- δ -Kopplungen belegt werden. Auch konnte durch CD-spektroskopische Messungen, welche von Chiara Nicolini am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Universität Dortmund durchgeführt wurden (siehe Abb. 6.2), ein Übergang von einer ungeordneten zu einer β -Schleifen-Konformation in einem breiten Bereich zwischen ca. 0 °C und 100 °C nachgewiesen werden.

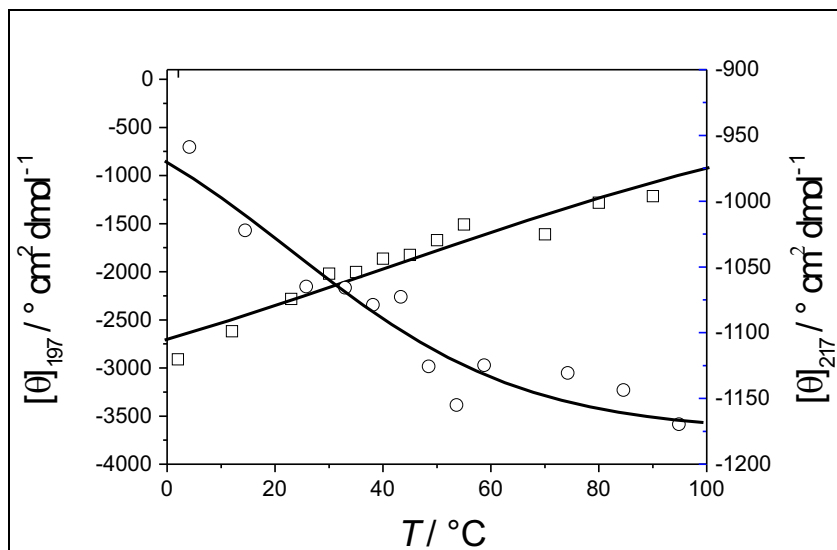


Abbildung 6.2: Änderungen der Elliptizität des Octadekamers bei 197 (□) und 217 (○) nm zwischen 0 und 100 °C. Die Änderungen belegen den Übergang von einer ungeordneten zu einer Typ II β -Schleifen-Konformation.

Eine Erklärung für die Abwesenheit einer absoluten Abnahme an Beweglichkeit liegt wahrscheinlich in der generell hohen Dynamik des Octadekamers. Die abgeschätzten Rotationskorrelationszeiten liegen teilweise in dem Bereich für freie Aminosäuren, was von einer sehr hohen Mobilität des Moleküls zeugt. Wenn die Moleküle viele Freiheitsgrade an Bewegung besitzen, welche bei der Zunahme der Temperatur weiter angeregt werden, könnte im Vergleich dazu die Abnahme der Dynamik durch die Zunahme an Struktur sehr gering ausfallen. Der Übergang erstreckt sich über einen weiten Temperaturbereich (vgl. Abb. 6.2), so dass dem System beim Übergang viel thermische Energie zugeführt wird. So erhöht sich im gesamten die Dynamik des Systems, und die Zunahme des Faltungsgrades macht sich daher nur in kleinen Abweichungen vom Arrhenius-Verhalten bemerkbar.

Die Aktivierungsenergien E_a , welche für GVG(VPGVG)₃ bestimmt wurden, liegen zwischen 5 (P- δ) und 15 kJ mol⁻¹ (G₂-C=O). Für Kohlenstoffe des Dekapeptids *LHRH* (engl.: *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone*) z.B. findet man in der Literatur [81] Werte zwischen etwa 10 und 30 kJ mol⁻¹. Die hier am GVG(VPGVG)₃-Molekül bestimmten Werte liegen also im Mittel um den Faktor zwei niedriger und zeugen von einer niedrigen Rotationsbarriere für die Aminosäurereste des

elastin-mimetischen Peptids.

NMR-spektroskopisch konnten Subpopulationen identifiziert werden: In den ^{13}C -1D-Spektren konnten zusätzliche Signale von zwei Glycinen und einem Valin₁ entdeckt werden. Anhand der T_1 -Zeiten befinden sich die Glycine vermutlich in terminalen Positionen; sie könnten aber beide auch zu einer einzigen terminalen GVG-Gruppierung gehören. Der T_1 -Wert des Valins *c* lässt keine eindeutige terminale Zuordnung zu. In den homonuklearen ^1H -2D-COSY- und NOESY-Spektren finden sich verschobene Prolin- δ -Signale (P- δ_{sh} und P- δ_3), die auf Subpopulationen mit Prolinen in abweichender Konformation schließen lassen. Dementsprechende Abweichungen in den ^{13}C -Spektren sind allerdings nicht zu verzeichnen. Für die verschobenen Prolin- δ_{sh} -Kopplung im 2D-COSY-Spektrum lassen sich im NOESY-Spektrum keine weitergehenden Informationen gewinnen. Das verschobene Prolin-Signal im NOESY (Prolin- δ_3) hingegen zeigt ein Kreuzkorrelationssignal mit einem Valin- α in der Position 1. Dies ist etwas ungewöhnlich, da das Prolin und das Valin₁ durch das Glycin₁ voneinander getrennt sind, was für eine ungewöhnliche Geometrie der beteiligten Reste spricht. Eine Erklärung hierfür wäre, dass der Kontakt über die pentamere Untereinheit hinaus zustande kommt. Das carboxy-terminale Valin₁ z.B. kann dem N-terminalen Prolin sehr nahe kommen. Der Befund, dass auch NOE-Korrelationssignale zwischen der Valin- γ - und der Prolin- β /Prolin- γ -Region gefunden wurden, spricht für diese Erklärung. In der Struktur des GVG(VPGVG)₃ in der β -Schleifenkonfiguration (vgl. Abb. 2.13) nähern sich die γ -Protonen des carboxy-terminalen Valin₁ den β -Protonen des N-terminalen Prolins bis auf etwa 0,22 nm; der geringste Abstand zwischen den entsprechenden Valin- γ -Protonen und Prolin- γ -Protonen beträgt ca. 0,33 nm. Auf Basis dieser Struktur ließe sich das Vorhandensein der jeweiligen NOE-Kontakte also erklären. Allerdings beträgt der Abstand zwischen dem Valin₁- α - und den Prolin- δ -Protonen hier gut 8 nm, was unvereinbar mit dem vorhandenen NOE-Signal zwischen dem Prolin- δ_3 und einem Valin₁- α ist. Hier müsste, wenn das Signal wirklich aus der Nähe des carboxy-terminalen Valins und des N-terminalen Prolins resultiert, eine andere Geometrie vorliegen.

Ob es sich bei dem hier gefundenen Kontakt zwischen dem Prolin- δ_3 - und dem Valin₁-Signal um dasjenige Valin₁ handelt, welches in den ^{13}C -Spektren aufgefallen ist (Signal *c*), kann aufgrund mangelnder verbindener Informationen zwischen ^{13}C - und ^1H -Spektren nicht beurteilt werden. Eine Auswertung der Signalintensitäten im NOESY gemäß der ISPA (engl.: *isolated spin pair approximation*) um die Kernabstände zu berechnen, ergab keine sinnvoll interpretierbaren Ergebnisse. Wahrscheinlich war die gewählte Mischzeit von 1,2 s für eine quantitative Analyse zu lang und/oder die Dynamik entlang der Polypeptidkette zu hoch und zu heterogen, so dass hierüber keine zusätzlichen Informationen erhalten werden konnten. Ein Zusammenhang zwischen dem Prolin- δ_3 -Valin₁- α

Korrelationssignal und dem zusätzlichen Signal c des ^{13}C -1D-Spektrums sowie eine Zuordnung des entsprechenden Valins zu einer terminalen Position liegt insofern nahe, als dass der NOE-Kontakt strukturell schlecht über eine räumliche Nähe innerhalb einer pentameren Einheit erklärt werden kann; weiterhin zeigt das Signal c des ^{13}C -1D-Spektrums wie die Signale der terminalen Glycine a und b eine Intensitätsabnahme mit steigender Temperatur. Dem steht allerdings die relativ geringe Dynamik entgegen, die nicht wesentlich höher als die des V_1 -Hauptsignals ist. Sollte also ein terminales V_1 Urheber obiger Signale im ^1H , ^1H -2D-NOESY- und im ^{13}C -1D-Spektrum sein, so müsste es strukturell über z.B. eine Wasserstoffbrücke stabilisiert sein, um die relativ geringen T_1 -Zeiten zu erklären.

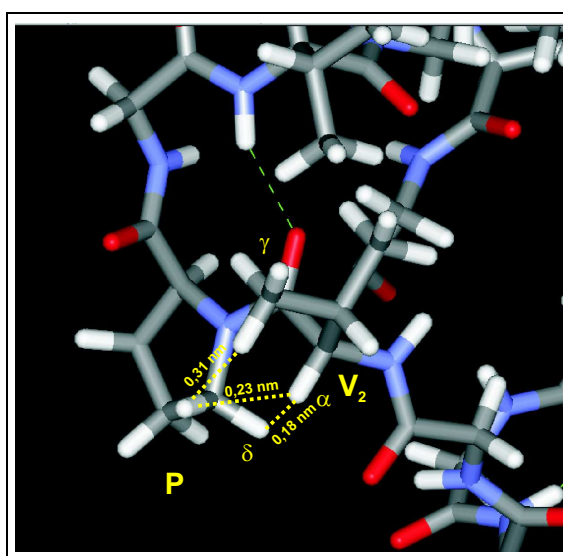


Abbildung 6.3: 3D-Darstellung der Aminoäurereste V_2 und P von $\text{GVG}(\text{VPGVG})_3$ im β -Schleifen-Motiv. Das V_2 - α -Proton und die V_2 - γ -Protonen sind nahe bei den P - δ -Protonen und führen so zum entsprechenden Kreuzkorrelationssignal im NOESY-Spektrum.

Die sich aus diesen Erörterungen ergebenden Konsequenzen für die Konformation des Polypeptids im teilgefalteten Zustand sind in Abb. 6.3 bis 6.5 zusammengefasst. Abb. 6.3 zeigt die Struktur zwischen dem V_2 und dem P in der β -Schleifen-Konformation und verdeutlicht, wie die Nähe der α -, γ und δ -Protonen die vorgefundenen NOE-Signale erklären kann und auf das Vorhandensein der Typ II- β -Schleife zurückzuführen sind. Abb. 6.4 ist ein strukturelles Muster zu entnehmen, welches die Ursache der NOE-Signale zwischen V - γ - und P - β/γ -Protonen sein könnte. Durch die räumliche Nähe einzelner β -Schleifen (hier: der ersten und der dritten) können sich die jeweiligen Protonen nahe kommen. Natürlich sind auch andere Konformationen denkbar, die zu einer Nähe entsprechenden Protonen führen könnten. Ein Vorschlag, wie die Konformation aussehen könnte, die zu dem Muster der Kreuzkorrelationen des Signals δ_3 passt, ist in Abb. 6.5 dargestellt. Eine Kopplung zwischen

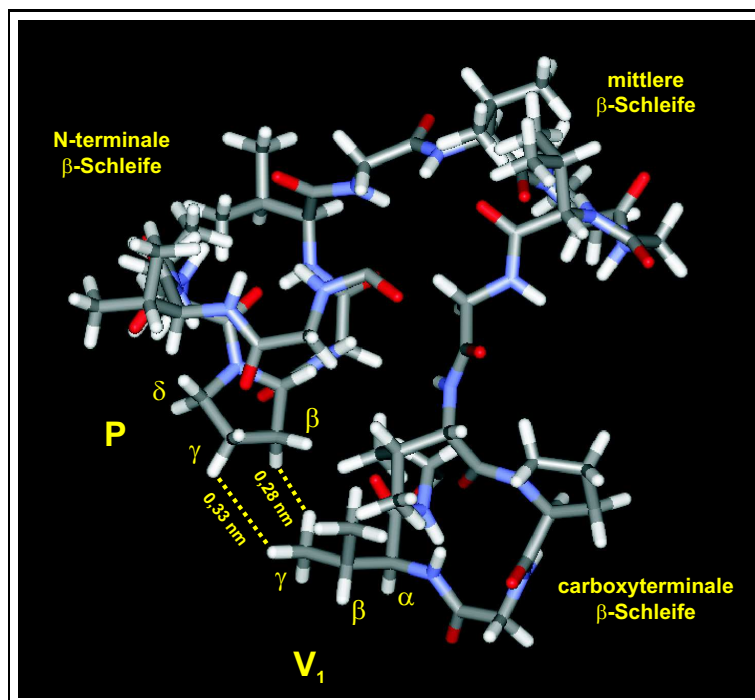


Abbildung 6.4: Interpentamerer Kontakt zwischen dem carboxyterminalen Valin und N-terminalen Prolin, das die gefundenen $V\text{-}\gamma\text{-P-}\beta/\gamma$ -Kontakte erklären könnte.

$P\text{-}\delta$ -Protonen und einem $V_1\text{-}\alpha$ -Proton ist auch hier innerhalb des pentameren $G_1V_1G_2V_2P$ -Motivs eher unwahrscheinlich. Damit aber die $P\text{-}\delta$ -Protonen exponiert genug sind, müsste das Prolin so orientiert sein, dass die entsprechende β -Schleife nicht mehr ausgebildet werden kann (entsprechend fehlt der $P\text{-}\delta\text{-V}_2\text{-}\alpha$ -Kontakt). Wenn das gegenüberliegende V_1 entsprechend orientiert ist, kann ein interpentamerer NOE-Kontakt entstehen. Allerdings ist auf Basis dieser Struktur nicht zu erklären, wie es zum NOE-Kontakt zwischen dem $P\text{-}\delta$ und dem $P\text{-}\alpha$ kommt.

Es ist zu betonen, dass die hier gezeigten Strukturen Vorschläge sind, die bildlich herausstellen sollen, welche Informationen dem NOESY-Spektrum, das bei Raumtemperatur gemessen wurde, zu entnehmen sind. Sie beschreiben mögliche stabile Konformationen, welche neben der ungeordneten Konformation auftreten, die den Hauptteil im Ensemble der Peptidmoleküle darstellt. Auch von den Vorschlägen abweichende Strukturen sind denkbar, welche die Signale im NOESY-Spektrum erklären können, jedoch ist die relativ kompakte Struktur der Abb. 2.13, auf der die Überlegungen basieren, durchaus plausibel. Insgesamt kann aufgrund der Komplexität des Systems mit drei pentameren VPGVG-Sequenzen, die vielerlei Konformationen annehmen können, über die zugrundeliegenden Strukturen nur spekuliert werden. Hier böten sich molekulardynamische Simulationen an, in denen gezielt nach Subpopulationen gesucht und deren Struktur mit den NMR-Ergebnissen verglichen werden kann. Tabelle 6.1 fasst die gefundenen Signale, den spektroskopischen Nachweis

und die Zuordnung bzw. weitergehende Interpretation der Daten zusammen.

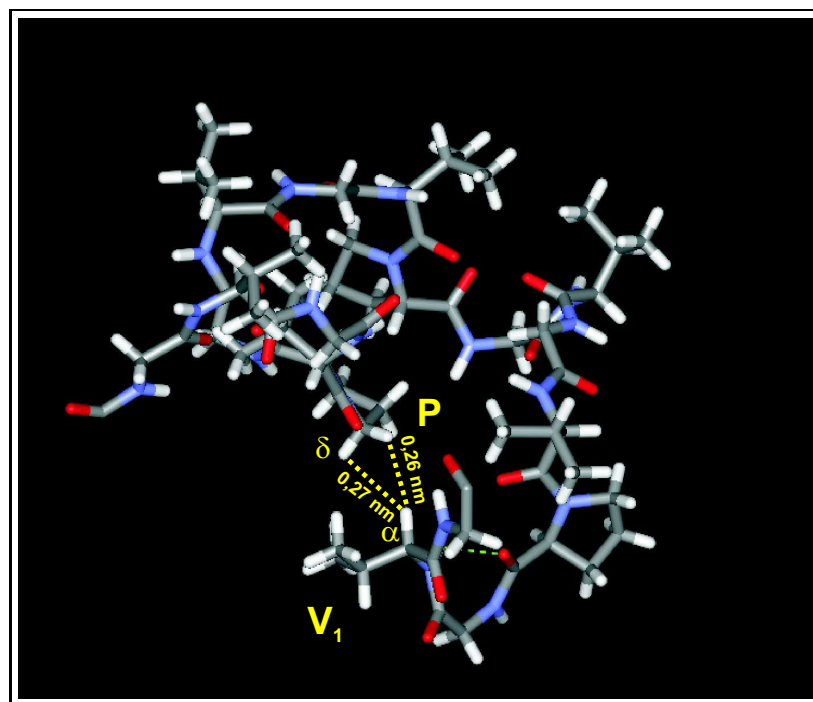


Abbildung 6.5: Strukturvorschlag für das Polypeptid GVG(VPGVG)₃ auf Basis der δ_3 -Kreuzkorrelationen. Die N-terminale β -Schleife ist, ausgehend von der Struktur in Abb. 2.13 bzw. 6.3, durch Drehung des Prolins aufgelöst worden, was die P- δ -Protonen zum carboxy-terminalen Valin exponiert. Dies trägt der Beobachtung Rechnung, dass das P- δ_3 nicht mit einem V₂- α koppelt. Das carboxyterminale V₁ ist so gedreht worden, dass sein α -Proton den P- δ -Protonen zugewandt ist und so einen NOE-Kontakt zwischen einem P- δ und einem V₁- α , wie er hier gefunden wurde, erklären könnte.

Vergleicht man die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Charakterisierung von GVG(VPGVG)₃ insgesamt mit denen, wie sie für die hochpolymere Form dieses Polypeptids beschrieben werden ($M_r \approx 10^5$ g/mol, [65]), so fällt auf, dass sie im Wesentlichen übereinstimmen. Für niedrige Temperaturen stimmen die ¹³C-1D-Spektren bzgl. den Hauptsignale überein, lediglich die hier als zusätzliche Signale identifizierten fehlen, was die Zuordnung dieser zu terminalen Gruppen erhärtet. Bei höheren Temperaturen ändern sich die spektralen Eigenschaften des Hochpolymers, was in der Literaturstelle auf (Pre-)Aggregationsphänomene zurückgeführt wird. Derlei Änderungen konnten für das Octadekamer nicht gefunden werden.

Auch stimmen die gefundenen T_1 -Werte gut überein, was angesichts der Tatsache überraschend ist, als die hochpolymere Form eine molekulare Masse besitzt, welche ca. 70 mal größer ist als die des Octadekamers. Für GVG(VPGVG)₃ finden sich sogar Relaxationszeiten, welche niedriger sind als die des Hochpolymers. Da T_1 invers proportional zur Rotationskorrelationszeit ist (siehe Formel 3.27), bedeutet dies, dass die Dynamik dieser Kerne im Octadekamer niedriger als im Hochpolymer

Tabelle 6.1: Zusammenfassende Darstellung der NMR-Ergebnisse über die Hochtemperaturkonformation des Polypeptids GVG(VPGVG)₃.

Signal bzw. Kopplung	Methode	Zuordnung
V- γ -P- δ V ₂ - α -P- δ	¹ H, ¹ H-2D-NOESY	Typ II β -Schleife, CD-spektroskopisch bestätigt
V- γ -P- β/γ	¹ H, ¹ H-2D-NOESY	interpentamerer NOE-Kontakt
verschobene P- δ -H-Kopplung P- δ_{sh}	¹ H, ¹ H-2D-COSY und -NOESY	konformeres Prolin
P- δ_3 -V ₁ - α P- δ_3 -P- α	¹ H, ¹ H-2D-NOESY	konformeres Prolin, (interpentamerer NOE-Kontakt des terminalen V ₁ ?)
G-Carbonyl- <i>a</i> und <i>b</i> G- α - <i>d</i>	¹³ C-1D-NMR, HSQC, HMQC, ¹³ C-T ₁ -Relaxation	terminale Reste, Anteil nimmt mit steigender Temperatur ab
V ₁ -Carbonyl- <i>c</i> G- α - <i>e</i>	¹³ C-1D-NMR, HSQC, HMQC, ¹³ C-T ₁ -Relaxation	konformere Aminosäuregruppe, (terminale Gruppierung, die auch Urheber des P- δ_3 -V ₁ - α -NOE-Kontakts ist ?), Anteil nimmt mit steigender Temperatur ab

ist. Eine Erklärung hierfür wäre, dass es im Wesentlichen interne Bewegungen sind, die die Dynamik des GVG(VPGVG)₃-Polypeptids ausmachen und Translations- sowie Rotationsbewegungen des gesamten Moleküls, welche bei kleineren Molekülen schneller sind, nicht so sehr ins Gewicht fallen.

Zusammenfassend lassen sich die Daten im Rahmen eines Überganges von einer ungeordneten Konformation der pentameren (VPGVG)-Einheit in eine β -Schleifen-Konformation des Typs II interpretieren. Bei Raumtemperatur konnte das β -Schleifen-Motiv nachgewiesen werden. Neben der ungeordneten Konformation und der β -Schleifen-Konformation scheinen bei Raumtemperatur noch zwei weitere niedrig populierte Spezies mit Prolinen in abweichender Konformation vorzukommen, was durch das Vorhandensein zweier verschobener Prolin- δ -Signale (P- δ_{sh} und P- δ_3) nahegelegt wird.

Darüber hinaus konnten ¹³C-NMR-spektroskopisch mindestens zwei weitere Subpopulationen identifiziert werden. Erstens finden sich zwei hochdynamische, terminale Glycine, die zusammen zu einer sehr beweglichen terminalen GVG-Gruppe, aber auch zu separaten Termini gehören könnten. Zweitens deutet ein zusätzliches Valin-Carbonyl-Signal auf ein von der Konformation der Hauptpopulation abweichendes Valin₁ hin. Die Besetzung dieser Subpopulationen nimmt mit zunehmender

Temperatur ab.

Auf der Ebene der T_1 -Zeiten konnte kein signifikanter Rückgang der Dynamik aufgrund der Zunahme des Faltungsgrades mit steigender Temperatur gefunden werden. Allerdings folgt die Temperaturabhängigkeit von T_1 für einige Kohlenstoffe im Rahmen der Genauigkeit keinem Arrhenius-Verhalten, was man als Indiz für eine Zunahme des mittleren Faltungsgrades innerhalb des Molekülensembles möglicher Konformationen werten kann. Die aus den T_1 -Zeiten berechneten Aktivierungsenergien sind relativ niedrig, so dass sich insgesamt das Bild eines Ensembles von hochdynamischen Molekülen ergibt, deren mögliche Konformationen nur durch geringe Aktivierungsbarrieren getrennt sind. Gleichzeitig kann allerdings bei Raumtemperatur das Typ-II β -Schleifen-Motiv und vermutlich auch ein interpentamerer Kontakt nachgewiesen werden, welche auf der Zeitskala eines NOESY-Experiments stabil sind.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Zweifelsohne spielen Proteine eine tragende Rolle in der Biochemie des Lebens. Ihre funktionale Diversität ist sehr breit und reicht physiologisch von strukturellen Funktionen, wie sie z.B. das Elastin einnimmt, über regulatorischen Aufgaben bis hin zur enzymatischen Katalyse. Entsprechend komplex und vielfältig sind die Strukturen, welche Proteine einnehmen müssen. Die Struktur der Proteine ist eng mit ihrer Stabilität verknüpft, welche wiederum die Summe vieler Wechselwirkungen wie z.B. hydrophober Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen, ist. Die Summe dieser Wechselwirkungen entscheidet letztendlich darüber, ob ein Protein in gefalteter oder entfalteter Form vorliegt. Bei erhöhten Temperaturen z.B. führt die hohe Konfigurationsentropie ΔS_{conf} zur Entfaltung, während bei niedrigen Temperaturen eine Erniedrigung der Hydratisierungsenthalpie ΔH_{hydr} ebenfalls zu einer Destabilisierung, der sog. Kältdenaturierung, führen kann. Die Umgebung von Proteinen spielt bei der Stabilität von Proteinen eine herausragende Rolle, da jede strukturelle Änderung innerhalb des Moleküls gleichzeitig auch zu einer Interaktion mit der - zumeist wässrigen - Umgebung führt („*slaving*“-Effekt). Daher setzt ein tieferes Verständnis der Proteinstruktur auch eine tiefere Einsicht in die Wechselwirkungen des Polypeptids mit direkter Umgebung voraus. *In vivo* befinden sich globuläre Proteine i.d.R. in einer wässrigen Lösung zusammen mit einem mehr oder minder komplexen Gemisch anderer Stoffe, welche Einfluss auf die Stabilität des Proteins nehmen können.

In dieser Arbeit wurde das Phänomen der Kältdenaturierung anhand zweier Modellsysteme, dem Lysozym aus Hühnereiweiss sowie dem elastin-mimetischen Octadekapeptid GVG(VPGVG)₃, mittels NMR-spektroskopischer Methoden untersucht. Die Untersuchung mittels NMR erlaubt dabei Informationsgewinn auf atomarem Niveau. Die Kältdenaturierung ist als milde Entfaltungsform bekannt, bei welcher, verglichen mit der Hitzdenaturierung, ein Rest an Sekundärstruktur verbleibt,

und somit eine stabile, teilentfaltete Form des Proteins einer Untersuchung zugänglich ist. Desweiteren wird die Kältedenaturierung von der Hydratisierungsenthalpie ΔH_{hydr} angetrieben und erlaubt so Rückschlüsse auf Hydratisierungsphänomene. Die Kältedenaturierung tritt bei Lysozym erst bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes auf, weshalb unter erhöhtem Druck (3750 bar) gearbeitet wurde, bei dem Wasser bis weit (≈ -20 °C) unter 0 °C flüssig vorliegt und das Lysozym kältedenaturiert ist. Elastin-mimetische Peptide hingegen, zu welchem auch das hier untersuchte Octadekapeptid GVG(VPGVG)₃ gehört, weisen einen sog. ITT, einen *Inverse Temperature Transition* oberhalb von 0 °C auf, bei dem mit zunehmender Temperatur der Strukturgrad zunimmt. Der ITT kann wahrscheinlich als eine Art Kältedenaturierung aufgefasst werden, bei dem sich mit abnehmender Temperatur der Strukturgrad verringert und umgekehrt bei steigender Temperatur zunimmt.

Für Lysozym wurde die druckunterstützte Kältedenaturierung (3750 bar, -13 °C, pD 2,4) und der Einfluss der Cosolventien Sorbitol (500 mM) und Harnstoff (2 M) hierauf über *P*-Faktoren NMR-spektroskopisch charakterisiert. Diese lassen sich aus den Austauschraten labiler Amidprotonen gegen den Deuteronen des Deuteriumoxid-Puffers berechnen und stellen ein Maß für den Strukturgrad um einen gegebenen Aminosäurerest dar. Zum Vergleich wurden für die Hitzedenaturierung (1 bar, 80 °C, pD 3,4) die *P*-Faktoren in reinem Puffer und bei Anwesenheit von 500 mM Sorbitol bestimmt. Darüberhinaus wurde die Hitzedenaturierung mikrokolorimetrisch über DSC und PPC sowie ¹H-1D-NMR-spektroskopisch über das Signal des Histidins 15 verfolgt.

Sowohl die DSC- und PPC-Daten als auch die ¹H-1D-NMR-spektroskopischen Messungen weisen die Hitzedenaturierung als hochkooperativen Vorgang im Rahmen eines Zweizustandsmodells aus. Bei den kinetischen Protonenaustausch-Messungen konnte jedoch ein Intermediat bei der thermisch induzierten Entfaltung gefunden werden, welches einen Rest an Struktur aufweist. Die vollständig entfaltete Form weist *P*-Faktoren im Bereich der Zufallsknäuel-Konformation auf. Die Höhe der *P*-Faktoren des Intermediats rechtfertigt allerdings keine Zuordnung zu bekannten Zwischenzuständen, wie sie z.B. durch chemische Denaturantien induziert und für *Molten Globules* berichtet werden. Es ist weniger strukturiert, weist die höchsten *P*-Faktoren bei oder in der Nähe von verbrückten Cysteinen auf und scheint der vollständig entfalteten Form näher zu stehen. Die Zugabe von Sorbitol führte zu keiner signifikanten Änderung der *P*-Faktoren für dieses Intermediat, was unterstreicht, dass es die Zunahme der Konfigurationsenthalpie ΔS_{conf} ist, die diese Art der Entfaltung antreibt und bei der Änderungen der Hydratisierung, wie sie von Sorbitol vermittelt wird, kaum eine Rolle

spielen.

Für die kältedenaturierte Form wurden wesentlich größere P -Faktoren bestimmt, die von der Größe her eher zu bekannten Intermediaten bzw. *Molten Globules* passen. Die Kältedenaturierung ist also eine mildere Form der Entfaltung. Auch hier findet sich der höchste Schutz vor Protonenaustausch bei oder benachbart zu verbrückten Cysteinen. Helicale und β -Faltblatt-Regionen weisen vergleichbare P -Faktoren auf. Bei Zugabe von Sorbitol erhöhen sich die P -Faktoren drastisch, was ein direkter Hinweis auf den Einfluss der Hydratisierung in diesem Entfaltungsszenario ist. Die Stabilisierung der Struktur erfolgt für das gesamte Protein einheitlich: kein Bereich konnte entlang der Sequenz identifiziert werden, der durch die Zugabe des Sorbitols in außerordentlicher Weise restrukturiert würde. Die Sorbitol-vermittelte Stabilisierung betrifft Lysozym also in uniformer Weise und stabilisiert helicale Strukturen wie Faltblattstrukturen gleichermaßen. Dies zeugt davon, dass Sorbitol kaum mit dem Protein interagiert und die durch das Polyol vermittelte Stabilisierung der Hydratisierung unspezifisch das gesamte Protein betrifft, in Übereinstimmung mit dem Konzept der präferentiellen Hydratation, wie es für Proteine in Osmolyten diskutiert wird. Die Anwesenheit von Harnstoff führt zur Absenkung der P -Faktoren. Auch hier ist keine Region innerhalb des Proteins zu verzeichnen, welche in abweichender Weise vom Harnstoff destabilisiert würde. Der Einfluss der Cosolventien auf die kältedenaturierte Form von Lysozym ist also kooperativ und uniform.

Die Charakterisierung des ITT des Octadekapeptids GVG(VPGVG)₃ erfolgte ¹³C-1D-spektroskopisch im Bereich von 23 °C bis 80 °C und die T_1 -Raten wurden für die ¹³C-Kerne bei Temperaturen von 5, 27, 60 und 75 °C bestimmt. Für die Signalzuordnung wurden weiterhin bei Raumtemperatur die ¹³C-¹H-2D-HSQC und -HMBC-Spektren sowie die homonuklearen ¹H-2D-COSY und -NOESY-Spektren bestimmt.

¹³C-NMR-spektroskopisch wurden neben den Hauptsignalen des pentameren G₁V₁G₂V₂P-Motivs im Bereich zwischen 23 und 80 °C weitere Signale gefunden. Diese konnten zwei terminalen Glycinen und einem Valin zugeordnet werden. Die zwei Glycine könnten zusammen zu einer hochdynamischen, terminalen GVG-Gruppe gehören, es könnte sich bei ihnen aber auch um separate N- bzw. carboxyterminale Reste handeln. Die Dynamik des Valins rechtfertigt keine Zuordnung zu einer terminalen Position, daher stammt es wahrscheinlich von einer Subpopulation, bei der dieser Rest in einer von der Hauptpopulation abweichenden Konformation vorliegt. Der relative Anteil der terminalen Glycine als auch des konformereren Valins am gesamten Molekülensemble an Konformationen nimmt mit zunehmender Temperatur ab.

Im 2D-COSY- und 2D-NOESY-Spektrum konnten zwei weitere Prolin- δ -Signale entdeckt werden, welche Hinweise auf zwei Subpopulationen geben, bei denen die Konformation des Prolins von der Prolin-Konformation der Hauptpopulation abweicht. Die Anwesenheit des Typ II- β -Schleifen-Motivs konnte durch das NOESY-Spektrum belegt werden; zudem legen NOE-Signale zwischen der Valin- γ - und Prolin- β/γ -Region Kontakte über die pentamere Sequenz hinaus nahe. Die T_1 -Raten nehmen mit der Temperatur im gesamten untersuchten Temperaturbereich zu und zeigen keinen Hinweis auf ein Rückgang, wie man es bei einer Zunahme des Faltungsgrades erwarten würde. Grund hierfür könnte in der hohen Dynamik des Octadekapeptids liegen, dessen Rotationskorrelationszeiten auf Basis der T_1 -Raten abgeschätzt werden konnten und teilweise Werte erreichen, wie sie für freie Aminosäuren bekannt sind. Allerdings weicht die Temperaturabhängigkeit der T_1 -Zeiten für einige Kerne signifikant vom Arrhenius-Verhalten ab, was man als Hinweis auf eine zunehmende Faltung der pentameren Untereinheiten mit steigender Temperatur werten kann. Die Daten passen in das Bild eines Übergangs von einer ungeordneten, hochdynamischen Struktur in die Typ II β -Schleifen-Konformation bei Erhöhung der Temperatur.

Literaturverzeichnis

- [1] WATSON, J. D. ; CRICK, F. H. C.: Molecular structure of Nucleic Acids. In: *Nature* 171 (1953), S. 737–738
- [2] PHILLIPS, D. C.: The Three-Dimensional Structure of an Enzyme Molecule. In: *Scientific American* 215 (1966), S. 78–90
- [3] REDFIELD, C. ; DOBSON, C. M.: Sequential ¹H-NMR Assignments and Secondary Structure of Hen Egg White Lysozyme in Solution. In: *Biochemistry* 27 (1988), S. 122–136
- [4] SADASIVAN, C. ; NAGENDRA, H. G. ; VIJAYAN, M.: Plasticity, hydration and accessibility in ribonuclease A. The structure of a new crystal form and its low-humidity variant. In: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 54 (1998), S. 1343–1352
- [5] HAWLEY, S. A.: Reversible Pressure-Temperature Denaturation of Chymotrypsinogen. In: *Biochemistry* 10 (1971), S. 2436–2442
- [6] ROBERTSON, A. D. ; MURPHY, K. P.: Protein Structure and Energetics of Protein Stability. In: *Chemical Reviews* 97 (1997), S. 1251–1266
- [7] REES, D. C. ; ROBERTSON, A. D.: Some Thermodynamic Implications for the Thermostability of Proteins. In: *Protein Science* 10 (2001), S. 1187–1194
- [8] KUNUGI, S. ; TANAKA, N.: Cold Denaturation of Proteins under High Pressure. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1595 (2002), S. 329–344
- [9] PRIVALOV, P. L.: Cold Denaturation of Proteins. In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25 (1990), S. 281–305
- [10] LEVINTHAL, C.: How To Fold Graciously. In: *Mössbauer Spectroscopy in Biological Systems Proceedings* 41 (1969), S. 22–24

- [11] RICHARDS, F. M.: The Protein Folding Problem. In: *Scientific American* 264 (1991), S. 34–41
- [12] KARPLUS, M. ; WEAVER, D. L.: Protein Folding Dynamics. In: *Nature* 260 (1976), S. 404–406
- [13] DILL, K. A.: Theory for the Folding and Stability of Globular Proteins. In: *Biochemistry* 24 (1985), S. 1501–1509
- [14] DILL, K. A. ; ALONSO, D. O. V. ; HUTCHINSON, K.: Thermal Stabilities of Globular Proteins. In: *Biochemistry* 28 (1989), S. 5439–5449
- [15] ALONSO, D. O. V. ; DILL, K. A.: Solvent Denaturation and Stabilization of Globular Proteins. In: *Biochemistry* 30 (1991), S. 5974–5985
- [16] ABKEVICH, V. I. ; GUTIN, A. M. ; SHAKHNOVICH, E. I.: Specific Nucleus as the Transition State for Protein Folding: Evidence from the Lattice Model. In: *Nature* 260 (1976), S. 404–406
- [17] FERSHT, A. R.: Optimization of Rates of Protein Folding: The Nucleation-Condensation Mechanism and its implications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (1995), S. 10869–10873
- [18] FERSHT, A. R.: Nucleation Mechanisms in Protein Folding. In: *Current Opinion in Structural Biology* 7 (1997), S. 3–9
- [19] DOBSON, C. M. ; KARPLUS, M.: The Fundamentals of Protein Folding: Bringing Together Theory and Experiment. In: *Current Opinion in Structural Biology* 9 (1999), S. 92–101
- [20] DINNER, A. R. ; SALI, A. ; SMITH, L. J. ; DOBSON, C. M. ; KARPLUS, M.: Understanding Protein Folding Via Free-Energy Surfaces from Theory and Experiment. In: *Trends in Biochemical Sciences* 25 (2000), S. 331–339
- [21] AFINSEN, C. B.: Principles that Govern the Folding of Protein Chains. In: *Science* 181 (1973), S. 223–230
- [22] PTITSYN, O. B. ; UVERSKY, V. N.: The Molten Globule is a Third Thermodynamical State of Protein Molecules. In: *FEBS Letters* 341 (1994), S. 15–18
- [23] KOSHIBA, T. ; YAO, M. ; KOBASHIGAWA, Y. ; DEMURA, M. ; NAKAGAWA, A. ; TANAKA, I. ; KUWAJIMA, K. ; NITTA, K.: Structure and Thermodynamics of the Extraordinary Stable Molten Globule State of Canine Milk Lysozyme. In: *Biochemistry* 39 (2000), S. 3248–3257

- [24] MULLER, N.: Search for a Realistic View of Hydrophobic Effects. In: *Accounts of Chemical Research* 23 (1990), S. 23–28
- [25] MAKHATADZE, G. I. ; PRIVALOV, P. L.: Contributions of Hydration to Protein Folding Thermodynamics I The Enthalpy of Hydration. In: *Journal of Molecular Biology* 232 (1993), S. 639–659
- [26] PRIVALOV, P. L. ; MAKHATADZE, G. I.: Contributions of Hydration to Protein Folding Thermodynamics II The Entropy and Gibbs Energy of Hydration. In: *Journal of Molecular Biology* 232 (1993), S. 660–679
- [27] TIMASHEFF, S. N.: Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002), S. 9721–9726
- [28] TIMASHEFF, S. N.: The Control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 22 (1993), S. 67–97
- [29] SCHELLMANN, J. A.: Selective Binding and Solvent Denaturation. In: *Biopolymers* 26 (1987), S. 549–559
- [30] TANFORD, C.: Isothermal Unfolding of Globular Proteins in Aqueous Solutions. In: *Journal of the American Chemical Society* 86 (1964), S. 2050–2059
- [31] MIRANKER, A. ; RADFORD, S. E. ; KARPLUS, M. ; DOBSON, C. M.: Demonstration by NMR of Folding Domains in Lysozyme. In: *Nature* 349 (1991), S. 633–636
- [32] WILSON, K. P. ; MALCOLM, B. A. ; MATTHEWS, B. W.: Structural and thermodynamic analysis of compensating mutations within the core of chicken egg white lysozyme. In: *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), S. 10842–10849
- [33] KUWAJIMA, K. ; HIRAOKA, Y. ; IKEGUCHI, M. ; SUGAI, S.: Comparison of the Transient Folding Intermediates in Lysozyme and α -Lactalbumin. In: *Biochemistry* 24 (1985), S. 874–881
- [34] SUGAI, S. ; IKEGUCHI, M.: Conformational Comparison between α -Lactalbumin and Lysozyme. In: *Advances in Biophysics* 30 (1994), S. 37–84
- [35] DOBSON, C. M.: Solid Evidence for Molten Globules. In: *Current Biology* 4 (1994), S. 636–640

- [36] LAURETO, P. P. ; FRARE, E. ; GOTTARDO, R. ; DAEL, H. van ; FONTANA, A.: Partly Folded States of Members of the Lysozyme/Lactalbumin Superfamily: A Comparative Study by Circular Dichroism Spectroscopy and Limited Proteolysis. In: *Protein Science* 11 (2002), S. 2932–2946
- [37] AHMAD, F. ; CONTAXIS, C. C. ; BIGELOW, C. C.: Free Energy Changes in Lysozyme Denaturation. In: *Journal of Biological Chemistry* 258 (1983), S. 7960–7963
- [38] STOKKUM, H. M. ; LINSDELL, H. ; HADDEN, J. M. ; HARIS, P. I. ; CHAPMAN, D. ; BLOEMENDAL, M.: Temperature-Induced Changes in Protein Structures Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Global Analysis. In: *Biochemistry* 34 (1995), S. 10508–10518
- [39] BHATTACHARJA, S. ; PADMANABHAN, B.: Hexafluoroacetone Hydrate as a Structure Modifier in Proteins: Characterization of a Molten Globule State of Hen Egg-White Lysozyme. In: *Protein Science* 6 (1997), S. 1065–1073
- [40] HIRAI, M. ; ARAI, S. ; IWASE, H.: Complementary Analysis of Thermal Transition Multiplicity of Hen Egg-White Lysozyme at Low pH Using X-ray Scattering and Scanning Calorimetry. In: *Journal Physical Chemistry B* 103 (1999), S. 549–556
- [41] ARAI, S. ; HIRAI, M.: Reversibility and Hierarchy of Thermal Transition of Hen Egg-White Lysozyme Studied by Small-Angle X-Ray Scattering. In: *Biophysical Journal* 76 (1999), S. 2192–2197
- [42] DOBSON, C. M. ; EVANS, P. A. ; RADFORD, S. E.: Understanding How Proteins Fold: The Lysozyme Story So Far. In: *Trends in Biochemical Sciences* 19 (1994), S. 31–37
- [43] MATAGNE, A. ; JAMIN, M. ; CHUNG, E. W. ; ROBINSON, C. V. ; RADFORD, S. E. ; DOBSON, C. M.: Thermal Unfolding of an Intermediate is Associated with Non-Arrhenius Kinetics in the Folding of Hen Lysozyme. In: *Journal of Molecular Biology* 297 (2000), S. 193–210
- [44] VYAVAHARE, N. ; OGLE, M. ; SCHOEN, F. J. ; LEVY, R. J.: Elastin Calcification and its Prevention with Aluminium Chloride Pretreatment. In: *American Journal of Pathology* 155 (1999), S. 973–982
- [45] D'ARMIENTO, J.: Decreased Elastin Vessel Walls Puts the Pressure on. In: *The Journal of Clinical Investigation* 112 (2003), S. 1308–1310

- [46] KRETTEK, A. ; SUKHOVA, G. K. ; LIBBY, P.: Elastogenesis in Human Arterial Disease. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (2003), S. 582–587
- [47] FOSTER, J. A. ; BRUENGER, E. ; GRAY, W. R. ; SANDBERG, L. B.: Isolation and Amino Acid Sequences of Tropoelastin Peptides. In: *The Journal of Biological Chemistry* 248 (1973), S. 2876–2879
- [48] URRY, D. W. ; TRAPANE, T. L. ; IQBAL, C. M. ; VENKATACHALAM, C. M. ; PRASAD, K. U.: Carbon-13 NMR Relaxation Studies Demonstrate an Inverse Temperature Transition in the Elastin Polypentapeptide. In: *Biochemistry* 24 (1985), S. 5182–5189
- [49] URRY, D. W.: Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction as Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers. In: *Journal of Physical Chemistry B* 101 (1997), S. 11007–11028
- [50] URRY, D. W. ; CHANG, D. K. ; KRISHNA, N. R. ; HUANG, D. H. ; TRAPANE, T. L. ; PRASAD, K. U.: Two-Dimensional Proton NMR Studies on Poly(VPGVG) and Its Cyclic Conformational Correlate, Cyclo(VPGVG)₃. In: *Biopolymers* 28 (1989), S. 819–833
- [51] REIERSEN, H. ; CLARKE, A. R. ; REES, A. R.: Short Elastin-like Peptides Exhibit the Same Temperature-Induced Structural Transition as Elastin Polymers: Implications for Protein Engineering. In: *Journal of Molecular Biology* 283 (1998), S. 255–264
- [52] NICOLINI, C. ; RAVINDRA, R. ; LUDOLPH, B. ; WINTER, R.: Characterization of the Temperature- and Pressure-induced Inverse and Reentrant Transition of the Minimum Elastin-Like Polypeptide GVG(VPGVG) by DSC, PPC, CD and FT-IR Spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 86 (2004), S. 1385–1392
- [53] ROUSSEAU, R. ; SCHREINER, E. ; KOHLMAYER, A. ; MARX, D.: Temperature-Dependent Conformational Transitions and Hydrogen-Bond Dynamics of the Elastin-Like Octapeptide GVG(VPGVG): A Molecular-Dynamics Study. In: *Biophysical Journal* 86 (2004), S. 1393–1407
- [54] BAI, Y. ; MILNE, J. S. ; MAYNE, L. ; ENGLANDER, S. W.: Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange. In: *Proteins: Structure, Function and Genetics* 17 (1993), S. 75–86
- [55] NASH, D. P. ; JONAS, J.: Structure of Pressure-Assisted Cold Denatured Lysozyme and Comparison with Lysozyme Folding Intermediates. In: *Biochemistry* 36 (1997), S. 14375–14383

- [56] ENGLANDER, S. W. ; KALLENBACH, N.: Hydrogen Exchange and Struktural Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 16 (1984), S. 521–655
- [57] BUCK, M. ; RADFORD, S. E. ; DOBSON, C. M.: Amide Hydrogen Exchange in a Highly Denatured State. In: *Journal of Molecular Biology* 237 (1994), S. 247–254
- [58] KALINOWSKI, H. O. ; BERGER, S. ; BRAUN, S.: ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 1984. – 563–565 S. – ISBN 3–13–632801–9
- [59] CHEETHAM, N. W. H. ; LAM, K.: Hydration Studies of Carbohydrates. IV N.M.R. Studies of Carbohydrate Hydration. In: *Australian Journal of Chemistry* 49 (1996), S. 365–369
- [60] PLOTNIKOV, V. V. ; BRANDTS, J. M. ; LIN, L. N. ; BRANDTS, J. F.: A New Ultrasensitive Scanning Calorimeter. In: *Analytical Biochemistry* 250 (1997), S. 237–246
- [61] HEERKLOTZ, H. ; SEELIG, J.: Application of Pressure Pertubation Calorimetry to Lipid Bi-layers. In: *Biophysical Journal* 82 (2002), S. 1445–1452
- [62] PRIVALOV, P. L.: Stability of Proteins. In: *Advances in Protein Chemistry* 33 (1979), S. 167–241
- [63] RAVINDRA, R. ; WINTER, R.: Pressure Pertubation Calorimetric Studies of the Solvation Properties and the Thermal Unfolding of Proteins in Solution. In: *Zeitung für Physikalische Chemie* 217 (2003), S. 1221–1243
- [64] LIN, L. N. ; BRANDTS, J. F. ; BRANDTS, J. M. ; PLOTNIKOV, V.: Determiation of the Volumetric Properties of Proteins and Other Solutes Using Pressure Pertubation Calorimetry. In: *Analytical Biochemistry* 302 (2002), S. 144–160
- [65] KURKOVA, D. ; KRIZ, J. ; SCHMIDT, P. ; DYBAL, J. ; RODRIGUEZ-CABELLO, J. C. ; ALONSO, M.: Structure and Dynamics of Two Elastin-like Polypentapeptides Studied by NMR Spectroscopy. In: *Biomacromolecules* 4 (2003), S. 589–601
- [66] NEAL, S. ; NIP, A. M. ; ZHANG, H. ; WISHART, D. S.: Rapid and Accurate Calculation of Protein ^1H , ^{13}C and ^{15}N Chemical Shifts. In: *Journal of Biomolecular NMR* 26 (2003), S. 215–240
- [67] WINTER, R. ; NOLL, F.: *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Stuttgart : Teubner, 1998. – ISBN 3–519–03518–9

- [68] PETERSEN, B. P. ; JONSON, V. ; FOJAN, P. ; WIMMER, R. ; PEDERSEN, S.: Sorbitol prevents the Self-Aggregation of Unfolded Lysozyme Leading to an up to 13 °C Stabilisation of the Folded Form. In: *Journal of Biotechnology* 114 (2004), S. 269–278
- [69] KOBASHIGAWA, Y. ; DEMURA, M. ; KOSHIBA, T. ; KUMAKI, Y. ; KUWAJAMA, K. ; NITTA, K.: Hydrogen Exchange Study of Canine Milk Lysozyme: Stabilization Mechanism of the molten Globule. In: *Proteins: Structure, Function and genetics* 40 (2000), S. 579–589
- [70] MOROZOVA, L. A. ; HAYNIE, D. T. ; ARICO-MUENDEL, C. ; VAN DAEL, H. ; DOBSON, C. M.: Structural Basis of the Stability of a Lysozyme Molten Globule. In: *Nature Structural Biology* 2 (1995), S. 871–875
- [71] SASAHARA, K. ; DEMURA, M. ; NITTA, K.: Partially Unfolded Equilibrium State of Hen Lysozyme Studied by Circular Dichroism Spectroscopy. In: *Biochemistry* 39 (2000), S. 6475–6482
- [72] SASAHARA, K. ; DEMURA, M. ; NITTA, K.: Equilibrium and Kinetic Folding of Hen Egg-White Lysozyme Under Acidic Conditions. In: *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 49 (2002), S. 472–482
- [73] MARK, A. E. ; GUNSTEREN, W. F.: Simulation of the Thermal Denaturation of Hen Egg White Lysozyme: Trapping the Molten Globule State. In: *Biochemistry* 31 (1992), S. 7745–7748
- [74] BALDWIN, R. L.: Pulsed H/D-Exchange Studies of Folding Intermediates. In: *Current Opinion in Structural Biology* 3 (1993), S. 84–91
- [75] HUGHSON, F. M. ; WRIGHT, P. E. ; BALDWIN, R. L.: Structural Charakterization of a Partly Folded Apomyoglobin Intermediate. In: *Science* 249 (1990), S. 1544–1548
- [76] LU, J. ; DAHLQUIST, F. W.: Detection and Characterization of an Early Folding Intermediate of T4 Lysozyme Using Pulsed Hydrogen Exchange and Two Dimensional NMR. In: *Biochemistry* 26 (1992), S. 7749–7756
- [77] JACOBS, M. D. ; FOX, R. O.: Staphylococcal Nuclease Folding Intermediate Characterized by Hydrogen Exchange and NMR Spectroscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (1994), S. 449–453

- [78] BUCK, M. ; RADFORD, S. E. ; DOBSON, C. M.: A Partially Folded State of Hen Egg White Lysozyme in Trifluoroethanol: Structural Characterization and Implications for Protein Folding. In: *Biochemistry* 32 (1993), S. 669–678
- [79] RADFORD, S. E. ; BUCK, M. ; TOPPING, K. D. ; DOBSON, C. M. ; EVANS, P. A.: Hydrogen Exchange in Native and Denatured States of Hen Egg-White Lysozyme. In: *Proteins: Structure, Function and Genetics* 14 (1992), S. 237–248
- [80] WIMMER, R. ; OLSSON, M. ; PETERSEN, M. T. N. ; HATTI-KAUL, R. ; PETERSEN, S. B. ; MÜLLER, N.: Towards a Molecular Level Understanding of Protein Stabilization: the Interaction between Lysozyme and Sorbitol. In: *Journal of Biotechnology* 55 (1997), S. 85–100
- [81] DESLAURIERS, R. ; LEVY, G. C. ; MCGREGOR, H. ; SARANTAKIS, D. ; SMITH, C. P.: The Influence of Glycyl Residues on the Flexibility of Peptide Hormons in Solution. In: *European Journal of Biochemistry* 75 (1977), S. 343–346

Lebenslauf

Name	Karsten Vogtt
Geburtsdatum	8. September 1973
Geburtsort	Stadtlohn
1980-1984	Hordtschule Stadtlohn
1984-1993	Gymnasium Georganium Vreden Abschluss: Abitur
1993-1994	Zivildienst
1994-2000	Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum Abschluss: Diplom
2000-2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Biophysik der Ruhr-Universität Bochum
seit Oktober 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Physikalische Chemie der Universität Dortmund
Januar 2002	Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. R. Winter an der Universität Dortmund